



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

***PRODUCCIÓN DE CELULASAS FÚNGICAS
Y SU AISLAMIENTO
UTILIZANDO POLIELECTROLITOS***

Presentada por Lic. María Julia Boggione
Rosario, Argentina

2017

PRODUCCIÓN DE CELULASAS FÚNGICAS Y SU AISLAMIENTO UTILIZANDO POLIELECTROLITOS

María Julia Boggione

Licenciada en Biotecnología, Universidad Nacional de Rosario

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 Departamento Química-Física, Área Fisicoquímica, y en el Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos (IPROBYQ-CONICET) dependientes de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR, durante el período comprendido entre el 1 de abril del 2012 y el 7 de diciembre del 2016, bajo la dirección de la Dra. Beatriz Farruggia.

Nombres y firmas del Director y de los integrantes del Jurado de Tesis:

Director: Dra. Beatriz Farruggia

Jurado:.....

Jurado:.....

Jurado:

Defendida:.....

Como muchas cosas, esta Tesis no es más que un trabajo de equipo. Todo fue posible llevarlo a cabo por el apoyo, el aliento y la compañía de mucha gente...

Mi Directora Bery, todo el equipo de hoy IPROByQ y PROFEP.

La gente de México, y Cintia en Brasil, también me acompañaron siempre.

Gracias a Paula, mi primer Tesinista...

Gracias a mi Familia, mis viejos y mis hermanos siempre presentes.

Y a Mauro que probablemente si no fuera por su insistencia hoy no estaría aquí.

A todos y a cada uno los llevo en el corazón, y no por los resultados de esta Tesis ni papers sino por el amor que me han dado durante este camino...

Participación en Proyectos de Financiamiento C y T

- “ Desarrollo de matrices poliméricas como estrategia bioseparativa de enzimas industriales”. (CONICET-PIP-112-201101-00578). Directora Beatriz Farruggia. Resol. D 1672. Enero 2014- dic. 2016.
- “ Escalado de producción de enzimas industriales y su recuperación con polielectrolitos naturales”. (PICT Bilateral -2012-0428). FonCyT (2013-2014). MinCyT- CONACYT (México) (19 de diciembre de 2012 al 19 de diciembre de 2015)
- “ BiValBi— Biotechnologies to Valorise the regional food Biodiversity in Latin America(part)identifier FP7-PEOPLE-2013-IRSES (611493). Marie Curie Actions— International Research Staff Exchange Scheme (IRSES). (10 de octubre de 2013 al 1 de octubre de 2016).
- “ Desarrollo de tecnologías bioseparativas no contaminantes basadas en la producción de matrices de polímeros naturales y sintéticos con capacidad de aislar enzimas de importancia industrial a partir de sus fuentes naturales (BR/13/11). Programa de Cooperación Científico-Tecnológica entre el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MINCYT) y la Coordinación de Perfeccionamiento del Personal de Nivel Superior (CAPES) de Brasil.

- “ Nuevas matrices poliméricas biodegradables de alta capacidad de adsorción y baja interacción con la biomasa para la purificación de enzimas de importancia biotecnológica. (PICT-2013-0271). Proyectos Argentina innovadora 2020 (10 de octubre del 2014 al 9 de octubre de 2017).
- “ Sistemas Micelares Benignos al Ambiente: Diseño, Caracterización y Aplicación en Procesos Extractivos de Importancia Biotecnológico-Industrial” (2015-2017) (11220150100505CO – CONICET). Director: Bibiana Nerli. Co-director: Diana Romanini.

Becas de Investigación Científica y Tecnológica

1- CONICET - Beca Interna de Postgrado Tipo I – (2012-2015).

Título del Proyecto: “Producción de enzimas fúngicas de interés industrial y su aislamiento por adsorción en matrices insolubles”

Directora: Dra. Beatriz Farruggia

Lugar de trabajo: Departamento de Química-Física. Área Fisicoquímica.
Universidad Nacional de Rosario. CONICET.

2- CONICET - Beca Interna de Postgrado Tipo II– (2015-2017)

Título del Proyecto: “Producción de enzimas fúngicas de interés industrial y su aislamiento por adsorción en matrices insolubles”

Directora: Dra. Beatriz Farruggia

Lugar de trabajo: Departamento de Química-Física. Área Fisicoquímica.
Universidad Nacional de Rosario. IPROByQ–CONICET.

Investigación en el Exterior

1-Salttillo-México. Universidad Autónoma de Coahuila. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Investigación en Alimentos. Laboratorio de Bioprocesos. (21 de abril - 18 de mayo 2014).

Proyecto de Cooperación Bilateral Argentina-México: Escalado de producción de enzimas industriales y su recuperación con polielectrolitos naturales PICT Bilateral - 2012-0428. FonCyT (2013-2014).

2-Campinas, Brasil. Universidade Estadual do Campinas. Faculdade de Engenharia Química. Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos.

(3 de noviembre al 22 de noviembre 2014)

Proyecto en Programas de Cooperación Bilateral Argentina-Brasil: “Desarrollo de tecnologías bioseparativas no contaminantes basadas en la producción de matrices de polímeros naturales y sintéticos con capacidad de aislar enzimas de importancia industrial a partir de sus fuentes naturales.” (BR/13/11). Programa de Cooperación Científico-Tecnológica entre el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MINCYT) y la Coordinación de Perfeccionamiento del Personal de Nivel Superior (CAPES) de Brasil.

Presentaciones a Eventos Nacionales e Internacionales

- 1- Becher Ramiro, **Boggione María Julia**, Giordano Matías, Imelio Natalia, Farruggia Beatriz. Precipitación de celulasa de *Aspergillus niger* mediante la formación del complejo enzima-polivinil sulfonato de sodio como metodología bioseparativa. XIV Congreso y XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Casilda, Argentina. Noviembre, 2012.
- 2- **Boggione María Julia**, Becher Ramiro, Imelio Natalia, Farruggia Beatriz. Estabilidad frente a la Temperatura y al pH de celulasa de *Aspergillus niger*. Producción y aislamiento desde caldos de cultivo en medio sólido. XVIII Congreso de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Rosario, Argentina. Abril, 2013.
- 3- Becher Ramiro, Giordano Matías, **Boggione María Julia**, Marini Analía, Farruggia Beatriz. Precipitación de celulasa de *Aspergillus niger* empleando polielectrolitos catiónicos y aniónicos. XVIII Congreso de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Rosario, Argentina. Abril, 2013.
- 4- **Boggione María Julia**, Giordano Matías, Rodríguez Fernanda, Romanini Diana, Farruggia Beatriz. Producción y aislamiento de celulasa de *Aspergillus niger* y *Trichoderma* sp en medio sólido. Análisis de la estabilidad enzimática frente a la temperatura y al pH. 27º Congreso Brasileiro de Microbiología. Natal, Brasil. Septiembre, 2013.

- 5- **Boggione María Julia**, Imelio Natalia, Lo Menzo Fernando, Spelzini Darío, Farruggia Beatriz. Adsorción de Proteínas de interés industrial en Matrices de Chitosán. Workshop sobre Adsorción, Adsorbentes y sus Aplicaciones. San Luis, Argentina. Febrero, 2014.
- 6- **Boggione María Julia**, Bassani Georgina, Mengarelli Diego, Biscari Lucía, Mihovilcevic Damila, Imelio Natalia, Marini Analía, Rodríguez Fernanda, Farruggia Beatriz. Producción y Purificación de Celulasa.VIII Jornada de Ciencia y Tecnología. Rosario, Argentina. Octubre, 2014.
- 7- Woitovich Nadia, Brasesco María Emilia , Maglione María Victoria , **Boggione María Julia**, Farruggia Beatriz, Picó Guillermo. Production and isolation of catalase and endoglucanase from *Aspergillus niger* by solid fermentation using agricultural wastes. Total Food 2014. Norwich, Inglaterra. Noviembre, 2014.
- 8- **Boggione María Julia**, Gómez García, Ricardo; Galindo, Ivano; Aguilar, Cristóbal y Farruggia, Beatriz. Producción de celulasa de *Aspergillus niger* en medios de cultivo sólido de olote de maíz blanco. XVI Congreso y la XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Argentina. Diciembre, 2014.
- 9- Biscari Lucía, Bassani Georgina, **Boggione María Julia**, Farruggia Beatriz. Producción de celulasa de *Aspergillus niger* en medios de cultivo sólido de papel blanco. XVI Congreso y la XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Argentina. Diciembre, 2014.

- 10- Boggione María Julia**, Bassani Georgina, Farruggia Beatriz. Distintos soportes para la producción de celulasa de *Aspergillus niger* de cultivo en medio sólido. 3° Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos. Rosario, Argentina. Diciembre de 2014.
- 11- Mengarelli Diego, Boggione María Julia**, Farruggia Beatriz. Producción de matrices poliméricas para adsorción de celulasa de *Aspergillus niger*. 3° Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos. Santa Fe, Argentina. Diciembre, 2014.
- 12- Boggione María Julia**, Gómez García Ricardo, Aguilar González Cristóbal Noe, Farruggia Beatriz. Producción de celulasa de *Aspergillus niger* en medios de cultivo sólido de olote de maíz blanco y su extracción utilizando sistemas bifásicos acuosos. 3° Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos. Santa Fe, Argentina. Diciembre, 2014.
- 13- Boggione María Julia**, Mihovilcevic Damila, Biscari Lucía, Bassani Georgina, Rodríguez Fernanda, Farruggia Beatriz. Análisis espectroscópico de endoglucanasa en distintos medios. XIX Congreso Argentino de Fisicoquímica Buenos Aires, Argentina. Abril, 2015.
- 14- Mahl Cynthia R. A., Boggione María Julia**, Farruggia Beatriz, Beppu Marisa M., Arruda Eduardo J. Obtenção e Caracterização de Membranas de Quitosana

Funcionalizadas com Aminoácidos para Adsorção de Celulase. Congresso Brasileiro de Polímeros. Natal, Brasil. Octubre, 2015

15- Zilli Paula, **Boggione María Julia**, Farruggia, Beatriz. Adsorción de celulasa sobre diferentes matrices de chitosán. XVII Congreso y la XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Argentina. Diciembre, 2015

16- **Boggione, María Julia**, Allasia María Belén; Aguilar González Cristóbal Noé; Farruggia, Beatriz. Análisis de la velocidad de crecimiento radial de diferentes cepas fúngicas y producción de enzimas celulolíticas bajo fermentación en estado sólido sobre residuo agroindustrial. Congreso Latinoamericano y Argentino de Microbiología. Rosario, Argentina. Septiembre, 2016.

17- **Boggione María Julia**, Zilli Paula, Farruggia Beatriz. Aislamiento de endoglucanasa de cultivo fúngico a través de la adsorción sobre matrices poliméricas. 4° Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos. Buenos Aires, Argentina. Diciembre, 2016.

Publicaciones en Revistas Internacionales con Referato

- 1- **Boggione María Julia**, Allasia María Belén, Bassani Georgina ,Farruggia Beatriz. *“Potential use of soybean hulls and waste paper as supports in SSF for cellulase production by Aspergillus niger”*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.
Volume 6, pages 1-8. 2016.

- 2- **Boggione María Julia**, Becher Ramiro, Farruggia Beatriz. *“Single method of purification for endoglucanase from Aspergillus niger by polyelectrolyte precipitation”*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.
Volume 7, pages 118-126. 2016.

- 3- Enviado: **Boggione María Julia**, Mahl R. A Cynthia, Beppu Marisa M., Farruggia Beatriz. *“Synthesis and Characterization of Chitosan Membranes functionalized with amino acids and copper for adsorption of endoglucanase”*.

Cursos de Perfeccionamiento Científico (Cursos de Postgrado)

1. *Materiales nanoestructurados e Interfaces. Preparación, caracterización y aplicaciones.* Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba (2012). Cantidad de horas: 30 horas.

2. *Bio-procesos Microbianos en Estado Sólido y Principios de Ingeniería Bioquímica.* Dictado por Prof. Dr. Cristóbal N. Aguilar. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila, México. Institución organizadora: Laboratorio de Fisicoquímica Aplicada a la Bioseparación- Rosario, Fac. Cs. Bioq. y Farm., UNR. Depto. De Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, México. Lugar: Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario (2012). Cantidad de horas del curso: 40 horas.

3. *Tópicos de Espectrometría de Masas.* Dictado por Prof. Dra. Rosa Erra-Balsells, CIHIDECAR-Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Lugar: Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario (2012). Cantidad de horas del curso: 30 horas.

4. *Cinética Enzimática*
Biofísica, Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario (2012). Cantidad de horas del curso: 60 horas.

5. *Redacción de Papers Científicos en Inglés*. Dictado por M. Victoria González Eusevi. Lic en Cs. Biológicas, UBA. Proficiency in English, University of Cambridge. Lugar: Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario (2012). Cantidad de horas del curso: 20 horas.

6. *Epistemología*. Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario (2012). Cantidad de horas del curso: 30 horas.

7. *Introducción a la taxonomía fúngica*. Depto. Microbiología, Área Micología, CEREMIC. Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario (2012). Cantidad de horas del curso: 60 horas.

8. *Estadística Aplicada*. Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario (2013). Cantidad de horas del curso: 70 horas.

9. *Relación estructura-función en proteínas*. Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario (2013). Cantidad de horas del curso: 60 horas.

Índice	I
Abreviaturas y símbolos	XII
Palabras tomadas de idioma extranjero	XIV
Resumen	XV
Capítulo 1. Introducción	1
1.1. Biotecnología y Bioseparación	1
1.2. Bioseparación de proteínas	2
1.3. Técnicas que emplean polímeros de cadena flexible	4
1.3.1. Utilidad de los polímeros de cadena flexible en la bioseparación	4
1.3.1.1. Polímeros de cadena flexible	5
1.3.1.2. Precipitación de proteínas usando polielectrolitos	6
1.3.1.3. Diseño de un método de precipitación de proteínas con un PE	9
1.3.2. Técnicas bioseparativas que emplean matrices poliméricas insolubles	10
1.3.2.1. Adsorción	10
1.4. Polímeros utilizados en este trabajo	12
1.4.1. Polivinil sulfonato de sodio (PVS)	12
1.4.2. Chitosán (CHS)	14
1.4.3. Eudragit®EPO	16
1.4.4. Alginato	17
1.4.5. Goma Arábica	19
1.5. Celulasas	20
1.5.1. Mecanismo de catálisis	21
1.5.2. Relación estructura – función de celulasas	22
1.5.3. Celulasas en la industria	23

1.5.4. Celulasa de <i>Aspergillus niger</i>	25
1.6. Técnicas para estudiar la estructura secundaria y terciaria de la endoglucanasa	26
1.6.1. Espectroscopía de dicroísmo circular (DC)	26
1.6.2. Espectroscopía de fluorescencia (F)	28
1.7. Fermentación en estado sólido	32
Capítulo 2. Objetivos	35
Capítulo 3. Materiales y Métodos	37
3.1. Materiales	37
3.2. Metodologías	39
3.2.1. Determinación cuantitativa de actividad enzimática endoglucanasa	39
3.2.2. Determinación cualitativa actividad enzimática endoglucanasa	40
3.2.3. Determinación de actividad enzimática exoglucanasa	40
3.2.4. Determinación de actividad enzimática β -glucosidasa	41
3.2.5. Determinación de la concentración de proteínas totales	41
3.2.6. Determinación de temperatura óptima de actividad endoglucanasa	42
3.2.7. Determinación de condiciones de estabilidad de endoglucanasa	43
3.2.7.1. Determinación de estabilidad endoglucanasa frente a temperatura	43
3.2.7.2. Determinación de estabilidad endoglucanasa frente a pH	43
3.2.8. Dicroísmo circular de endoglucanasa	44
3.2.9. Espectros de emisión de fluorescencia nativa de endoglucanasa	44
3.2.10. Extinción de la fluorescencia de la endoglucanasa con acrilamida	44
3.2.11. Producción de celulasas fúngicas	45

<i>3.2.11.1. Caracterización fisicoquímica de soportes para cultivo en medio sólido</i>	45
<i>3.2.11.2. Evaluación de la Velocidad de Crecimiento Radial</i>	45
<i>3.2.11.3. Microorganismo y preparación del inóculo</i>	46
<i>3.2.11.4. Cultivo en Medio Sólido</i>	47
<i>3.2.11.5. Determinación de glucosamina</i>	49
<i>3.2.11.6. FPLC (Fast protein liquid chromatography)</i>	50
<i>3.2.11.7. Microscopía Electrónica de Barrido del soporte cáscaras de soja para fermentación en estado sólido</i>	50
<i>3.2.11.8. Análisis estadístico del efecto del soporte sobre la producción de celulasa en la FES</i>	51
<i>3.2.11.9. Análisis estadístico para evaluar el efecto del tiempo sobre la producción de celulasa en cáscaras de soja</i>	52
<i>3.2.11.10. SDS-PAGE y análisis de zimograma</i>	52
<i>3.2.12. Precipitación con polielectrolitos</i>	53
<i>3.2.12.1. Caracterización de las interacciones polímero-proteína</i>	53
<i>3.2.12.1.1. Formación del complejo polímero-proteína</i>	53
<i>3.2.12.1.2. Efecto de la concentración del polímero sobre la formación del complejo</i>	54
<i>3.2.12.1.3. Efecto de la concentración de enzima sobre la formación del complejo insoluble</i>	55
<i>3.2.12.1.4. Efecto del pH sobre la formación del complejo insoluble</i>	55
<i>3.2.12.1.5. Cinética de formación del complejo</i>	56
<i>3.2.12.2. Disociación del complejo polímero-proteína</i>	57
<i>3.2.12.2.1. Efecto del pH</i>	58
<i>3.2.12.2.2. Efecto de la fuerza iónica</i>	58

3.2.12.3. Actividad de la enzima en ausencia y presencia del polímero, así como en ausencia y presencia de NaCl 1,0 M	59
3.2.12.4. Estabilidad de endoglucanasa a través del tiempo en presencia de polímero	59
3.2.12.5. Diseño del método de precipitación	60
3.2.13. Matrices poliméricas	62
3.2.13.1. Síntesis de matrices poliméricas	62
3.2.13.1.1. Preparación de la matriz triturada de CHS 3% P/V en HAc 1% V/V	62
3.2.13.1.2 Preparación de esferas de CHS 2,5% P/V en HAc 5% V/V	63
3.2.13.1.3. Preparación de esferas de CHS entrecruzada con epiclorhidrina	64
3.2.13.1.4. Preparación de esferas de CHS 2% P/V en HAc 5% V/V	65
3.2.13.1.5. Preparación de esferas de CHS 2% P/V entrecruzada con Glutaraldehído 0,5% P/V	66
3.2.13.1.6. Preparación de esferas de CHS - Eudragit® EPO	66
3.2.13.1.7. Preparación de esferas de Alginato – Goma Arábica	66
3.2.13.1.8. Preparación de membranas de CHS	67
3.2.13.1.8.1. Funcionalización de membranas de CHS	67
3.2.13.2. Caracterización de las matrices esféricas	68
3.2.13.2.1. Titulación de las matrices esféricas	68
3.2.13.2.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las matrices esféricas	69
3.2.13.3. Caracterización de las Membranas poliméricas	69
3.2.13.3.1. Microscopía Electrónica de Barrido de las Membranas de CHS	69
3.2.13.3.2. Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	70
3.2.13.3.3. Análisis termogravimétrico (TGA)	70
3.2.13.3.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	70

3.2.13.4. Estudios de Cinética de adsorción de endoglucanasa sobre matrices poliméricas	71
3.2.13.4.1. Adsorción de endoglucanasa comercial (LCC) sobre matrices esféricas insolubles	71
3.2.13.4.1.1 Desorción de endoglucanasa de matrices insolubles	71
3.2.13.4.1.2. Cálculo del rendimiento de la adsorción-desorción. Balance de masa	72
3.2.13.4.2. Estudios Cinéticos de Adsorción de endoglucanasa de un cultivo fúngico sobre matrices insolubles	73
3.2.13.4.3. Cálculos de Factor de Purificación y Rendimiento de endoglucanasa	74
3.2.13.4.4. Análisis estadístico de la adsorción de endoglucanasa de un extracto fúngico sobre matrices poliméricas	75
3.2.13.4.5. Adsorción de endoglucanasa sobre membranas de CHS	76
3.2.14. Procesamiento de datos experimentales	76
Capítulo 4. Resultados y Discusión. Caracterización de endoglucanasa	77
4.1. Determinación de la temperatura óptima de actividad endoglucanasa y condiciones de estabilidad frente a pH y temperatura	77
4.1.1. Determinación de la temperatura óptima de actividad endoglucanasa	77
4.1.2. Determinación de estabilidad endoglucanasa frente a la temperatura	78
4.1.3. Determinación de estabilidad endoglucanasa frente al pH	79
4.1.4. Espectros de Dicroísmo circular a diferentes valores de pH	80
4.1.5. Extinción de la fluorescencia de endoglucanasa nativa a diferentes valores de pH	81

Capítulo 5. Resultados y Discusión. Producción de celulasas fúngicas	84
5.1. Evaluación del Crecimiento Radial a través del tiempo en cepas fúngicas productoras de celulasas	84
5.2. Producción de celulasa en FES sobre marlo de maíz blanco	86
5.2.1. Determinación de pH en FES sobre marlo de maíz blanco	86
5.2.2. Actividad exoglucanasa y β -glucosidasa en FES sobre marlo de maíz blanco	87
5.2.3 Determinación cualitativa de endoglucanasa en el extracto fúngico obtenido de FES en marlo de maíz blanco	88
5.2.4. SDS-PAGE y análisis de Zimograma de actividad endoglucanasa del extracto fúngico de la FES sobre marlo de maíz blanco	89
5.2.5. Proteínas totales en FES sobre marlo de maíz blanco	90
5.2.6. Actividad específica exoglucanasa y β -glucosidasa en FES sobre marlo de maíz	91
5.2.7. Productividad volumétrica de exoglucanasa y β -glucosidasa en FES sobre marlo de maíz	92
5.3. Fermentación en estado sólido sobre cáscaras de soja y papel residual	93
5.3.1. Caracterización fisicoquímica de los soportes cáscaras de soja y papel para FES	93
5.3.2. Producción de biomasa en la FES sobre cáscaras de soja y papel residual	94
5.3.3. Producción de celulasas en la FES sobre cáscaras de soja y papel residual	95
5.3.4. Proteínas totales en FES sobre cáscaras de soja y papel residual	97
5.3.5. Productividad volumétrica celulasa en la FES sobre papel residual y cáscaras de soja	98
5.3.6. Análisis estadístico para evaluar el efecto del soporte sobre la producción	100

<i>de celulasa</i>	
5.3.7. <i>Análisis estadístico para evaluar el efecto del tiempo sobre la producción de celulasa en cáscaras de soja</i>	103
5.3.8. <i>Microscopía Electrónica de Barrido del soporte cáscaras de soja</i>	105
5.4. <i>Comparación de los soportes utilizados para FES</i>	106
Capítulo 6. Resultados y Discusión. Precipitación de endoglucanasa utilizando polielectrolitos	108
6.1. <i>Formación del complejo insoluble PVS-Endoglucanasa</i>	108
6.1.1. <i>Curvas de precipitación de proteína con PVS</i>	108
6.1.2. <i>Efecto del pH en la formación del complejo insoluble. Diagramas de solubilidad</i>	110
6.1.3. <i>Efecto de la concentración de PVS en la formación del complejo insoluble</i>	111
6.1.4. <i>Efecto de la concentración de enzima en la formación del complejo insoluble</i>	112
6.1.5. <i>Cinética de formación del complejo insoluble</i>	114
6.1.6. <i>Efecto de la fuerza iónica sobre la formación del complejo insoluble</i>	115
6.1.7. <i>Estabilidad enzimática endoglucanasa en presencia de PVS y NaCl</i>	116
6.1.8. <i>Actividad endoglucanasa en función del tiempo en presencia de PVS</i>	116
6.1.9. <i>Precipitación de endoglucanasa comercial con PVS a distintos tiempos</i>	118
6.1.10. <i>Precipitación de endoglucanasa obtenida de un cultivo fúngico con PVS</i>	119
6.1.10.1. <i>SDS-PAGE y análisis de zimograma de actividad endoglucanasa del extracto fúngico y del precipitado re-disuelto utilizando PVS</i>	120
6.2. <i>Formación del complejo insoluble CHS-endoglucanasa</i>	122
6.2.1. <i>Curvas de precipitación de proteína con CHS</i>	122

6.2.2. Efecto del pH en la formación del complejo insoluble CHS-endoglucanasa.	123
Diagramas de solubilidad	
6.2.3. Efecto de la concentración de CHS en la formación del complejo insoluble	124
6.2.4. Efecto de la concentración de enzima en la formación del complejo insoluble	126
6.2.5. Cinética de formación del complejo	127
6.2.6. Efecto de la fuerza iónica sobre la formación del complejo insoluble	128
6.2.7. Estabilidad enzimática en presencia de CHS y NaCl	129
6.2.8. Actividad endoglucanasa en función del tiempo en presencia de CHS	130
6.2.9. Precipitación de endoglucanasa comercial con CHS a distintos tiempos	131
6.2.10. Precipitación de endoglucanasa obtenida de un cultivo fúngico con CHS	132
6.2.10.1. SDS-PAGE y análisis de zimograma de actividad endoglucanasa del extracto fúngico y del precipitado re-disuelto usando CHS	134
6.3. Espectros de dicroísmo circular de endoglucanasa en ausencia y presencia de CHS	135
6.4. Espectros de emisión de fluorescencia nativa de endoglucanasa en ausencia y presencia de CHS	136
Capítulo 7. Resultados y Discusión. Síntesis de matrices poliméricas	138
7.1. Caracterización de las matrices esféricas	138
7.1.1. Curvas de titulación para la determinación del punto isoeléctrico de las matrices esféricas	138
7.1.2. Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier de las matrices esféricas	143
7.1.3. Microscopía Electrónica de Barrido de las matrices esféricas	145
7.2. Caracterización de las membranas poliméricas	146

	<i>Índice</i>
7.2.1. SEM de las membranas de CHS	147
7.2.2. Análisis FTIR de membranas	148
7.2.3. Análisis termogravimétrico de las membranas de CHS	152
7.2.4. Estudios de Calorimetría Diferencial de Barrido de las membranas de CHS	155
Capítulo 8. Resultados y Discusión. Adsorción de endoglucanasa sobre matrices poliméricas	161
8.1. Adsorción de endoglucanasa de <i>Aspergillus niger</i> sobre matriz de CHS 3% P/V triturada en buffer fosfato 50 mM pH 7,00 y pH 6,00	161
8.1.1. Adsorción de endoglucanasa de <i>A. niger</i> sobre matriz de CHS 3% P/V triturado en buffer fosfato 50 mM pH 7,00	161
8.1.2. Adsorción de endoglucanasa de <i>A. niger</i> sobre matriz de CHS 3% P/V triturado en buffer fosfato 50 mM pH 6,00	164
8.1.3. Comparación de la adsorción de endoglucanasa de <i>A. niger</i> sobre matriz de CHS 3% P/V triturada en buffer fosfato 50 mM entre pH 7,00 y pH 6,00	166
8.2. Adsorción de endoglucanasa de <i>A. niger</i> sobre matriz de CHS 2,5% P/V en buffer fosfato 50 mM pH 7,00 y buffer citrato 50 mM pH 5,30	169
8.2.1. Adsorción de endoglucanasa de <i>A. niger</i> sobre matriz de CHS 2,5% P/V en buffer fosfato 50 mM pH 7,00	169
8.2.2. Adsorción de endoglucanasa de <i>A. niger</i> sobre matriz de CHS 2,5 % P/V en buffer citrato 50 mM pH 5,30	172
8.2.3. Comparación de la adsorción de endoglucanasa de <i>A. niger</i> sobre matriz de CHS 2,5% P/V en buffer fosfato 50 mM pH 7,00 y buffer citrato 50 mM pH 5,30	174

8.3. Adsorción de endoglucanasa de <i>A. niger</i> sobre matriz de CHS entrecruzada con epíclorhidrina en buffer fosfato 50 mM pH 7,00 y buffer citrato 50 mM pH 5,30	178
8.3.1. Adsorción de endoglucanasa de <i>A. niger</i> sobre matriz de CHS entrecruzada con epíclorhidrina en buffer fosfato 50 mM pH 7,00	178
8.3.2. Adsorción de endoglucanasa de <i>A. niger</i> sobre matriz de CHS entrecruzada con epíclorhidrina en buffer citrato 50 mM pH 5,30	180
8.3.3. Comparación de la adsorción de endoglucanasa de <i>A. niger</i> sobre matriz de CHS-ECH en buffer fosfato 50 mM pH 7,00 y buffer citrato 50 mM pH 5,30	183
8.4. Adsorción de endoglucanasa de <i>A. niger</i> sobre matriz de CHS 2,5% P/V a diferentes relaciones de masas iniciales proteína/adsorbente en buffer citrato 50 mM pH 5,30	188
8.5. Adsorción y desorción de endoglucanasa proveniente de un medio de cultivo fúngico	193
8.5.1 Matriz de CHS 2 % P/V	193
8.5.2. Adsorción sobre matriz de CHS 2% P/V entrecruzada con Glutaraldehído 0,5 % P/V	195
8.5.3. Adsorción sobre matriz de CHS-EPO	198
8.5.4. Adsorción sobre matriz de Alginato-Goma Arábica	199
8.5.5. Eficiencia del Proceso de Purificación de Endoglucanasa proveniente de un cultivo fúngico	201
8.5.6. Análisis Estadístico	203
8.6. Adsorción de endoglucanasa sobre las membranas poliméricas	206
Capítulo 9. Conclusiones	209

Capítulo 10. Referencias Bibliográficas

214

Abreviaturas y símbolos

1. Abreviaturas

Abs = Absorbancia

ALG = Alginato de Sodio

Asp = Aspartato

ATR = Reflectancia Total Atenuada

BSA = Albúmina Sérica Bovina

CHP = Critical Humidity Point

CHS = Chitosan

CMC = Carboximetilcelulosa

DC = Dicroísmo Circular

DNS = Ácido 3,5-dinitrosalicílico

DSC = Calorimetría Diferencial de Barrido

ECH = Epiclorhidrina

EG = Endoglucanasa (Megazyme)

EPO = Eudragit® EPO

FES = Fermentación en Estado Sólido

FP = Factor de Purificación

FTIR = Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier

GA = Goma Arábica

Glu = Glutamato

GLUT = Glutaraldehído

HAc = Ácido Acético

His = Histidina

LCC = Liofilizado de endoglucanasa comercial

PCF = Polímero de cadena flexible

PD = Packing Density

PE = Polielectrolito

pI = Punto isoeléctrico

pNPG = p-nitrofenil β : 1-4 glucopiranosido

PVS = Polivinil sulfonato

SEM = Microscopía Electrónica de Barrido

Ser = Serina

Tau = Taurina

TG = Termogravimetría

TGA = Análisis Termogravimétrico

WAI = Water Absorption Index

%R = Rendimiento de la precipitación

2. Símbolos

ε = Coeficiente de absortividad molar

κ = Constante de Debye-Hückel

μ = Fuerza iónica

σ = Densidad de carga superficial de la proteína

ζ = Densidad de carga superficial del polielectrolito

a = Constante que relaciona a σ y ζ con κ

e = Estequiometría del complejo

Palabras tomadas del idioma extranjero

Buffer: solución amortiguadora que sufre un cambio limitado de pH al agregar una cantidad pequeña de ácido o base.

Crosslinking: entrecruzamiento químico.

FPLC: Del inglés: *Fast protein liquid chromatography*. Cromatografía líquida rápida de proteínas

Plateau: Saturación.

Quenching: Proceso de extinción de la fluorescencia

SDS-PAGE : Del inglés: *Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis*.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio.

La enzima celulasa tiene una vasta aplicación industrial para la producción de biocombustibles, en la industria del papel, del detergente y textil. Los tres componentes que conforman el complejo enzimático (endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa) pueden efectivamente degradar la celulosa. La fermentación en estado sólido (FES) llevada a cabo por hongos es una ruta de producción interesante debido a su bajo costo entre otras ventajas. En este trabajo se realizó la producción de celulasa por *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum* por fermentación en estado sólido utilizando papel de desecho, marlo de maíz, cáscaras de soja, pellet de cáscaras de soja y residuos de la cosecha de soja, como soportes, y medio Mandels, en una proporción adecuada para alcanzar el porcentaje de humedad óptimo del sistema. El efecto del soporte sobre la producción de celulasa fue ensayado bajo un diseño factorial completamente aleatorizado. La interacción de los factores soporte-tiempo fue significativa para todas las variables estudiadas. Los soportes fueron caracterizados en términos de absorción de agua y punto de humedad crítico. Las muestras de cultivo fueron analizadas con Microscopía Electrónica de Barrido para visualizar la presencia de esporas y el crecimiento fúngico.

La máxima actividad endoglucanasa fue encontrada a las 96 h utilizando cáscaras de soja como soporte (5914 U L^{-1}). La actividad exoglucanasa fue máxima a las 96 h (4551 U L^{-1}), siendo nueve veces mayor que la obtenida en papel residual al mismo tiempo de fermentación. La máxima actividad β -glucosidasa fue obtenida en cáscaras de soja alcanzándose un valor de 984 U L^{-1} a las 96 h. Además el uso de cáscaras de soja produjo altas productividades volumétricas a cortos tiempos de fermentación, y este hecho disminuye los costos de producción considerando un escalado del proceso.

La velocidad de crecimiento radial (V_r) se evaluó en tres cepas de hongos: *Trichoderma harzianum* T104, *Aspergillus niger* GH1, *Aspergillus niger* NRRL3. Debido a que los

datos de crecimiento radial han sido recolectados a través del tiempo, se llevó adelante un análisis estadístico longitudinal a través de un modelo mixto de medidas repetidas, mediante el software estadístico R. Según el análisis de la estructura de correlación de las medidas de crecimiento de las cepas en el tiempo, se determinó que la mejor alternativa para modelar los datos es la estructura autorregresiva.

El modelo de medidas repetidas considerado, reveló que existe relación entre el tipo de cepa y el tiempo de crecimiento ($p < 0,0001$) para al menos una de las cepas. Evaluando luego los contrastes de a pares de las medidas de crecimiento para cada cepa, se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al crecimiento en el tiempo de las cepas *A. niger* NRRL3 y *A. niger* GH1. *A. niger* GH1 y *A. niger* NRRL3 presentaron valores de V_r superiores a *T. harzianum* T104, siendo cuatro y cinco veces mayor respectivamente.

Se evaluó el efecto del tiempo en la producción de celulasa para el soporte cáscaras de soja bajo un diseño completamente aleatorizado mediante un ANOVA unifactorial para cada una de las variables estudiadas (biomasa, actividad enzimática, proteínas totales, actividad específica, productividad volumétrica, productividad específica). Se observaron diferencias estadísticamente significativas para todas las variables estudiadas en los distintos tiempos ensayados.

Las imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido exhibieron una superficie rugosa de las cáscaras de soja. Se visualizó crecimiento fúngico sobre el soporte. Pudieron observarse hifas, esporas y conidióforos. Las esporas presentaron un rango de 2-3 μm de diámetro.

En el presente trabajo se determinaron la temperatura óptima de actividad endoglucanasa y condiciones de estabilidad frente a pH y temperatura de un liofilizado

comercial de la enzima. La temperatura óptima de la enzima endoglucanasa fue de 50°C y se observó que la endoglucanasa presentó un rango de temperatura de estabilidad entre 30°C y 50°C. Luego de 2 h de incubación la enzima disminuyó su actividad a un pH de 3,00. Por otra parte, se estudió la estructura secundaria de la endoglucanasa de Megazyme (EG) a diferentes valores de pH. Se observó una mayor disminución del contenido de estructura secundaria a pH 5,30 y 6,00 respecto de los otros pH estudiados. Además, se estudió la extinción de la fluorescencia de endoglucanasa nativa (EG) a diferentes valores de pH utilizando acrilamida como quencher. A pH 3,00 disminuyó la accesibilidad o afinidad del *quencher* por la enzima, disminuyendo su capacidad de interaccionar con dominios proteicos de la misma.

En el presente trabajo se abordó el desarrollo de un método de aislamiento y purificación de la enzima producida por *Aspergillus niger* utilizando polímeros de cadena flexible: uno de ellos, sintético y aniónico, polivinil sulfonato de sodio (PVS); el otro natural y catiónico, chitosan (CHS).

Además se estudiaron las mejores condiciones en las cuales ciertos polímeros de cadena flexible producen complejos insolubles con proteínas a través de mediciones de turbidez del medio (absorbancia a 420 nm).

Se analizaron los efectos de la concentración de polímero, concentración de enzima, pH y fuerza iónica del medio, sobre la formación del complejo polímero-endoglucanasa. Se encontraron las relaciones óptimas de masas polímero/endoglucanasa comercial del complejo, y su rango de solubilidad. Se analizó, además, la forma de redisolución del mismo y la posibilidad de solubilizar a la proteína aislada de las impurezas presentes en su fuente natural.

Luego de aplicado el método de precipitación se evaluó el estado funcional de la proteína en el precipitado y en el sobrenadante a través de medidas de actividad enzimática. También se analizaron el rendimiento y el factor de purificación.

Los resultados obtenidos permitieron diseñar un método de aislamiento y purificación de celulasa utilizando precipitación por formación de complejos insolubles sobre un extracto enzimático obtenido a partir del cultivo de *A. niger* en medio sólido, utilizando como fuente de carbono y como soporte de crecimiento desechos agroindustriales.

Se sintetizaron diferentes matrices poliméricas esféricas: esferas de CHS 2,5% P/V en HAc 5% V/V, matriz triturada de CHS 3% P/V en HAc 1% V/V, esferas de CHS entrecruzadas con epíclorhidrina,, esferas de CHS 2% P/V en HAc 5% V/V, CHS 2% P/V entrecruzada con Glutaraldehído 0,5% P/V, esferas de CHS - Eudragit® EPO, esferas de Alginato – Goma Arábica.

Se realizó la caracterización de las mismas mediante microscopía electrónica de barrido, espectrometría infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) utilizando Reflectancia Total Atenuada (ATR) de las matrices y titulación potenciométrica. Se realizaron estudios cinética de adsorción sobre las matrices obtenidas. Se llevó a cabo un estudio de adsorción endoglucanasa de origen fúngico sobre diferentes matrices para evaluar las variables factor de purificación y rendimiento. Según los resultados obtenidos, utilizando la matriz esférica de CHS 2% P/V entrecruzada con Glutaraldehído 0,5% P/V produjo los mayores valores de purificación y rendimiento para la adsorción de endoglucanasa de un cultivo fúngico.

Se realizó un análisis ANOVA Bifactorial (matriz, tiempo) para la variable purificación y rendimiento del proceso de adsorción de la enzima endoglucanasa de origen fúngico con las matrices utilizadas. La interacción matriz-tiempo resultó significativa ($p < 0,001$).

Se obtuvieron membranas de quitosán. Las mismas fueron funcionalizadas con aminoácidos y cobre para mejorar la selectividad de adsorción de endoglucanasa. Las membranas fueron caracterizadas a través de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) para monitorear los cambios químicos. Microscopía electrónica de barrido (SEM) fue realizada para comparar la morfología de la superficie de las membranas obtenidas. Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido fueron realizadas para analizar la estabilidad termal e identificar las diferencias entre las membranas funcionalizadas antes y después de la adsorción. Los resultados de SEM evidenciaron que la funcionalización se produjo dado que la superficie de la membrana de quitosán presentó modificaciones. Los resultados de FTIR-ATR confirmaron una efectiva modificación química de las membranas de quitosán con aminoácidos y cobre y además corroboraron también la adsorción de endoglucanasa. Los parámetros característicos de DSC y TGA evidenciaron la adsorción de la enzima sobre las membranas. La utilización de las membranas funcionalizadas como adsorbentes produjo un incremento en el porcentaje de adsorción endoglucanasa en relación a la membrana de quitosán sin modificar. De acuerdo a estos resultados, las membranas de quitosán funcionalizadas con aminoácidos y cobre podrían representar un novedoso adsorbente de bajo costo para potenciales aplicaciones para purificación de endoglucanasa de sistemas complejos.

Capítulo 1. Introducción

Capítulo 1: Introducción

1.1. Biotecnología y Bioseparación

La biotecnología abarca gran variedad de diferentes aplicaciones, desde las muy simples y tradicionales tales como la producción de cervezas, vino y quesos, hasta las más complejas tales como el uso de las tecnologías del ADN recombinante para producir nuevas drogas o introducir nuevos rasgos en los cultivos comerciales. Su desarrollo ha alcanzado un ritmo importante y está siendo considerada cada vez más como una parte necesaria para el avance tecnológico.

A diferencia de una disciplina única, la biotecnología puede considerarse como un amplio conjunto de campos importantes. En la actualidad la misma debe ocuparse, entre otros temas, de la producción de materiales compatibles con el medio ambiente natural y de la reutilización de materiales orgánicos de desecho generados por la industria en general. De esta forma, se puede impulsar un uso económico a estos residuos, pudiendo contribuir a una transferencia tecnológica que salvaguarde al medio ambiente, promocionando métodos de producción limpios en los cuales los manejos químicos se fusionan con los biotecnológicos. El abordaje de esta problemática es una necesidad básica del desarrollo científico-tecnológico que debe ser considerada.

El uso de procesos mediados por enzimas se remonta a antiguas civilizaciones. Hoy en día se conocen más de 4000 enzimas, y de estas, cerca de 200 presentan interés comercial (Sharma et al. 2001). Las enzimas son ampliamente usadas como reactivos bioquímicos para diagnósticos y en distintas ramas de la industria: alimenticia, farmacéutica, cosmética, frigorífica y curtiembres. Para aislar una proteína de interés es necesario tener en cuenta su aplicación final, la cual determinará su grado de pureza además de su costo comercial. En general el mayor costo de la obtención de una enzima está dado por su proceso de aislamiento y purificación que suele representar desde un 50

hasta un 80% del costo total del proceso. Esto genera, a su vez, una complicación extra puesto que se debe disponer de métodos de producción en macro escala, los cuales, no siguen las mismas leyes de los métodos a escala de laboratorio y necesitan del desarrollo de tecnologías sencillas, con reactivos relativamente económicos.

La mayoría de las enzimas industriales son de origen microbiano, sin embargo en nuestro país son pocas las proteínas que se aíslan de un cultivo bacteriano o se purifican a partir de su fuente natural, motivo por el cual deben ser importadas.

Las enzimas obtenidas a partir de productos naturales se encuentran en muy bajas concentraciones y formando parte de mezclas de composición compleja. Los métodos convencionales de purificación tales como precipitación con sulfato de amonio, solventes, cromatografías de intercambio iónico, consumen demasiado tiempo y pueden originar condiciones adversas que desnaturalizan la proteína y disminuyen en forma significativa el rendimiento del proceso. Los reactivos empleados generalmente no pueden ser reciclados y deben ser descartados al medio ambiente con el consiguiente impacto negativo sobre el mismo (Deutscher 1990). Surge así, un interés por desarrollar métodos separativos que sean eficientes y económicos que permitan la extracción y purificación (*downstream processing*) de grandes cantidades de enzimas desde sus fuentes naturales. La implementación de técnicas sencillas y rápidas no sólo aportaría desarrollo tecnológico y generación de demanda de profesionales de la biotecnología, sino que sustituiría la necesidad de importación.

1.2. Bioseparación de proteínas

La creciente demanda de enzimas aisladas con alto grado de pureza ha impulsado el desarrollo y diseño de procesos bioseparativos para la recuperación de proteínas desde fuentes naturales como animales, vegetales o microorganismos, lo que permite agregar

valor a estos productos. Esta separación que es aplicada al final de un proceso biotecnológico, es la etapa que más influye en el costo del mismo (Lima and Mota 2003). La bioseparación de las enzimas de interés suele realizarse a partir de cualquiera de las distintas fuentes naturales combinando procesos de alta productividad y selectividad.

Un proceso ideal de bioseparación debe combinar alta productividad con alta selectividad de separación. La remoción de impurezas presentes en la muestra debe llevarse a cabo utilizando estrategias que tengan en cuenta las características de las macromoléculas tales como: tamaño, forma, densidad, y carga, trabajando siempre bajo condiciones que no afecten su actividad biológica. Las operaciones unitarias utilizadas para remover impurezas deberán contemplar las mencionadas características estructurales y funcionales de la enzima a ser purificada.

Un protocolo tradicional de un proceso extractivo posee una secuencia de pasos que incluye el enriquecimiento de la biomolécula de interés, la remoción de impurezas, una reducción del volumen total, el aumento de la estabilidad de la molécula con la consiguiente prevención de su degradación.

Cada una de estas etapas pueden estar a su vez constituidas por una o varias operaciones unitarias (Pessoa Junior and Kilikian 2005). Un aspecto importante a considerar al momento de diseñar un protocolo de extracción-purificación, es que el empleo de un gran número de operaciones unitarias en general resulta en un bajo rendimiento del producto de interés debido a pérdidas de material en cada paso separativo y al compromiso de la integridad de la proteína debido a la extensión temporal del proceso.

Debido a ello, el estudio de operaciones unitarias integrativas adquiere una creciente relevancia. Las mismas son operaciones unitarias que permiten la realización de varias etapas de purificación en un solo paso, pudiéndose mencionar como ejemplos a la

adsorción, extracción líquido-líquido, cristalización y precipitación (Low et al. 2007). Estas metodologías son simples, rápidas y económicas, hecho significativo dado que un gran porcentaje del costo del producto final se debe a los procesos de purificación empleados.

1.3. Técnicas que emplean polímeros de cadena flexible

1.3.1. Utilidad de los polímeros de cadena flexible en la bioseparación

Los polímeros sintéticos de cadena flexible como el polietilenglicol, polivinilalcohol, dextrano, han sido exitosamente empleados en la purificación de proteínas utilizando sistemas bifásicos acuosos (Zaslavsky 1994). En los últimos años su utilidad se diversificó a sistemas bifásicos inducidos por temperatura y a precipitación selectiva utilizando polímeros de cadena flexible iónicos, tanto naturales como sintéticos.

Los polímeros de cadena flexible (PCF) que poseen carga eléctrica neta, denominados comúnmente polielectrolitos (PE), forman complejos con las proteínas los cuales pueden volverse insolubles y separarse del resto del medio por simple decantación.

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 (Tsuboi et al. 1996; Patrickios et al. 1999; Gupta et al. 2002). Esta propiedad que poseen los PE es la base de un método de aislamiento y purificación de biopolímeros por precipitación (Wang et al. 1996).

Un número importante de estudios han sido llevados a cabo sobre la formación de estos complejos en medio acuoso (Lali et al. 2000; Gupta et al. 2002; Manzur et al. 2007).

Las técnicas más empleadas para estudiar estos sistemas son: turbidimetría, viscosidad dinámica, espectroscopía de fluorescencia y de dicroísmo circular, calorimetría de

titulación isotérmica, y en el caso de ser enzimas se evalúa simultáneamente, la actividad biológica con el sustrato correspondiente (Cooper et al. 2005).

Una amplia variedad de polielectrolitos han sido utilizados para precipitar ácidos nucleicos (Dissing and Mattiasson 1996) (polietilenimina) y proteínas (Patrickios et al. 1999; Lali et al. 2000) (poliacrilatos, carboximetilcelulosa, polivinilsulfonato, etc.). El uso es restrictivo a casos específicos, debido a que el mecanismo de formación del complejo polielectrolito-proteína está condicionado a la presencia de cargas opuestas en cada componente, lo que implica tener en cuenta sus pI, así como el pH que mantiene la estabilidad de la enzima y su actividad catalítica (Pessoa Junior and Kilikian 2005).

1.3.1.1. Polímeros de cadena flexible

Un gran número de materiales están constituidos por polímeros, muchos de los cuales son irremplazables en el actual mundo tecnológico. Éstos han originado un impacto social y ambiental que ha acarreado consecuencias tanto positivas como negativas. La inadecuada eliminación de los polímeros contribuye en buena parte a la contaminación ambiental por acumulación de basura. La imposibilidad de la biodegradación, como ocurre con los plásticos, impide su eliminación en relleno sanitario y además disminuye notablemente el desarrollo de colonias bacterianas en su entorno. Su incineración puede generar compuestos venenosos, por ejemplo HCl (g) y HCN (g).

Los polímeros pueden ser de tres tipos:

- ✓ ***Polímeros naturales:*** provenientes directamente del reino vegetal o animal. Por ejemplo: celulosa, almidón, proteínas, caucho natural, ácidos nucleicos, etc.

- ✓ **Polímeros artificiales:** son el resultado de modificaciones, mediante procesos químicos, de ciertos polímeros naturales. Ejemplos: nitrocelulosa, etonita, etc.
- ✓ **Polímeros sintéticos:** son los que se obtienen por procesos de polimerización controlados a partir de materias primas de bajo peso molecular. Ejemplos: nylon, polietileno, cloruro de polivinilo, etc.

Muchos elementos (el silicio, entre otros) forman también polímeros, llamados polímeros inorgánicos.

La Figura 1.1 muestra la clasificación de los polímeros, tanto naturales como sintéticos, según los grupos ionizables en sus restos monoméricos:

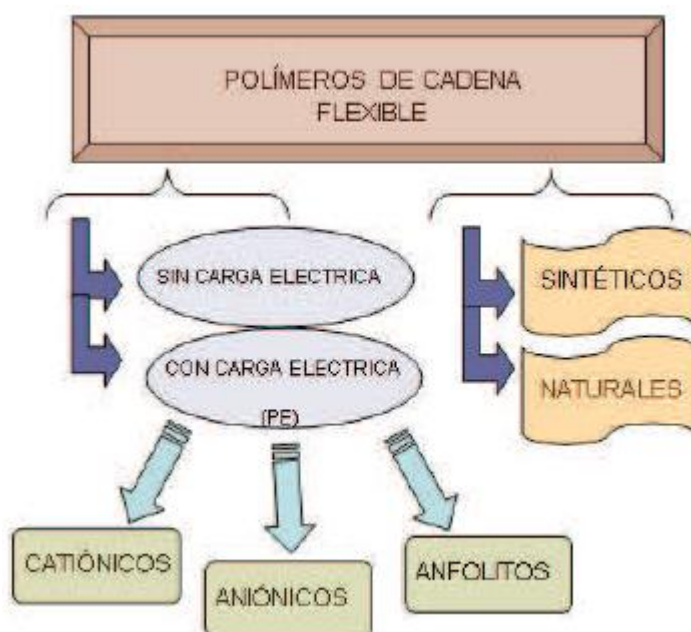


Figura 1.1: Clasificación de los polímeros de acuerdo a su carga y origen

1.3.1.2. Precipitación de proteínas usando polielectrolitos

Gran parte de los procedimientos tradicionales de purificación de proteínas incluyen, al menos, una etapa de precipitación. Para mezclas con alta cantidad de contaminantes y que poseen baja concentración de la proteína de interés, puede ser un método efectivo

de concentración, y en algunos casos, puede actuar como etapa única de purificación, dependiendo del grado de pureza final pretendido (Pessoa Junior and Kilikian 2005).

En la última década la amplia variedad de polímeros sintéticos ha permitido el desarrollo de técnicas de purificación de biopolímeros por formación de complejos insolubles bajo ciertas condiciones experimentales. La Figura 1.2 muestra el equilibrio de formación del complejo insoluble.

Las ventajas de la aplicación de la precipitación con polielectrolitos para la concentración y la purificación de proteínas, ácidos nucleicos o pequeños metabolitos son:

- ✓ la facilidad de aplicación a gran escala
- ✓ el requerimiento de equipos relativamente simples
- ✓ la gran diversidad de precipitantes de bajo costo que pueden ser utilizados y además, requeridos en bajas concentraciones
- ✓ la alta afinidad que permite que un gran número de proteínas se unan a una única molécula de polímero
- ✓ la facilidad de disociación por cambios en la fuerza iónica o el pH del medio
- ✓ la rapidez del proceso que permite preservar la conformación del biopolímero aún luego de la redisolución del complejo insoluble

Para hacer que el proceso sea efectivo la proteína debe recuperarse del complejo insoluble. La situación más conveniente sería conseguir que el complejo se disocie, conservando la actividad biológica de la enzima y reciclando el PE al proceso (Menkhaus et al. 2002).

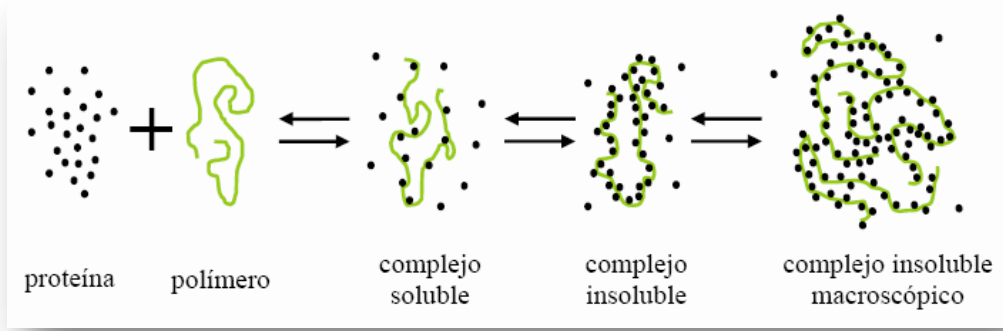


Figura 1.2: Equilibrio de formación de complejos entre polímero y proteína.

Los polielectrolitos forman complejos con las proteínas, simplemente por diferencia de carga eléctrica, es decir, por fuerzas netamente electrostáticas. Estos complejos pueden ser solubles o insolubles y una molécula de polielectrolito puede estar interaccionando con varias moléculas de proteína. Los cambios en la solubilidad se pueden lograr modificando la fuerza iónica del medio y su pH (Weinbreck et al. 2003). La ecuación siguiente muestra la relación que existe entre la densidad de carga de una proteína con el pH del medio:

$$\sigma = \frac{\partial \sigma}{\partial pH} (pH - pI) \quad (1.1)$$

Se ha postulado la siguiente ecuación de estado para la interacción entre una macromolécula y un polielectrolito (Mattison et al. 1998) :

$$\xi \sigma \cong a \kappa \quad (1.2)$$

donde σ y ξ son la densidad de carga superficial de la proteína y del PE, respectivamente y a es una constante que depende de cada sistema polímero-proteína. Por otra parte la ecuación (1.3) muestra que κ , la constante de Debye-Hückel, es altamente dependiente de la fuerza iónica (μ)

$$\kappa \propto \mu^{1/2}$$

(1.3)

Las ecuaciones demuestran que cambiando las condiciones del medio, tales como pH y fuerza iónica se puede precipitar, redissolver o disociar el complejo para liberar del mismo la proteína de interés (Patrickios et al. 1999). Si bien se conocen ecuaciones de estado que describen la conducta de estos sistemas, no está muy claro el mecanismo molecular mediante el cual las proteínas interactúan con los PCF o con PE (Izumrudov et al. 1998).

Debido a la fuerte dependencia del pH con la fuerza iónica (μ), se asume que generalmente la formación del complejo se debe a una fuerte contribución de interacciones electrostáticas entre la proteína y el polielectrolito.

En nuestro grupo de investigación se ha medido el calor de interacción del polivinilsulfonato con proteínas (Romanini et al. 2007) por técnicas de calorimetría de titulación isotérmica. Los resultados han demostrado que el calor liberado cuando una muestra de proteína es titulada con una solución del polímero se debe a la fuerte interacción electrostática entre el polielectrolito y la proteína cuando se forma el complejo.

1.3.1.3. Diseño de un método de precipitación de proteínas con un PE

Un método efectivo de aislamiento y purificación de proteínas utilizando polímeros de cadena flexible con carga eléctrica consta básicamente de tres etapas, tal como se muestra la Figura 1.3. Al final del proceso se debe evaluar el estado conformacional y la actividad de la proteína para la validación del método en cuanto a su efectividad, considerando el factor de purificación y el rendimiento.

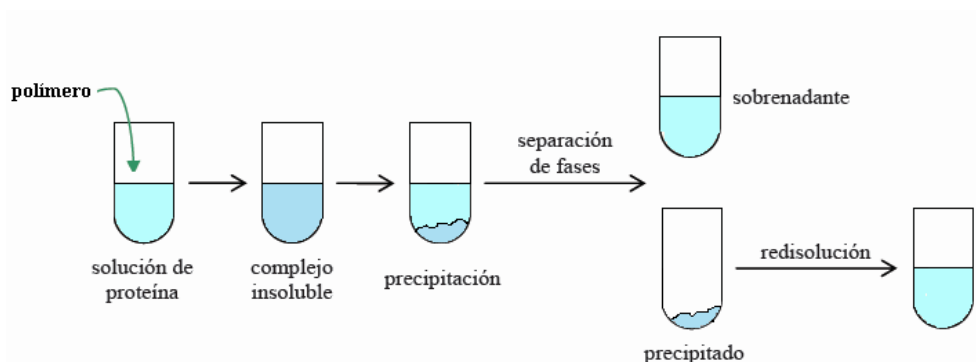


Figura 1.3: Esquema de purificación de proteínas utilizando polielectrolitos.

1.3.2. Técnicas bioseparativas que emplean matrices poliméricas insolubles

La utilización de matrices poliméricas insolubles como adsorbentes enzimáticos es una técnica novedosa que permite la retención específica de enzimas provenientes de un extracto natural de composición compleja de modo rápido y económico. Posee la ventaja de poder emplear polímeros de cadena flexible naturales que no impactan negativamente en el medio ambiente para la preparación de las matrices. Algunos de estos polímeros en solución acuosa presentan propiedades fisicoquímicas sumamente interesantes que los hacen aplicables en el campo biomédico y biotecnológico. Esta técnica reemplaza varios pasos extractivos tradicionales lo que permite disminuir costos de producción.

1.3.2.1. Adsorción

La adsorción es el proceso mediante el cual un sólido poroso es capaz de retener partículas de un fluido en su superficie tras entrar en contacto con el mismo. El sólido en cuya superficie se produce la adsorción se denomina adsorbente o sustrato y las partículas del fluido que se adsorben se denominan adsorbato.

La adsorción sobre los sólidos se clasifica en adsorción física (fisiosorción) y adsorción química (quimiosorción) aunque no hay una clara división entre las mismas. En la

adsorción física, el adsorbato se mantiene unido a la superficie del adsorbente por medio de fuerzas de van der Waals relativamente débiles. En la quimiosorción se produce una reacción química en la superficie del adsorbente y el adsorbato se mantiene unido a través de enlaces químicos relativamente fuertes (Castellan and Basín 1987).

La adsorción física no es específica mientras que la quimiosorción es similar a las reacciones químicas ordinarias en cuanto a su elevada especificidad.

Los valores de entalpía en ambos casos son valores negativos, teniendo un mayor valor absoluto (más negativo) los casos de quimiosorción. Para este tipo de adsorción la mayor liberación de energía se debe a la ruptura y formación de enlaces químicos como por ejemplo los enlaces de hidrógeno. Esto también explicaría que los valores del cambio de entalpía puedan ocasionalmente ser positivos tal como ocurre en las reacciones químicas ordinarias.

El proceso de adsorción implica un ordenamiento del adsorbato y una reducción de sus grados de libertad, por lo que es de esperar que los cambios de entropía asociados a este tipo de procesos sean negativos.

La adsorción consta de la realización secuencial de 4 etapas. La primera de ellas es la llamada “adsorción” o “contacto”, en la cual el adsorbato se une a la matriz de adsorbente mediante los procesos de fisiosorción o quimiosorción según sea el mecanismo por el cual se lleva a cabo el proceso. Luego le sigue la etapa de “lavado” en la cual se elimina el material no adsorbido en la matriz mediante el contacto de ésta con el *buffer* de lavado. Finalizada la etapa de lavado le sigue la “desorción” o “elución”, en la cual se pone en contacto el adsorbente con una solución *buffer* de pH y fuerza iónica adecuada el cual puede contener también competidores del adsorbato por los sitios de unión de éste con la matriz. La función de esta etapa es la de favorecer el pasaje del adsorbato a la solución buffer para que pueda ser eluído y recuperado. Finalmente la

última etapa es la de “regeneración de la matriz” mediante lavado de la misma de los residuos del eluyente para retornar a la misma a la situación inicial (McCabe et al. 2007). El esquema simplificado de los pasos se presenta en la Figura 1.4.

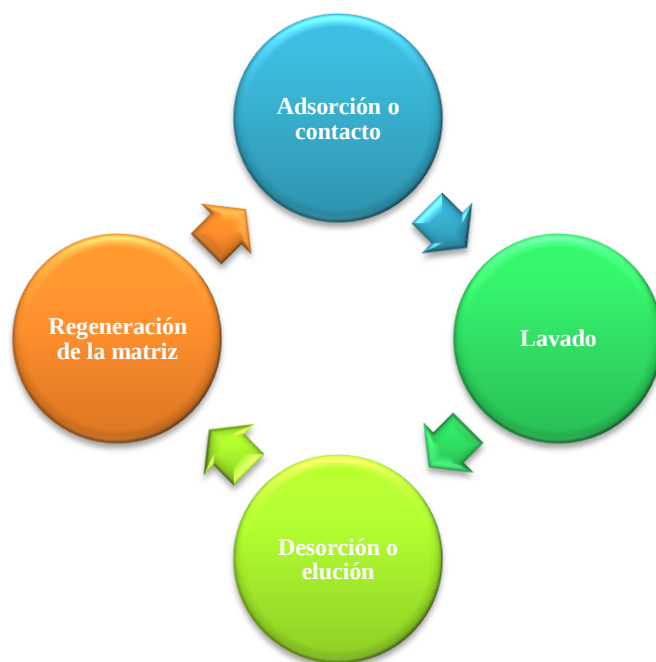


Figura 1.4: Esquema del proceso de adsorción

1.4. Polímeros utilizados en este trabajo

1.4.1. Polivinil sulfonato de sodio (PVS)

El polivinil sulfonato es un polímero sintético, aniónico (con una pKa cercano a 1), hidrofílico, color ocre; muy tóxico e irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.

Su unidad monomérica repetitiva se representa en la Figura 1.5, donde “n” es el número de unidades monoméricas.

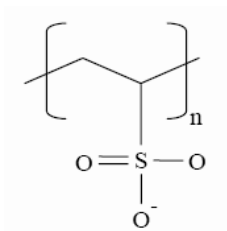


Figura 1.5: Estructura química del polivinil sulfonato.

○ ***Síntesis del polivinil sulfonato de sodio***

Se sintetiza por polimerización de la sal vinil sulfonato de sodio en condiciones de radicales libres siguiendo el procedimiento de Rivas y Schiappacasse (Moad et al. 2008). El proceso se lleva a cabo a 60°C con purga de nitrógeno durante 48 h, usando APS como iniciador. El polímero obtenido se trata con HCl 3 M para dar polivinil sulfonato de sodio y NaCl, luego se purifica por diálisis.

○ ***Aplicaciones del PVS***

El polivinil sulfonato es de alta utilidad tanto a nivel industrial como en el laboratorio de investigación. En la industria se usa como agente dispersante que previene el depósito, precipitación y/o aglomeración de partículas en medio fluido. Actúa como floculante separando iones como zinc, cobre, hierro, cadmio, cromo, níquel, bario, calcio, manganeso y metales pesados; nocivos para el medio ambiente. Evita que se formen depósitos durante los procesos de enfriamiento, intercambio de calor y en hervidores. Es una excelente base para la fabricación de resinas de intercambio iónico usadas en la suavización del agua. También se utiliza en pasos intermedios en el tratamiento de papel para mejorar el recubrimiento o el engomado.

A nivel de laboratorio, se utiliza para la producción de hidrogeles y para la fabricación de conductores electrónicos con matriz polimérica. Además, se usa para fabricar matrices de cromatografías de intercambio iónico y para recubrir capilares para

espectrometría de masa, lo que mejora la separación de los péptidos y la reproducibilidad de los tiempos de migración (Catai et al. 2007; Gu et al. 2007).

En la actualidad, el PVS se está estudiando como un potencial agente terapéutico contra los virus HIV-1 y HIV-2 ya que inhibe la adsorción del virus sobre la superficie celular en concentraciones que no son tóxicas para la célula (Mohan et al. 1992).

1.4.2. Chitosán (CHS)

El chitosán es un biopolímero biodegradable, biocompatible y muco adhesivo, el cual juega papel importante como material en muchos propósitos en la industria farmacéutica, médica, alimentaria, de síntesis orgánica y biológica.

Es un polisacárido lineal que consiste de enlaces β (1 $\rightarrow$ 4) entre unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa y 2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranososa. Es obtenido por desacetilación alcalina de la quitina Poli- β (1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa (Figura 1.6). La quitina es un polisacárido duro, inelástico y nitrogenado que se encuentra en las paredes de algunos hongos y en el exoesqueleto de artrópodos tales como insectos, escarabajos y crustáceos. El chitosán se caracteriza por su grado de acetilación (GA), que es la relación promedio de las unidades de N-acetil-D-glucosamina dentro de la cadena macromolecular (Desbrieres 2002).

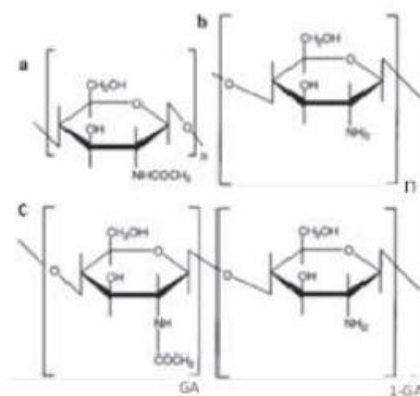


Figura 1.6: Estructura química de a) quitina b) chitosán c) chitosán comercial

GA: grado de acetilación.

Las condiciones de hidrólisis y de la fuente del cual provenga influyen en las características del chitosán que se produce, generando un amplio rango de pesos moleculares (típicamente de 70 kDa a más de 1.000 kDa) y el grado de desacetilación (normalmente entre 50 y 100%). El grado de acetilación (%GA) puede ser determinado por espectroscopía RMN (LeHoux and Dupuis 2007). Por lo tanto, el chitosán es un nombre colectivo que representa una familia de quitinas N-acetiladas con diferente grado de desacetilación. En general, cuando el número de residuos de N-acetilglucosamina es superior a 50%, el polímero se denomina quitina mientras que cuando el número de residuos de N-glucosamina es superior, se lo nombra chitosán. El chitosán tiene tres tipos de grupos funcionales: un grupo amino y dos hidroxilos en las posiciones de C-2, C-3 y C-6, respectivamente. Estos grupos permiten la introducción de modificaciones química entre las que se incluyen acilación, alquilación, formación de base de Schiff, O-carboximetilación, N-carboxialquilación y copolimerización (Shi et al. 2006).

La amplia variedad de aplicaciones comerciales y biomédicas que presenta el chitosán deriva de sus características químicas, ya que es un poli-cación en soluciones neutras y ácidas con un pKa de 6,0, además de la posibilidad de realizar modificaciones químicas en la molécula (Desbrieres 2002). Por ejemplo, algunos estudios mostraron que las moléculas de 25 a 50 kDa son eficientes en el tratamiento de las úlceras de estómago y, en modelos de ratones en la prevención del crecimiento tumoral a través de funciones inmunes del intestino. Las moléculas de 28 kDa se usaron como nanopartículas para liberación controlada de drogas en la industria farmacéutica mientras que las de bajo peso molecular (≈ 2 kDa) mostraron tener propiedades antifúngicas en aplicaciones para

la agricultura. En terapia génica, el chitosán de 400 kDa es un vehículo empleado en las vacunas de ADN para la desensibilización de los alérgenos al maní en ratones (LeHoux and Dupuis 2007). Protege al ADN de la degradación por nucleasas dando una alta eficiencia de transfección. Permite el transporte de drogas polares a través de las superficies epiteliales, siendo además biocompatible y biodegradable.

1.4.3. Eudragit®EPO

Los polímeros Eudragit® (polimetacrilatos) que son producidos por Evonik son polímeros sintéticos catiónicos o aniónicos de dimetil-aminoetilmetacrilatos, ácido metacrílico, y ésteres de ácido metacrílico en relaciones variables. Los polímeros de polimetacrilato han sido ampliamente utilizados en formulaciones farmacéuticas, como agente de revestimiento de películas y como *carriers* de matrices en preparaciones de dispersiones sólidas (Jeganathan and Prakya 2015).

Eudragit®EPO (EPO) es un polímero catiónico que tiene una masa molecular de aproximadamente 150.000, se prepara por copolimerización de metacrilato de butilo, 2-dimetilaminoetilmetacrilato, y metacrilato de metilo. La proporción de dimetilaminoetil Metacrilato, metacrilato de butilo y metacrilato de metilo es de aproximadamente 2: 1: 1 (Jeganathan and Prakya 2015). La Figura 1.7 muestra la estructura química del Eudragit®EPO.

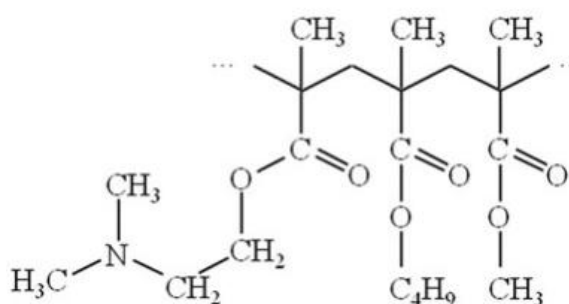


Figura 1.7: Estructura química del Eudragit®EPO

1.4.4. Alginato

Los alginatos (ALG) son polímeros de abundancia en la naturaleza y se encuentran principalmente como componentes estructurales en las algas pardas marinas (donde pueden llegar a representar el 40% de su peso seco) y como polisacáridos en las cápsulas de las bacterias del suelo (Sankalia et al. 2007).

Se trata de una familia de copolímeros lineales compuestos por bloques de ácido β -D-Manúronico (M) y α -L-gulurónico (G) unidos por enlaces (1,4). Los bloques pueden estar compuestos de residuos G consecutivos, residuos M consecutivos o residuos M y G alternados (Figura 1.8). Dependiendo la fuente de la cual se extrae el ALG, el mismo posee diferente contenido de M y G como así también posee diferencias en el largo de los bloques (Lee and Mooney 2012).

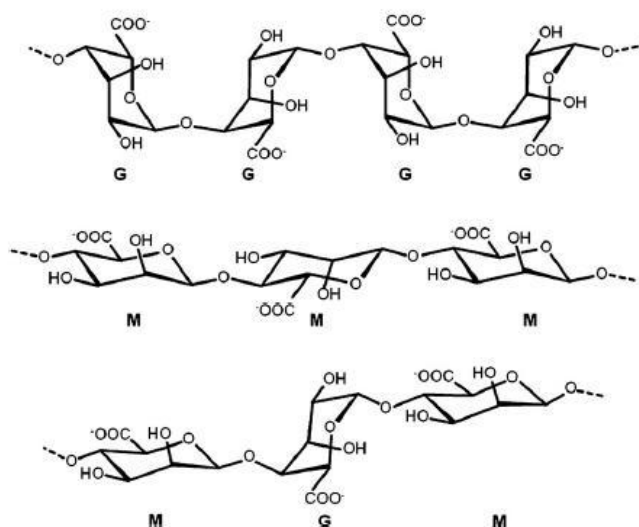


Figura 1.8: Estructura química del bloque G, bloque M y bloque alternado en el Alg.

El peso molecular de los ALG varía entre 32 y 400 kDa. Si bien su solubilidad en agua se verá afectada por la fuerza iónica del medio, que ejercerá un efecto importante especialmente en la extensión de la cadena del polímero y en su viscosidad (Steinbüchel

and Rhee 2005), el factor que afecta principalmente a la solubilidad del mismo es el pH del solvente, que determinará la presencia o no de cargas en los residuos que lo componen. Las constantes de disociación de los monómeros de los ácidos manurónicos y gulurónicos son de 3,38 y 3,65 respectivamente. Por lo tanto, los ALG tienden a estar cargados negativamente en un amplio rango de pH (Harnsilawat et al. 2006).

El ALG es soluble en agua a pH mayores a 3,50, mientras que a pH menor a 3,00 forma hidrogeles debido a la protonación de los grupos carboxilo (Lee and Mooney 2012). También posee la capacidad de formar geles en presencia de cationes divalentes como el Ca^{2+} , que puede coordinarse con dos cadenas simultáneamente en un proceso de gelificación ionotrópica o entrecruzamiento iónico.

Esta capacidad de los ALG de hidratarse en agua dando lugar a soluciones viscosas, dispersiones o geles permite utilizarlos como espesantes, estabilizantes, gelificantes y formadores de películas. También se ha encontrado que son muy útiles para la bioseparación de proteínas, estando en su forma gelificada (Spelzini et al. 2011; Gombotz and Wee 2012) o en solución (Teotia et al. 2001; Harnsilawat et al. 2006; Fabian et al. 2010). Además, tienen múltiples aplicaciones en la remoción de contaminantes del agua (Zhang et al. 2013).

La industria alimentaria hace amplio uso de los ALG ya que son polímeros comestibles que prácticamente carecen de sabor. Se utilizan por ejemplo para obtener piezas de fruta para su uso en repostería, o incluso piezas con forma definida como aros de cebolla o guindas. También se emplean en la fabricación de aceitunas rellenas de anchoa o de pimiento.

Asimismo, son utilizados en la industria farmacéutica para el delivery de drogas (Damelin et al. 2015; Diós et al. 2015; Sookkasem et al. 2015). Son bien tolerados en contacto con la piel, refrescantes y lubricantes. Además, se incorporan en jabones y

cremas de afeitar como suavizantes y estabilizantes de espuma. Otros usos de los ALG son en soldaduras, vendajes bioactivos, moldes dentales, dispensadores de herbicidas, entre otros (Harris 1969; Hondrum and Fernandez 1997; Kulkarni et al. 2000).

Por último, este polímero posee las ventajas de estar ampliamente disponible, ser biodegradable y no tóxico.

1.4.5. Goma Arábiga

La Goma Arábiga es un polisacárido de origen natural que se extrae de la resina que se recoge a mano de Acacias que crecen en regiones áridas y es uno de los emulsionantes más antiguos conocidos. GA se utiliza en gran medida en varias industrias, por ejemplo, para fijación de sabores, en confiterías, panaderías, productos farmacéuticos, cosméticos, adhesivos, como en la industria de refrescos como estabilizador de concentrados de emulsión de aceite cítrico y como agente en la fabricación de cerveza. GA es hidrofílico y se disuelve fácilmente hasta el 50% (P/V) cuando se agita con agua, dando soluciones de baja viscosidad, contrariamente a lo que ocurre con las otras gomas industriales.

La GA cruda es ácida (pH 4,50-5,00) y contiene calcio, magnesio, potasio, así como 2% de proteínas (ricas en prolina, hidroxiprolina y serina), que forman el núcleo central de la molécula, y una capa de carbohidrato complejo basada en unidades de galactosa β -1,3 enlazadas

La masa molecular de GA es altamente heterogénea, que va desde unos pocos cientos de miles a varios millones de Daltons, dependiente de su grado de reticulación. En su forma normal ionizada cercana a valores neutros de pH, los grupos carboxil del ácido urónico se desprotonan resultando una repulsión de Coulomb causando que la GA adopte una estructura abierta, una estructura expandida (Tiss et al. 2001).

1.5. Celulasas

La celulasa es una enzima compleja especializada en descomponer celulosa transformándola en múltiples monómeros de glucosa (Figura 1.9). Pertenece a la familia de las glicosil hidrolasas y es una mezcla de diversos componentes enzimáticos, formando lo que se llama “complejo enzimático”. Este complejo está compuesto por 3 tipos de enzimas, según el sitio en el que cortan la fibrilla de celulosa:

- Endoglucanasa (EG) o endo-1,4- β -D-glucanasa (EC 3.2.1.4): escinde de forma azarosa los enlaces internos β -1,4 sobre las regiones de celulosa amorfa, alterando así la estructura cristalina. Genera oligosacáridos de diferentes tamaños (glucosa, celobiosa y celotriosa) y, por lo tanto, nuevas cadenas terminales.
- Celobiohidrolaza (CBH) o exo-1,4- β -D-glucanasa (EC 3.2.1.91): escinde de a dos o cuatro unidades de glucosa desde los extremos de las cadenas expuestas producidas por la endoglucanasa, produciendo tetrasacáridos o disacáridos como la celobiosa.
- β -D-glucosidasa (BG) o β -D-glucósido glucohidrolasa (EC 3.2.1.21): degrada los gluco-oligosacáridos a monómeros de glucosa.

Mediante un mecanismo de hidrólisis catalítica, todos los componentes de la celulasa producen la rotura del enlace β -1,4-glicosídico del polímero celulósico, aunque cada uno de ellos actúa de forma específica (Walker and Wilson 1991).

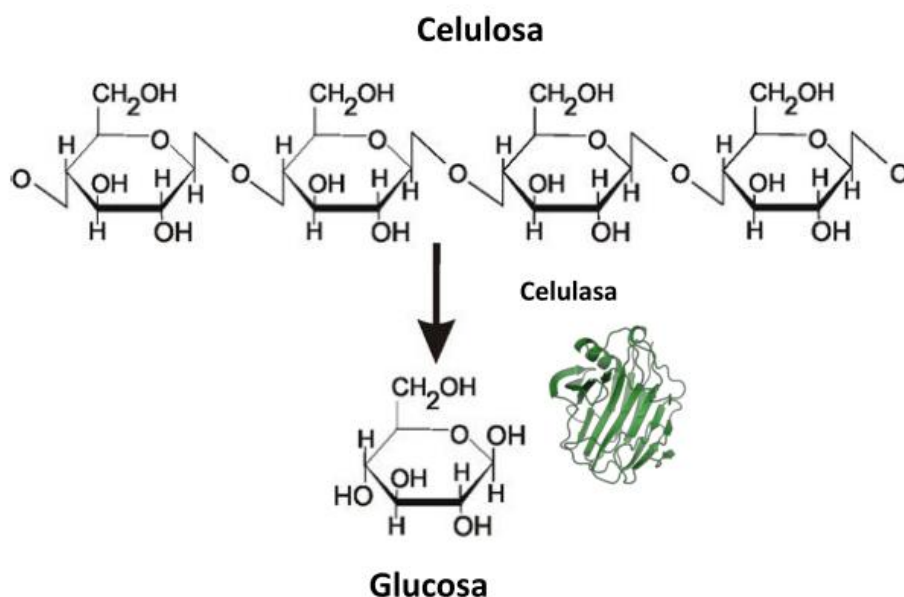


Figura 1.9: Estructura y degradación de la celulosa

1.5.1. Mecanismo de catálisis

Para la efectiva digestión de la celulosa las enzimas fúngicas han evolucionado mecanismos sinérgicos (Henrissat et al. 1985). Este fenómeno se refiere a la observación de que la actividad máxima de degradación de la celulosa no se da por enzimas individuales, sino por mezclas de tres o más enzimas (Nidetzky et al. 1994).

La celulosa es atacada inicialmente por la endoglucanasa, la cual se liga al azar sobre las microfibrillas de celulosa en regiones amorfas, produciendo hidrólisis de los enlaces β -1,4 glucosídicos, y generando así múltiples sitios de ataque para las exo-1,4- β -D-glucanasas, las cuales actúan sobre los extremos no reductores de la cadena, escindiendo una unidad de celobiosa. Existe una cooperación continua entre la acción de ambas enzimas y la de la β -glucosidasa, la cual actúa sobre la celobiosa o también sobre pequeños oligómeros, produciéndose así moléculas de glucosa. El resultado de la acción de estas tres actividades enzimáticas es la degradación sinérgica de la celulosa como se muestra en la Figura 1.10 (Montoya Barreto)

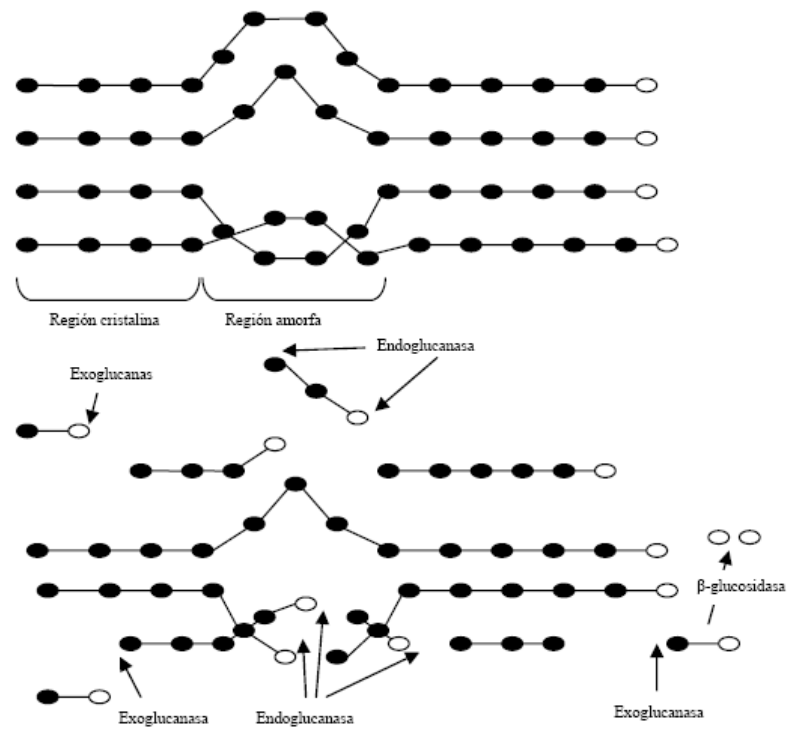


Figura 1.10: Representación del modo de acción de las celulasas (glucosa: ○)

1.5.2. Relación estructura – función de celulasas

La mayoría de las celulasas fúngicas tienen una estructura de dos dominios, con un dominio catalítico y un dominio de unión a celulosa, que están conectados por un enlazador flexible o bisagra (Figura 1.11). Esta estructura está adaptada para trabajar en un sustrato insoluble (Lynd et al. 2002)

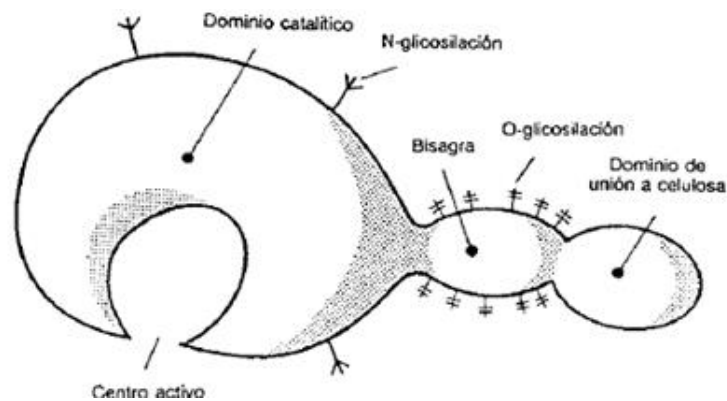


Figura 1.11: Modelo de estructura tridimensional de una enzima celulolítica

Los núcleos catalíticos pueden actuar como entidades independientes conservando intacta su capacidad para hidrolizar sustratos solubles; en cambio, disminuye drásticamente su actividad sobre celulosa nativa, de lo que se dedujo que el núcleo contiene el centro activo de la enzima, pero no el sitio de unión a celulosa (Larumbe 1992).

La función de la bisagra glicosilada es la de conectar el núcleo catalítico y el dominio de unión a celulosa. Se trata de un nexo flexible lo que ha impedido la cristalización de celulasas intactas. Es una región rica en prolina y aminoácidos hidroxilados. Estos últimos están fuertemente glicosilados, y las prolina intercaladas pueden ayudar al empaquetamiento de las cadenas de azúcares (Rouvinen et al. 1990).

1.5.3. Celulasas en la industria

La biotecnología de las celulasas empezó al principio de los años 80, primero en la alimentación animal seguida por aplicaciones en la industria de alimentos. Posteriormente estas enzimas empezaron a usarse en las industrias de lavandería, textil y del papel. En las últimas dos décadas su uso se ha incrementado en forma

considerable y actualmente representan cerca del 20% del mercado mundial de las enzimas (Ponce and Pérez 2002).

En la industria textil las celulasas juegan un papel muy importante en el desteñido de mezclilla ya que se usan para remover el color azul índigo y dar una apariencia de desteñido/deslavado (*biostoning-biobleaching*) (Ponce and Pérez 2002; Torrez et al. 2010). Tradicionalmente el desteñido de este tipo de prendas se efectuaba con piedra pómez (*stone wash*).

Una pequeña cantidad de enzima puede sustituir varios kilos de piedras. Con la reducción de las piedras se produce menos daño a las telas, menos desgaste de las lavadoras y menos polvo de piedra pómez en el ambiente de la lavanderías. El *biostoning* ha abierto nuevas posibilidades en el acabado de tela vaquera, aumentando la variedad de tratamientos de acabado. También se incrementa la productividad del proceso de deslavado, ya que las lavadoras contienen menos piedras y más prendas (Ponce and Pérez 2002; Torrez et al. 2010).

Por otro lado, las celulasas se añaden a los detergentes quita pelusas, la enzima degrada las microfibrillas que se separan parcialmente de las fibras principales, restituyendo a las fibras una superficie suave y a la prenda su color original (Ponce and Pérez 2002).

Dentro de la industria alimentaria, se usan para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites comestibles, etc. Asimismo se usan en la hidrólisis parcial de materiales lignocelulósicos para mejorar la digestión de rumiantes. Por otra parte, los dominios de unión a celulosa se han usado con gran éxito sobre una matriz de celulosa para facilitar la purificación de proteínas recombinantes (Ponce and Pérez 2002).

1.5.4. Celulasa de *Aspergillus niger*

En los últimos años ha aumentado notablemente el número de trabajos presentados sobre la producción de enzimas de *Aspergillus niger*. Este hongo puede secretar grandes cantidades de celulasas diferentes, y se lo reconoce como a uno de los microorganismos más eficientes a la hora de degradar la celulosa (Li et al. 2012).

Los *Aspergillus* son miembros ubicuos de la microflora del aire, materia en descomposición, etc. *Aspergillus niger*, como sugiere su nombre es un hongo negro denominado comúnmente “el moho negro”. Esta especie filamentosa es de interés industrial, ampliamente utilizada en la producción de una gran variedad de glucanasas con un espectro tal que puede lograrse la degradación completa de la celulosa. A su vez muestra algunas ventajas para la producción industrial ya que tiene un alto nivel de producción y presenta buenas propiedades para el cultivo lo que posibilita la producción a gran escala. Además, sus productos son considerados como GRAS (generally regarded as safe) ya que permite su aplicación en la industria de alimentos tanto para el hombre y animales. Las esporas de estos hongos pueden sobrevivir varios años en las condiciones adecuadas. Sin embargo, cada vez resulta más claro que muchas esporas contienen enzimas que permiten expresar un amplio rango de actividades, muchas de las cuales pueden ser utilizadas comercialmente. Las esporas de *Aspergillus niger* poseen la ventaja de ser estables, pueden ser transportadas y luego utilizadas como un conveniente catalizador biológico. El medio requerido es sencillo, constituido solamente por un tampón con o sin glucosa añadida. Cualquier espora que no germine puede ser utilizada posteriormente.

La celulasa (endoglucanasa) de *Aspergillus niger* empleada en este trabajo posee un peso molecular que puede ir desde los 26 KDa hasta 40 KDa y que puede variar según

el tipo de endoglucanasa y/o el microorganismo que la produzca. Lo mismo ocurre con su punto isoeléctrico (pI) variable entre 4,00 y 5,00.

1.6. Técnicas para estudiar la estructura secundaria y terciaria de la endoglucanasa

1.6.1. 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 prostéticos. 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 and Price 1996).

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 et al. 2000; Sreerama and Woody 2000; Khrapunov 2009).

Aún 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.

En la región del ultravioleta cercano (250 a 350 nm), los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptófano, tirosina, y fenilalanina. Ya que la asimetría en estos grupos químicos se debe exclusivamente a su entorno, y

como los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína. Por lo tanto, las señales en esta región son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación.

Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano (180 a 250 nm) se deben principalmente a los enlaces peptídicos 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 presentes, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices α , hojas β , giros y otros tipos estructurales) (Fasman and Price 1996).

1.6.2. 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). La fenilalanina posee un rendimiento cuántico muy bajo, además su espectro de emisión de fluorescencia se superpone con el espectro de excitación de la tirosina, esto hace que no pueda detectarse la emisión de fenilalanina porque ocurre un proceso de transferencia de energía hacia la tirosina. Una solución de tirosina posee un espectro de excitación con un máximo a 278 nm y emite fluorescencia a 303 nm (para el

aminoácido libre), siendo esta emisión poco sensible al cambio de la polaridad del entorno. Sin embargo, la emisión del triptófano es muy sensible a cambios en su entorno, por lo tanto, el mismo puede ser empleado como una sonda óptica interna para detectar cambios conformacionales que ocurren en sus proximidades. La posición del pico de emisión es un parámetro que da una idea del carácter polar del entorno del triptófano (Lakowicz 1983).

El proceso de “quenching de la fluorescencia” se refiere al proceso de disminución ó extinción de la intensidad de la fluorescencia de un fluoróforo, debido a reacciones en el estado excitado, transferencia de energía, formación de complejos, etc. En general el término quenching de la fluorescencia se emplea para señalar el efecto que producen determinadas sustancias en el medio, denominadas “quenchers” ó extintores de la fluorescencia ejemplos de ello son O₂, I⁻, ó acrilamida. La extinción de la fluorescencia puede ser un proceso estático ó dinámico, en ambos casos requiere del contacto molecular entre el fluoróforo y el extintor, revelando así la accesibilidad al fluoróforo y la velocidad de difusión del extintor. En el caso del proceso de extinción dinámico ó colisional, el extintor debe difundir hacia el fluoróforo durante el tiempo de vida del estado excitado, después del contacto el fluoróforo retornará al estado basal sin la emisión de un fotón, es decir sin emitir fluorescencia.

La ecuación de Stern-Volmer relaciona la extinción de la fluorescencia de un fluoróforo con la concentración del extintor, describiendo así la extinción colisional como se indica a continuación:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_{sv} [Q]$$

(1.4)

representando F_0 y F a la fluorescencia emitida por la proteína en ausencia y en presencia del extintor respectivamente, $[Q]$ la concentración del extintor y k_{sv} la constante de Stern-Volmer que es función del producto del tiempo de vida media del fluoróforo y la constante cinética de extinción bimolecular (k_q), en otras palabras es la constante cinética de difusión del extintor hacia el fluoróforo. Ésta, además de depender de la temperatura y de la viscosidad del medio, es altamente dependiente de la accesibilidad que presente el fluoróforo al extintor. Dado que el extintor, generalmente acrilamida ó ioduro de sodio, se encuentran en solución acuosa, el valor de k_q dependerá directamente de la accesibilidad del solvente a los restos de triptófanos de la proteína.

El gráfico de Stern-Volmer permite calcular la constante de Stern-Volmer (k_{sv}), de la pendiente de dichos gráficos. Cuando el gráfico es lineal, indica generalmente la existencia de una única población de fluoróforos, todos igualmente accesibles al extintor.

Si dos poblaciones de fluoróforos están presentes y una de ellas no es accesible al extintor, la gráfica de Stern-Volmer se desvía de la linealidad curvándose hacia el eje de las abscisas. Este resultado se presenta frecuentemente en estudios de extinción de la fluorescencia del Trp en proteínas en las cuales es utilizado un extintor polar o cargado que no puede penetrar al interior proteico, accediendo el extintor solo a los Trp superficiales, en ese caso el análisis de los datos se realiza en base a la ecuación de Stern-Volmer modificada:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \left[\frac{1}{(f k_{sv} [Q])} \right] + \left(\frac{1}{f} \right)$$

(1.5)

donde F_0 representa la fluorescencia inicial de la solución, F la fluorescencia después del agregado del extintor, $[Q]$ la concentración del extintor, k_{sv} la constante de Stern-Volmer y f la fracción de Trp accesibles al extintor expresada como $\alpha + \beta$, siendo α la fracción de Trp externos ó expuestos al extintor y β la fracción de Trp no expuestos o no accesibles.

Cuando la extinción de la fluorescencia debido a un fluoróforo es muy grande, la desviación que presenta la ecuación de Stern-Volmer es positiva, al igual que la obtenida para las proteínas en presencia de acrilamida; este efecto no es debido precisamente a la formación de un complejo sino a un fenómeno frecuentemente interpretado como “esfera de acción” (Lakowicz 1983). Este modelo explica la razón por la cual si un fluoróforo es excitado, mientras se encuentra cercano a un extintor dentro de un volumen v , el mismo sufrirá una extinción de su fluorescencia. La ecuación matemática derivada para el mecanismo de extintor denominado esfera de acción es la siguiente:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_D [Q] e^{\frac{v [Q] N}{1000}}$$

(1.6)

donde F_0 y F representan la emisión de la fluorescencia nativa de la proteína en ausencia y presencia del extintor respectivamente, K_D es la constante de Stern-Volmer relacionada con el tiempo de vida media del fluoróforo y la constante cinética de choque del extintor con el mismo, $[Q]$ la concentración de extintor, N el número de Avogadro y v el volumen de la esfera de acción, una esfera dentro de la cual la probabilidad de extinción es 100% y cuyo radio es la suma del radio de la molécula de extintor y del fluoróforo.

1.7. Fermentación en estado sólido

Las celulasas pueden ser producidas a través de fermentación sumergida (FLS) y por fermentación en estado sólido (FES). Las enzimas producidas a través de FES pueden tener ventajas sobre las de FLS, tales como mayor rendimiento y mayor estabilidad del producto (Hölker and Lenz 2005; Singhanian et al. 2009). FLS ha demostrado ser menos efectivo que la FES ya que cuando la producción a gran escala se incrementa asimismo lo hacen los costos y la demanda energética.

La fermentación en estado sólido (FES) puede ser llevada a cabo sobre una gran variedad de residuos agrícolas tales como paja de trigo, cascarilla de arroz y marlo de maíz.

La morfología del micelio asociada con los microorganismos usados para la producción de metabolitos secundarios, es muy adecuada para el crecimiento sobre soporte sólido.

La producción de celulasa ha sido estudiada desde un amplio rango de microorganismos.

Muchos organismos producen celulasas para realizar la celulólisis necesaria para el crecimiento y formación del producto bajo ciertas condiciones. Preparaciones comerciales de *Trichoderma reesei* son populares ya que contiene altas actividades de endoglucanasa y exoglucanasa pero bajo niveles de β -glucosidasa, en consecuencia, la atención se ha puesto recientemente en otros microorganismos incluyendo miembros del género de *Aspergillus*. *Aspergillus niger* ha sido ampliamente explotado ya que posee los tres componentes esenciales del complejo celulolítico. Estudios sobre parámetros de fermentación para obtener altos rendimientos de enzimas celulasas parecen ser necesarios (Sohail et al. 2009).

Es necesario mantener condiciones de humedad adecuadas que imiten las del crecimiento natural para que el sustrato permita el crecimiento microbiano (Orzua et al.

2009). La disponibilidad de agua en FES afecta el crecimiento microbiano y el metabolismo y determina la actividad del agua, un parámetro físico-químico conocido como la relación entre la presión de vapor de agua del sustrato y la presión de vapor de agua pura. La composición química y la estructura de los soportes empleados en FES influyen en los valores de la actividad del agua, que puede fluctuar de 0,80 a 0,99 para lograr un metabolismo fúngico efectivo (Martins et al. 2011). Diferentes materiales se han utilizado como soportes sólidos para FES, como el arroz y el salvado de trigo (Khandeparkar and Bhosle 2006), los subproductos del café (Machado et al. 2012), las cáscaras de mango (Buenrostro-Figueroa et al. 2010), Cáscaras de coco (Orzua et al. 2009), mazorcas de maíz (Mussatto et al. 2009b) y pieles de uva (Botella et al. 2007) entre otras. Algunos de estos derivados se han utilizado como sustratos y soportes para obtener productos de interés industrial, incluyendo antibióticos, compuestos de sabor y aroma, ácidos orgánicos, pigmentos, moléculas bioactivas y una amplia variedad de enzimas (Martins et al. 2011).

El proceso de FES demanda bajo contenido de agua de los materiales para facilitar el crecimiento fúngico y el desarrollo. Las propiedades del soporte tienen un rol importante en las tasas de crecimiento de microorganismos (Manpreet et al. 2005). Índice de absorción de agua, WAI (Water Absorption Index) , y Punto de Humedad Crítico, CHP (Critical Humidity Point) son parámetros muy importantes cuando se selecciona el tipo de material utilizado como soporte en FES (Mussatto et al. 2009b; Orzua et al. 2009). WAI especifica la capacidad de la muestra para absorber agua, sujeto a la disponibilidad de grupos hidrofílicos que unen moléculas de agua (Mussatto et al. 2009a). CHP representa el porcentaje de agua unido al soporte, el cual no puede ser utilizado por el microorganismo para sus funciones metabólicas. Los soportes deben tener un bajo CHP para promover el cultivo de microorganismos. Altos valores de CHP

no son favorables debido al gran porcentaje de agua unido al soporte (Martins et al. 2011). El límite máximo recomendado de CHP es del 40% para las cepas de *A. niger* en FES (Moo-Young et al. 1983).

Para el proceso de FES la densidad de empaquetamiento (PD) es otro importante parámetro a considerar, debido a que indica el grado de compactación del material, por lo tanto, el espacio disponible para la transferencia de masa y energía (Chávez-González et al. 2010).

Capítulo 2. Objetivos

Capítulo 2: Objetivos

Objetivo general

Desarrollar una metodología bioseparativa no contaminante, rápida y económica empleando polielectrolitos que permitan recuperar celulasas provenientes de caldos de cultivos fúngicos producidos en medio sólido.

Objetivos particulares

1. Producir celulasa a partir de cultivos fúngicos en medio sólido utilizando distintos soportes como fuente de carbono y soporte de crecimiento y realizar las siguientes determinaciones:

- Evaluar el crecimiento radial de diferentes cepas fúngicas.
- Caracterizar fisicoquímicamente los soportes utilizados en la fermentación en estado sólido.
- Analizar mediante Microscopía Electrónica de Barrido el crecimiento de *Aspergillus niger* sobre los soportes.
- Determinar proteínas totales y actividades enzimáticas de las enzimas que conforman el complejo celulolítico de los diferentes extractos enzimáticos de los cultivos.
- Calcular las productividades volumétricas y específicas de las enzimas obtenidas del cultivo en medio sólido para analizar la eficiencia del proceso.

2. Aislar y purificar celulasa a partir de cultivos de *Aspergillus niger* en medio sólido, por el método de precipitación empleando polielectrolitos, y lograr:

- Obtener el diagrama de solubilidad para los complejos polielectrolito-proteína usando un liofilizado comercial, y analizar la influencia de variables

experimentales: concentración de proteína, concentración de polímero, pH, fuerza iónica, relación estequiométrica polímero-proteína, tiempo requerido para la formación del complejo.

- Evaluar el estado funcional de la celulasa bajo las condiciones de precipitación.
- Diseñar un método de aislamiento y purificación de celulasas fúngicas utilizando los polímeros de cadena flexibles seleccionados.
- Aplicar la metodología de precipitación elegida sobre el extracto enzimático fúngico.

3. Sintetizar matrices esféricas y membranas poliméricas para la purificación de celulasa fúngica de manera de cumplir con los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar las matrices poliméricas.
- Determinar la cinética de adsorción de endoglucanasa.
- Calcular Purificación y Rendimiento de celulasa obtenida a partir de cultivos fúngicos utilizando matrices poliméricas.

Capítulo 3. Materiales *y Métodos*

Capítulo 3: Materiales y Métodos

3.1. Materiales

-Soluciones buffer fosfato (Pi), citrato, de concentración 50 mM, preparadas por pesada directa de ácido ortofosfórico sólido (H_3PO_4), ácido cítrico sólido ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), de calidad analítica y posterior disolución en agua destilada. Y buffer acetato 0,1 M por dilución de ácido acético glacial. El ajuste del pH de las soluciones se realizó por el agregado de HCl o NaOH de calidad según correspondiera en cada caso. Las soluciones de buffer fosfato y citrato de distinta fuerza iónica se prepararon mediante el agregado de NaCl sólido. El pH fue ajustado luego del agregado del NaCl.

-Solución de Glucosa 1 g/L, provista por Wiener Lab (Rosario, Argentina). Para la construcción de la curva de calibración se tomaron diferentes alícuotas de la solución de glucosa 1 g/L completando a volumen con buffer citrato 50 mM pH 5,30.

-Carboximetilcelulosa (CMC), sólida de Sigma-Aldrich (USA). Para todo el trabajo experimental se utilizó una solución de CMC 1% P/V, preparada por pesada directa del sólido y completada con buffer citrato 50 mM, pH 5,30 según la cantidad a preparar.

-Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), droga sólida provista por Sigma- Aldrich (USA). Se prepararon en todos los casos 100 mL finales de solución para lo cual se recubrió con papel aluminio un vaso de precipitado de 250 mL debido a que la acción de la luz contribuye a la degradación del reactivo. En el vaso se colocaron aproximadamente 70 mL de agua en agitación a la cual se le adicionó 1 g de DNS pesado en balanza analítica, en forma muy lenta; la solución adquiere un color amarillo translúcido. Luego, cuando se disolvió completamente el DNS se le agregaron 1,60 g de NaOH, también pesado en balanza analítica, continuando con agitación. La solución adquiere un color anaranjado translúcido. Finalmente se incorporaron 30 g de sal (tartrato de Na y K

tetrahidratada), también de forma lenta hasta la disolución total. La solución es de un color anaranjado translúcido con un pH final de aproximadamente 13,00.

-Epíclorhidrina (ECH) provista por Sigma-Aldrich (USA). Se preparó una solución 0.10 M en NaOH 0.05 M para el trabajo experimental.

-Alginato de sodio (ALG), adquirido por Sigma Aldrich (USA).

-Polivinil sulfonato de sodio (PVS), solución acuosa 25% P/P, peso molecular promedio 170.000 Da, densidad 1.267 g/cm³, calidad analítica, provisto por Aldrich (USA). Para la realización de las experiencias, se utilizó una solución de PVS 1% P/P en buffer citrato 50 mM.

-Chitosán (CHS) sólido, grado de desacetilación $\geq 75\%$ provisto por Sigma-Aldrich (USA).

-Goma Arábica (GA), adquirido por Sigma-Aldrich (USA).

-Eudragit® EPO (EPO), fue provisto por Evonik Industries (USA).

-Endoglucanasa de un liofilizado de *Aspergillus niger*. Endo-1,4- β -D-glucanasa obtenida de un liofilizado de un cultivo de *Aspergillus niger* (LCC) provisto por Sigma-Aldrich (USA). Las soluciones de la misma se obtuvieron por pesada directa de la droga sólida en las cantidades adecuadas, disolviéndola en buffer citrato 50 mM o fosfato 50 mM, según corresponda, ajustando al pH de trabajo en cada caso. Las soluciones se guardaron en heladera (4-8°C).

-Endoglucanasa (EG) de *Aspergillus niger*, provista por Megazyme (Irlanda).

-Solución de acetilacetona. Se disolvió 1 mL de acetilacetona en 50 mL de Na₂CO₃ 0,5 N.

-Reactivo de Erlich. Se disolvió 1,6 g de *p*-dimetilaminobenzaldehído en 60 mL de solución de HCl-Etanol (1:1).

- Todos los demás reactivos utilizados fueron de calidad analítica

3.2. Metodologías

3.2.1. Determinación cuantitativa de actividad enzimática endoglucanasa

Las medidas de actividad enzimática endoglucanasa se realizaron por un método colorimétrico basado en la detección de azúcares reductores producidos por la hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa (CMC) (Miller 1959). Los azúcares reductores generados reducen al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) bajo determinadas condiciones, el cual vira de color naranja a rojo (Figura 3.1).

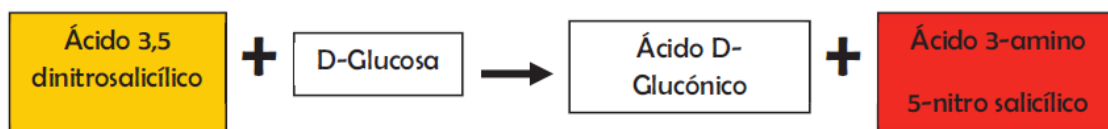


Figura 3.1: Reacción de los productos de hidrólisis de la celulosa con el DNS

La determinación de la actividad endoglucanasa en una muestra consta de los siguientes pasos:

- 1.- tomar una alícuota de la muestra (el volumen depende de la concentración inicial).
- 2.- mezclar la alícuota con el sustrato, una solución de CMC 1% P/V.
- 3.- incubar a la T óptima de actividad de la celulasa durante 10 min (50°C).
- 4.- agregar una determinada alícuota de DNS e incubar 10 min a 100°C.
- 5.- medir absorbancia a 560 nm.

Se repitieron los pasos cuatro y cinco sobre una solución de glucosa de concentración conocida para llevar a cabo una curva de calibración de Abs a 560 nm en función de la concentración de glucosa.

Se realizaron blancos de CMC y de la muestra. El blanco de muestra se efectúa para detectar posibles restos de azúcares reductores acompañando a la enzima. El blanco de

CMC se realiza para descontar la absorbancia a 560 nm de los extremos reductores presentes en el sustrato.

La actividad de celulasas se informó en unidades de actividad enzimática (U), definiendo U como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de azúcares reductores (glucosa) por minuto en las condiciones de reacción (Paredes Medina et al., 2010; Bansal et al., 2010).

3.2.2. Determinación cualitativa actividad enzimática endoglucanasa

Se preparó una solución de CMC 0,2% P/V en buffer acetato 50 mM a pH 4,50. Se agregó Agar Bacteriológico 1% P/V (preparado en buffer acetato 50 mM pH 4,50) y se vació la mezcla en cajas de Petri. Se dejó solidificar a temperatura ambiente. Se agregaron las muestras de extracto enzimático y se dejó en reposo durante 10 min para la adsorción del extracto. Se incubaron las cajas de Petri en presencia de humedad a 30°C durante 12 h. Cumplido el tiempo de incubación las cajas se lavaron 5 veces con agua destilada durante 10 min en cada lavado. Posteriormente se cubrió el agar con Rojo Congo 0,1% P/V y se dejó reposar 30 min. Por último se lavó con NaCl 1M. Se observó actividad endoglucanasa en las regiones claras en contraste con el fondo rojo del agar.

3.2.3. Determinación de actividad enzimática exoglucanasa

Las medidas de actividad enzimática exoglucanasa se realizaron por el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

La determinación de la actividad exoglucanasa en una muestra consta de los siguientes pasos:

- 1.- tomar una alícuota de la muestra (el volumen depende de la concentración inicial).

2.-agregar papel de filtro Whatman # 1.

3.- incubar a 50°C durante 60 min.

4.- agregar una determinada alícuota de DNS e incubar 10 min a 100°C.

5.- medir absorbancia a 560 nm.

Se repitieron los pasos cuatro y cinco sobre una solución de glucosa de concentración conocida para llevar a cabo una curva de calibración de Abs a 560 nm en función de la concentración de glucosa.

Se realizaron blancos de sustrato y de la muestra.

3.2.4. Determinación de actividad enzimática β -glucosidasa

La actividad β -glucosidasa fue determinada utilizando pNPG (p-nitrofenil β :1-4 glucopiranosido) como sustrato. El ensayo se realizó colocando una alícuota de la muestra a ensayar y un volumen de pNPG 9 mM en buffer acetato 0,2 M pH 4,60. Se incubó 10 min a 50°C y luego se agregó NaCO₃ 0,1 M para finalizar la reacción. El paranitrofenol liberado fue medido a 400 nm. Se realizó una curva de calibración de paranitrofenol en las mismas condiciones experimentales de las muestras.

3.2.5. Determinación de la concentración de proteínas totales

Uno de los métodos utilizados para cuantificar las proteínas fue el descrito por Warburg (Warburg & Christian, 1942). El método consiste en la medición de absorbancia a 260 nm y 280 nm, que corresponden mayoritariamente a la absorción de ácidos nucleicos y de aminoácidos con cadenas laterales aromáticas. El instrumental utilizado para la medición fue un espectrofotómetro Jasco V-550 de doble haz con un algoritmo que determina la concentración de proteínas y ácidos nucleicos contenidos en el volumen de la cubeta.

Se realizaron mediciones de soluciones de proteínas, utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Se descontaron los blancos correspondientes a los buffer, según corresponda. Se determinó para cada caso 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).

Para cuantificar proteínas, durante la estadía en Saltillo, México, se utilizó el método de Bradford (Bradford 1976). El método está basado en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Por lo tanto, este método se basa en la propiedad del Azul Brillante de Coomasie G-250 de presentarse en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a la proteína. Para realizar la determinación se colocaron 50 μ L de muestra con 1 mL de reactivo Bradford, se dejó reaccionar durante 20 min y se midió absorbancia a 595 nm. Se realizó una curva de calibración con BSA (albúmina sérica bovina) en las mismas condiciones experimentales de determinación de la muestra. La concentración de proteínas se expresó en mg de proteínas por g de soporte utilizado en cultivo en medio sólido.

3.2.6. Determinación de temperatura óptima de actividad endoglucanasa

Se realizaron pruebas de actividad de la enzima a diferentes temperaturas y a diferentes tiempos para cada temperatura. Esto permitió conocer la temperatura óptima de actividad catalítica de la enzima.

Se evaluó actividad celulasa a 9, 20, 30, 40, 50, 65°C durante 5, 10, 30, 60, 90 min para cada temperatura.

Para las medidas de actividad se tomó una alícuota de una solución de liofilizado de endoglucanasa de *Aspergillus niger* (LCC) 25 mg/mL, en medio buffer citrato 50 mM pH 5,30 y CMC 1% P/V.

A partir de la curva de calibración de glucosa se calculó la actividad enzimática expresada como U por minuto por mg de liofilizado (definiendo U como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de azúcares reductores glucosa por minuto).

3.2.7. Determinación de condiciones de estabilidad de endoglucanasa

3.2.7.1. Determinación de estabilidad endoglucanasa frente a temperatura

Se preincubaron soluciones de LCC 25 mg/mL a 30, 50, 65°C durante 30, 60, 180 min para cada temperatura. Finalizado el tiempo de incubación se tomó una alícuota y se determinó actividad enzimática endoglucanasa.

A partir de la curva de calibración de glucosa se calculó la actividad enzimática expresada como U por minuto por mg de liofilizado (definiendo U como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de azúcares reductores (glucosa) por minuto).

3.2.7.2. Determinación de estabilidad endoglucanasa frente a pH

Se preincubaron soluciones de LCC a una temperatura de 50° C en soluciones de buffer citrato 50 mM a distintos pH: 3,00; 4,00; 5,30; 6,00 y a distintos tiempos (30,,60, 120, 180 min).

Finalizado el tiempo de incubación se tomó una alícuota y se determinó la actividad enzimática.

A partir de la curva de calibración de glucosa se calculó la actividad enzimática expresada como U por minuto por mg de liofilizado (definiendo U como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de azúcares reductores (glucosa) por minuto).

3.2.8. Dicroísmo circular de endoglucanasa

Los espectros de dicroísmo circular (DC) son distintos para diferentes tipos de estructura secundaria presente en péptidos, proteínas y ácidos nucleicos pudiendo por lo tanto proporcionar una valiosa información estructural de dichas macromoléculas.

Los espectros DC se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-810, usando una cubeta termostatzada a 20°C de 1,00 cm de paso óptico. La concentración final de la proteína fue 5 μ M y se utilizó buffer Pi 12,5 mM a diferentes valores de pH. Se realizaron barridos entre 190 y 300 nm a la velocidad de 100 nm/min. Los espectros se corrigieron de acuerdo al software suministrado por el fabricante del espectrofluorómetro. Los espectros de DC se realizaron además en presencia del polímero CHS.

3.2.9. Espectros de emisión de fluorescencia nativa de endoglucanasa

Los espectros de fluorescencia nativa de endoglucanasa de Megazyme (EG) se realizaron en un espectrofluorómetro S2000 Aminco Bowman Model FA354, usando una cubeta termostatzada a 20°C de 1,00 cm de paso óptico. La concentración final de la proteína fue 0,8 μ M en presencia de buffer fosfato 50 mM pH 5,30. Los espectros se corrigieron de acuerdo al software suministrado por el fabricante del espectrofluorómetro. Los mismos se realizaron en presencia y ausencia de CHS a diferentes concentraciones (CHS 0,010 M; 0,035 M; 0,058 M).

3.2.10. Extinción de la fluorescencia de la endoglucanasa con acrilamida

Los espectros de extinción de la fluorescencia se realizaron en las mismas condiciones de la determinación de fluorescencia de endoglucanasa nativa a diferentes valores de pH, empleando como extintor acrilamida 4,00 M.

3.2.11. Producción de celulasas fúngicas

3.2.11.1. Caracterización fisicoquímica de soportes para cultivo en medio sólido

Se realizó la caracterización fisicoquímica de los soportes de cáscaras de soja y papel residual. Las caracterizaciones físicas y químicas consistieron en el índice de absorción de agua (WAI) (Orzua et al. 2009), punto de humedad crítica (CHP) (Mussatto et al. 2009) y determinación de la densidad de empaquetamiento (PD) (Santomaso et al. 2003).

Para la determinación del WAI se colocaron 1,5 g de soporte y 15 mL de agua destilada en un tubo centrífuga de 50 mL. Se agitó durante 1 min a temperatura ambiente (25°C) y luego se centrifugó a 3000 g por 10 min. Se descartó el sobrenadante, y el WAI fue calculado del peso del gel remanente y expresado como g gel/ g peso seco.

El CHP fue estimado agregando 1 g de muestra en termo-balanza a 130°C hasta peso constante.

El PD fue estimado colocando 10 g de muestra en probeta, agitando verticalmente hasta no observar cambio de volumen durante 5 min.

3.2.11.2. Evaluación de la Velocidad de Crecimiento Radial

Se emplearon cajas Petri de 9 cm de diámetro con 20 mL de medio de cultivo Agar Papa Dextrosa, posteriormente se inocularon con 100 µl de la cepa a propagar (*Aspergillus niger* NRRL3, *Aspergillus niger* GH1, *Trichoderma harzianum* T104) y se dejaron en incubación de 5 días a 30°C para las cepas de *A. niger* y 28°C para la cepa de *T. harzianum*. Una vez cumplidos los días de incubación se procedió con la extracción del explante con ayuda de un sacabocados previamente esterilizado. Luego de ser removido del medio de cultivo se coloca en el centro de la caja Petri en la cual se evaluará la velocidad de crecimiento del microorganismo. Se utilizaron 8 g de marlo de

maíz blanco y 24 mL de medio Mandels para cada caja Petri de manera de lograr un 75% de humedad. Se trabajó por triplicado.

En el centro de las tapas de las cajas de Petri se trazaron dos líneas perpendiculares entre sí de extremo a extremo, una vertical y una horizontal, las cuales dividen en cuatro puntos cardinales y sirvieron de guía para marcar el crecimiento sobre el soporte.

Por último las cajas de Petri fueron envueltas con film para evitar contaminación y finalmente fueron incubadas.

La velocidad de crecimiento radial (v) se estimó de la pendiente de la recta determinada en la fase exponencial del crecimiento del hongo de la gráfica crecimiento radial (mm) vs. tiempo (h), y se expresó en mmh^{-1} .

Debido a que los datos de crecimiento radial han sido recolectados a través del tiempo, se llevó adelante un análisis estadístico longitudinal a través de un modelo mixto de medidas repetidas, mediante el software estadístico R. Se consideró significativo un $p < 0,05$.

3.2.11.3. Microorganismo y preparación del inóculo

Para la producción de celulasa se utilizó la cepa *A. niger* NRRL3, obtenida de la colección del servicio de investigación en agricultura del departamento de agricultura de Estados Unidos (USDA), la cepa *A. niger* GH1 y la cepa T1-04 *Trichoderma harzianum* ambas provistas por el Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Cs. Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, México. Los microorganismos se reactivaron en erlenmeyers con agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 30°C durante 5 días para las cepas de *Aspergillus niger* y a 28°C durante 7 días para *Trichoderma harzianum*. El inóculo se obtuvo desprendiendo las esporas con 15 mL de Tween 80 0,1% V/V con la ayuda de un agitador magnético estéril. Se tomó

una alícuota, se diluyó y se contó el número de esporas en una cámara de conteo tipo Thoma ó utilizando una curva de calibración de esporas de la cepa.

3.2.11.4. Cultivo en Medio Sólido

- Para los estudios de producción de celulasas el cultivo en medio sólido se llevó a cabo en erlenmeyers de 250 mL con 15 g de diferentes soportes como marlo de maíz blanco, cáscaras de soja y papel, los cual sirvieron como fuente de carbono y soporte de crecimiento para el microorganismo. Se agregaron 45 mL del medio Mandels y se inoculó con 1×10^6 esp/mL. Se incubó a 30°C durante 96 y 120 h dependiendo el soporte utilizado.

El medio Mandels presentó la siguiente composición (g.L^{-1}): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,4), KH_2PO_4 (2,03), CaCl_2 (0,30), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,30), peptona (1,00), FeSO_4 (0,005), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,0016), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,0014), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,02), urea (0,30), extracto de levadura (0,25), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,001). El pH del medio fue ajustado a 4,60 y luego autoclavado a 121°C para 15 min. El extracto enzimático se obtuvo agregando 20 mL de buffer acetato 0,1 M, pH 4,80, se homogeneizó, se filtró y finalmente se centrifugó a 10000 rpm por 10 min.

- Para los estudios purificación endoglucanasa utilizando precipitación con polielectrolitos el cultivo en medio sólido se llevó a cabo en erlenmeyers de 250 mL con 20 g de pellets cáscara de soja. Se dejó enfriar y se agregaron 50 mL del medio de cultivo previamente inoculado con $1,2 \times 10^6$ esp/mL. Se homogenizó y se incubó a 30 °C durante 3 días.

El medio se preparó con la siguiente composición: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 g/L, KH_2PO_4 2,0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, CaCl_2 0,4 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,006 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,002 g/L, ZnSO_4 0,0014 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ g/L, urea 0,3 g/L, extracto de levadura 0,25 g/L.

El extracto enzimático se obtuvo agregando 30 mL de buffer fosfato 50 mM, pH 5,1, se homogeneizó y se comprimió con una jeringa de plástico. El líquido obtenido se filtró sobre un colador metálico de poro fino y finalmente se centrifugó a 10000 rpm por 10 min.

- Para la purificación de endoglucanasa utilizando matrices insolubles: se dispuso de un cultivo fúngico en medio sólido que se llevó a cabo en erlenmeyers de 250 mL, donde se colocaron 20 g de residuos de la cosecha de soja incubados previamente 24 h a 50 °C, y se agregaron 50 mL del medio de cultivo. Se esterilizó en autoclave y se dejó enfriar. Posteriormente se inoculó con $1,2 \times 10^6$ esporas/mL. Se homogenizó y se incubó a 30 °C durante 3 días.

El medio se preparó con la siguiente composición: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 g/L; KH_2PO_4 2,0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L; CaCl_2 0,4 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,006 g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,002 g/L; ZnSO_4 0,0014 g/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ g/L; Urea 0,3 g/L; Extracto de Levadura 0,25 g/L.

A partir del cultivo en medio sólido se obtuvo el extracto enzimático. Para ello se trabajó de la siguiente manera: se agregaron 60 mL de buffer acetato 50 mM, pH 5,00 a cada erlenmeyer. Se agitó durante 20 min. El líquido obtenido se filtró sobre un colador metálico de poro fino y finalmente se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min. Se almacenó en freezer hasta su utilización en este trabajo.

3.2.11.5. Determinación de glucosamina

La glucosamina ($C_6H_{13}NO_5$) es un aminoazúcar que se encuentra principalmente en el exoesqueleto de crustáceos y artrópodos, formando parte de la pared celular de hongos y muchos organismos, siendo el monosacárido más abundante y, por ende, su cuantificación nos permite tener una estimación del crecimiento de microorganismos en un cultivo.

Para determinar el contenido de glucosamina, se requiere una hidrólisis para liberarla de la pared celular, posteriormente se combina con la acetilacetona formando un compuesto pirrólico, que al reaccionar con el *p*-dimetilaminobenzaldehído (PDBA) forma un compuesto de color rojo a una absorbancia de 530 nm.

Por lo tanto, se realizó la determinación de glucosamina para todas las muestras del cultivo fúngico realizado en cáscaras de soja y papel residual (Blix 1948). Constó de los siguientes pasos:

- Pesar 1 g de cada muestra y mantener a 60°C en estufa durante 24 h.
- Tomar 100 mg de muestra seca y agregar 5 mL H_2SO_4 5 N.
- Agitar 15 min.
- Centrifugar 5000 rpm durante 10 min.
- Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 5 mL de H_2O destilada
- Agregar 100 μ L HCl 10 M (20°C). Homogeneizar.
- Reposar 16 h.
- Colocar 4 mL de H_2O destilada.
- Autoclavar 2 kg/cm², 121°C durante 15 min.
- Neutralizar con NaOH 10 N y 0,5 N
- Tomar 200 μ L y agregar 200 μ L de solución de acetilacetona.
- Colocar a 96°C durante 20 min.

-Enfriar a Temperatura ambiente.

-Agregar 2 mL etanol 96% y 200 μ L de Reactivo de Erlich. Homogeneizar. Reposar 45 min.

-Leer absorbancia a 530 nm.

Se realizó una curva de calibración con glucosamina en las mismas condiciones experimentales de determinación de la muestra.

3.2.11.6. FPLC (*Fast protein liquid chromatography*)

Los extractos enzimáticos correspondientes a las 0, 72, 96 h de la FES en marlo de maíz blanco (realizados en la ciudad de Saltillo, México) fueron tratados utilizando FPLC.

Los extractos enzimáticos se filtraron al vacío utilizando papel de filtro millipore 0,45 μ m. Se inyectaron 500 μ L de extracto filtrados en un FPLC Akta Prime (GE Healthcare, USA) a través de la columna Hi trap Desalting g-25 (Amersham, Pharamacia, EUA) y equilibrada con agua destilada y filtrado por membrana de celulosa (0,7 μ m). Las condiciones del equipo FPLC fueron las siguientes: limite de presión 1 MPa, velocidad de flujo 1 mL/min, tamaño de fracción: 1 mL, volumen de equilibrio 15 mL, volumen de inyección 0,5 mL, volumen de elución 12 mL.

3.2.11.7. *Microscopía Electrónica de Barrido del soporte cáscaras de soja para fermentación en estado sólido*

Para la visualización de esporas y crecimiento fúngico de la fermentación en estado sólido (FES) sobre cáscaras de soja se realizó Microscopía Electrónica de Barrido. El equipo utilizado tenía las siguientes características: marca FEI modelo QUANTA, 200 F (tipo de filamento), FEG (field emission gun). Las muestras fueron deshidratadas y analizadas a 5 KeV en bajo vacío a 0,10 mbar utilizando un detector LFD (large field

detector). Luego las muestras deshidratadas fueron cubiertas con oro electrolítico y analizadas a alto vacío a una presión de $6,2 \cdot 10^{-4}$ mbar utilizando detector ETD (Everhardt Thornley Detector) y BSED (back-scattered detector).

3.2.11.8. Análisis estadístico del efecto del soporte sobre la producción de celulosa en la FES

El efecto del soporte sobre la producción de celulosa fue evaluada bajo un diseño bifactorial completamente aleatorizado. Los tratamientos fueron la combinación de los niveles de dos factores: Soporte (cáscaras de soja y papel residual) y Tiempo (determinado a 0, 24, 48, 72, 96, 120 h). Las variables: biomasa, proteínas totales, actividad celulosa, actividad específica celulosa, productividades volumétricas y específicas fueron determinadas. Los datos fueron analizados mediante Análisis de la Variancia (ANOVA) paramétrico y no paramétrico, según corresponde, de acuerdo al cumplimiento o no de los supuestos de normalidad y homocedasticidad requeridos por el método clásico. Cuando dichos requerimientos no fueron satisfechos por los datos, se utilizó una transformación de los mismos denominada Transformación de Rangos Alineados (ART) (Wobbrock et al. 2011). Los datos fueron analizados utilizando los paquetes ARTool y lsmeans de la versión 3.2.3 del software estadístico R (Kay M. 2014; Lenth R.V. 2015; Team 2015). Las medias de los tratamientos fueron comparadas de a pares usando el procedimiento de comparaciones múltiples de Tukey. Un p-value menor a 0,05 fue considerado como significativamente diferente.

3.2.11.9. Análisis estadístico para evaluar el efecto del tiempo sobre la producción de celulasa en cáscaras de soja

Se evaluó el efecto del tiempo en la producción de celulasa para el soporte cáscaras de soja bajo un diseño completamente aleatorizado mediante un ANOVA unifactorial para cada una de las variables estudiadas (biomasa, actividad enzimática, proteínas totales, actividad específica, productividad volumétrica, productividad específica). Luego, las medias de los tiempos fueron comparadas de a pares mediante el procedimiento de comparaciones múltiples de Tukey. Se consideró significativo un p-value menor a 0,05.

3.2.11.10. SDS-PAGE y análisis de zimograma

Se realizó SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 15% P/V según el método de Laemmli (Laemmli 1970). La tinción con Coomassie Blue R-250 fue realizada para la visualización de proteínas sobre el gel de poliacrilamida.

Para la visualización de bandas de actividad endoglucanasa sobre el gel, el método de (Medve et al. 1998) fue empleado con algunas modificaciones. El análisis del zimograma de endoglucanasa fue realizado incorporando CMC 0,15% P/V dentro del gel de resolución. Luego del SDS-PAGE se lavó el gel dos veces a temperatura ambiente, en agitación, con buffer acetato 50 mM y 25% de isopropanol (pH 4,80) para remover el SDS. La enzima fue renaturalizada en buffer acetato 50 mM (pH 4,80) conteniendo 5 mM de β -mercaptoetanol agitando durante la noche a 10°C. Luego el gel fue transferido a buffer acetato 50 mM (pH 4,80) por 2 h e incubado a 50°C por otras 2 h.

El gel fue teñido con solución de Congo Red 0,1% P/V durante 30 min. La actividad endoglucanasa fue visible como bandas claras en contraste con el fondo rojo del gel.

3.2.12. Precipitación con polielectrolitos

3.2.12.1. Caracterización de las interacciones polímero-proteína

3.2.12.1.1. Formación del complejo polímero-proteína

Se construyeron curvas de precipitación de la proteína con los polímeros Polivinil sulfonato y Chitosán (PVS y CHS). Las mismas se realizaron midiendo el incremento de la absorbancia a 420 nm a 15°C aproximadamente y a diferentes pH del medio (2,70 y 4,00 para PVS; 4,10; 5,10 y 6,10 para CHS) tanto para una concentración fija de proteína como de polímero.

La Figura 3.2 muestra el sistema utilizado, el cual consiste en un vaso de precipitado con agitación permanente con un volumen fijo de solución de proteína. Sobre ésta se adicionaron alícuotas de una solución de polímero previamente ajustada al mismo pH que la solución de proteína utilizando solución buffer fosfato o citrato 50 mM. Luego de cada agregado de polímero se tomó una alícuota, se midió la absorbancia a 420 nm, y posteriormente se la devolvió nuevamente al sistema para que no se modificara el volumen total en las sucesivas lecturas.

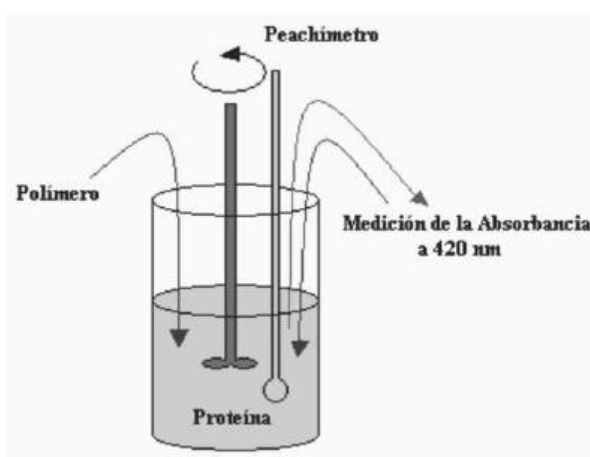


Figura 3.2: Esquema del sistema que contiene a la proteína a la cual se adiciona el polímero

Las mediciones de absorbancia se hicieron con un espectrofotómetro Boeco Germany S-20, con un rango de longitud de onda 320-1000 nm, un ancho de banda de 8 nm y una exactitud de ± 10 nm. Se analizaron los patrones obtenidos y se estimó el pH más adecuado de trabajo.

3.2.12.1.2. Efecto de la concentración del polímero sobre la formación del complejo

Se llevó a cabo la titulación turbidimétrica a 15°C de una solución del liofilizado de endoglucanasa comercial (LCC) con PVS y con CHS; haciendo agregados del polímero y midiendo turbidez (absorbancia a 420 nm) después de cada agregado. Para el caso del PVS, se trabajó a concentraciones de 0,5%, 1,0% y 2,0% P/P, siendo el pH del medio 2,70, empleando buffer citrato 50 mM. Los experimentos con CHS se realizaron a pH 5,10 empleándose buffer fosfato 50 mM, y las concentraciones utilizadas fueron de 0,03%, 0,05%, y 0,10% P/V.

En ambos se mantuvo constante la concentración del LCC (30 mg/mL). Con los datos obtenidos se construyeron las curvas de titulación correspondientes graficando absorbancia a 420 nm vs. relación de masa de PVS/LCC o CHS/LCC.

Es frecuente observar que estas curvas se ajusten a una función hiperbólica o sigmoidea demostrando así un típico comportamiento de saturación pero evidenciando distintos mecanismos de formación del complejo. En otros casos puede no ajustarse a ningún modelo de función, pero es común observar un aumento de la turbidez a medida que se aumenta la relación polímero-proteína hasta una cierta relación crítica, a partir de la cual la turbidez cae ante el aumento de la relación polímero-proteína.

La relación de saturación (e) se calcula gráficamente para una sigmoidea o una hipérbola, según se muestra en las figuras 3.3.a y 3.3.b.

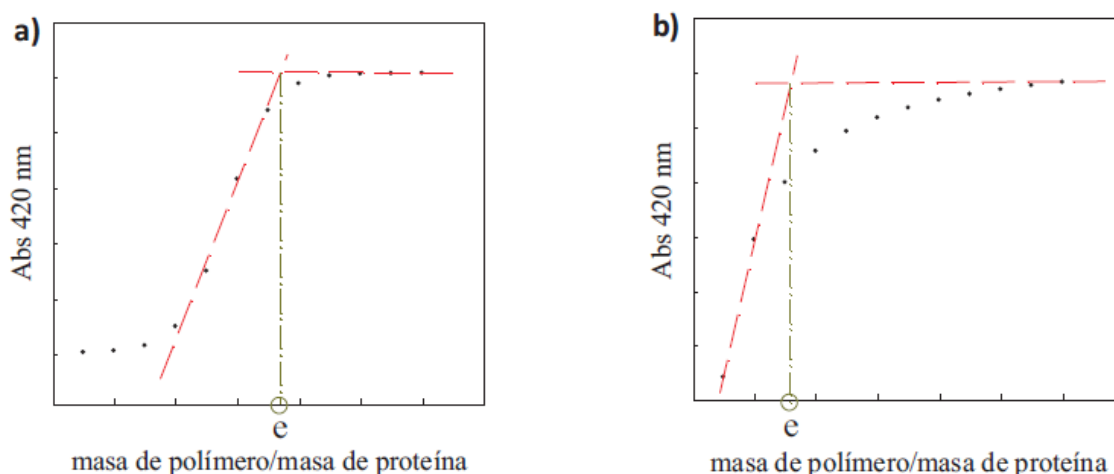


Figura 3.3: Determinación de la relación expresada en masa polímero/masa de proteína cuando se alcanza la saturación en un gráfico a) sigmoideo y b) hiperbólico.

El valor “e” se denomina estequiometría del complejo y representa la mínima relación de polímero/proteína, en masa o moles, necesaria para alcanzar la máxima turbidez.

3.2.12.1.3. Efecto de la concentración de enzima sobre la formación del complejo insoluble

Manteniendo constante la concentración del polímero (1,0% P/P para el PVS, y 0,05% P/V para el CHS) fue aplicada la misma metodología que en el punto anterior, variando la concentración del liofilizado comercial utilizado. Para ambos casos las concentraciones ensayadas fueron de 15, 30 y 45 mg/mL.

3.2.12.1.4. Efecto del pH sobre la formación del complejo insoluble

Se prepararon mezclas de soluciones de LCC a distintas relaciones polímero-proteína para obtener una elevada cantidad de proteína unida al polímero formando parte del complejo insoluble. Las relaciones ensayadas fueron: 0,0051; 0,0144; 0,0169 (mg PVS/mg LCC) y 0,0008; 0,0013; 0,0019 (mg CHS/mg LCC).

El pH de estas soluciones fue modificado (trabajando con agitación permanente) desde valores menores a 1,60 hasta valores mayores a 8,00. Los cambios de pH fueron producidos por agregado de soluciones concentradas de HCl o NaOH. Luego de cada agregado, se tomó una alícuota de la solución (2,5 mL) y se procedió a medir la absorbancia a 420 nm a 15°C. Las alícuotas se devolvieron en todos los casos al sistema antes del siguiente cambio de pH.

Se realizó además, el mismo procedimiento con una solución control de proteína y una solución control de polímero, para corroborar que ninguna de estas dos especies contribuya de manera individual a la turbidez del sistema, ya sea por desnaturalización de la proteína o por insolubilidad del polímero debido a un cambio de carga.

Las concentraciones de proteína, polímero y buffer empleadas fueron: LCC 30 mg/mL, PVS 1,0% P/P, CHS 0,05% P/V, buffer citrato 50 mM y buffer fosfato 50 mM. El peachímetro empleado fue Hanna, modelo HI 9017 con una apreciación de 0,01 unidades de pH.

Los datos obtenidos permitieron confeccionar los Diagramas de Solubilidad para analizar el cambio de absorbancia a 420 nm con el pH y determinar los rangos de solubilidad e insolubilidad de los complejos PVS-endoglucanasa, y CHS-endoglucanasa.

3.2.12.1.5. Cinética de formación del complejo

En sistemas donde las proteínas interaccionan con polímeros es frecuente encontrar que la formación del complejo no es instantánea sino que existe un tiempo de interacción necesario para alcanzar el máximo de turbidez (Lali et al. 2000). El tipo de perfiles que se pueden obtener dependen de la naturaleza tanto de la enzima como del polímero.

Por esta razón se realizó un ensayo cinético donde se determinó el tiempo necesario para alcanzar la máxima turbidez al mezclar una solución de endoglucanasa comercial (LCC) y polímero a una relación saturante al pH de trabajo, y a varias temperaturas de incubación diferentes (15, 20, 25 y 30°C para el complejo PVS-LCC, y 15, 20, 25 y 35°C para el complejo CHS-LCC).

Las concentraciones utilizadas fueron: liofilizado 30 mg/mL, PVS 1,0% P/P, CHS 0,05% P/V. Para el complejo PVS-LCC el pH del medio fue de 2,70 regulado por buffer citrato 50 mM y para el complejo CHS-LCC de 5,10 regulado en este caso por buffer fosfato 50 mM.

3.2.12.2. Disociación del complejo polímero-proteína

Paralelamente al análisis de la interacción entre los polímeros y la proteína, se ensayaron métodos para estudiar la disociación del complejo.

Diferentes autores plantearon básicamente dos métodos de disociación de un complejo polielectrolito-proteína: uno consiste en la modificación del pH del medio y el otro en la variación de la fuerza iónica (Nath et al. 1995; Kim et al. 2001).

La elección del modo de disociación del complejo insoluble se realiza luego de la evaluación de las variables fuerza iónica y pH. En ambos casos se debe evaluar si la modificación del pH o el agregado de una sal a la solución del complejo insoluble es suficiente para disociar totalmente el complejo.

Además, deberá tenerse en cuenta la actividad y la estabilidad en el tiempo de la enzima bajo dichas condiciones experimentales.

3.2.12.2.1. Efecto del pH

El efecto del pH se puede analizar a partir de gráficos denominados Diagramas de Solubilidad que permiten conocer el rango de pH al cual el complejo es soluble o insoluble. Estos diagramas se obtienen del procesamiento de los datos obtenidos en la sección 3.2.12.1.4.

3.2.12.2.2. Efecto de la fuerza iónica

Para esta experiencia se llevó a cabo una titulación turbidimétrica variando la concentración de NaCl en el medio sobre las soluciones con el mejor perfil de precipitación.

La fuerza iónica se reguló adicionando NaCl sólido a la solución buffer escogida para cada proteína. El pH de las soluciones fue reajustado luego del agregado de la sal (Patrickios et al. 1999).

Las fuerzas iónicas probadas para cada tipo de complejo estuvieron dadas por diferentes concentraciones de NaCl (0,25, 0,50 y 1,00 M).

En la Figura 3.4 se muestra el esquema de trabajo realizado para evaluar el efecto salino sobre la redisolución de los complejos proteína-poliélectrolito.

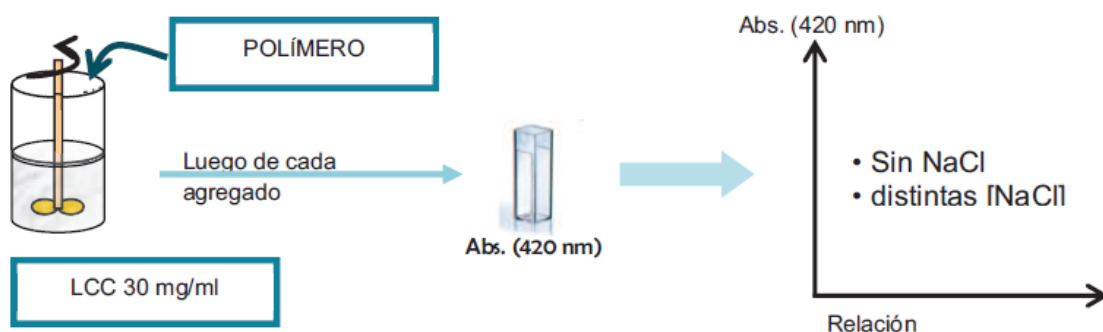


Figura 3.4: Esquema de trabajo empleado para evaluar el efecto de la fuerza iónica sobre la formación de los complejos CEL-polímeros.

3.2.12.3. Actividad de la enzima en ausencia y presencia del polímero, así como en ausencia y presencia de NaCl 1,0 M

Con el fin de evaluar si la actividad biológica de la celulasa se ve afectada cuando se encuentra formando parte del complejo con el polielectrolito, se efectuó la medición de la actividad enzimática en ausencia y presencia de polielectrolito.

Para el complejo PVS-LCC las relaciones estequiométricas probadas fueron de 0,0025, 0,0051 y 0,0076 mg PVS/mg LCC, y para el complejo CHS-LCC fueron de 0,0008, 0,0013 y 0,0019 mg CHS/mg LCC. El tiempo de incubación de la enzima con el polielectrolito fue de 15 min a 15°C y pH 2,70 para el primer caso; y de 1 h a 22°C y pH 5,10 para el segundo.

Lo mismo se realizó para analizar el efecto de la fuerza iónica sobre la actividad enzimática, utilizando una concentración de NaCl de 1,0 M y conservando el resto de las condiciones.

La concentración de LCC fue siempre la misma (30 mg/mL), igualmente para los polímeros (PVS 1,0% P/P, CHS 0,05% P/V).

3.2.12.4. Estabilidad de endoglucanasa a través del tiempo en presencia de polímero

La actividad biológica de una enzima medida a través del tiempo es un parámetro que nos permite determinar la estabilidad en el medio en que se encuentra. Para evaluar si la endoglucanasa es estable en un medio que contiene al polielectrolito, se procedió a precipitar a la enzima, separar las fracciones y por último medir la actividad en el sobrenadante (mínima concentración del polímero) y en el precipitado (máxima concentración del polímero), incubando durante distintos períodos de tiempo. También se midió la actividad endoglucanasa de la solución inicial, la cual sirvió como un control.

Para la precipitación con PVS (1,0% P/P) se utilizó una concentración de LCC de 30 mg/mL, se incubó a 15°C, pH 2,70 (buffer citrato 50 mM). Para el caso del CHS (0,05% P/V) la concentración de enzima fue la misma, la incubación se llevó a cabo a 15°C, pH 5,10 (buffer fosfato 50 mM).

3.2.12.5. Diseño del método de precipitación

Luego de conocer los resultados arrojados por los experimentos previos, que nos permitieron determinar las condiciones óptimas de interacción entre proteína y polímero, nos encontramos en condiciones de diseñar un modelo de aislamiento y purificación de la endoglucanasa.

La base del método es la formación de un complejo insoluble entre la proteína y el polielectrolito, el cual luego puede separarse del resto del medio por simple decantación y redisolverse en un nuevo medio de manera tal que la enzima conserve su actividad biológica.

De esta forma se procedió a realizar los siguientes pasos:

- Preparación de una solución de proteína en medio buffer citrato 50 mM para precipitación con PVS; y buffer fosfato para el trabajo con CHS, al pH óptimo de interacción con el polímero.
- Agregado de una alícuota de solución de polímero a la solución de proteína. La solución del polímero fue preparada en el mismo buffer y al mismo pH que la enzima.
- Incubación a la temperatura seleccionada como óptima, durante el tiempo determinado según cinética de formación del complejo, para favorecer la interacción polímero-proteína.
- Centrifugación de la mezcla.
- Separación de precipitado (PP) y sobrenadante (SN).

- Redisolución del precipitado hasta alcanzar el volumen inicial, en las condiciones del medio (pH y fuerza iónica) previamente determinadas.
- Determinación de la actividad de la enzima en el precipitado re-disuelto y en el sobrenadante.

Fue determinada la actividad enzimática y la concentración de proteínas totales en el control, en el precipitado redisoluto y en el sobrenadante. Aplicando la ecuación (3.1) se determinaron las actividades específicas en los tres casos.

$$Actividad\ esp_x = \frac{Actividad_x}{[proteínas]_x} \quad (3.1)$$

donde “x” representa, según el caso: el control, el precipitado o el sobrenadante. Con los datos previamente mencionados y aplicando la ecuación (3.2) fueron calculados los factores de purificación:

$$FP = \frac{Actividad\ esp_{precipitado}}{Actividad\ esp_{control}} \quad (3.2)$$

El FP representa el número de veces que aumenta la actividad específica en el precipitado respecto a la actividad específica en el control. Valores de FP adecuados son mayores a uno.

Para la determinación del %R se utilizó la ecuación (3.3):

$$\%R = \frac{Actividad_{precipitado}}{Actividad_{control}} \times 100$$

(3.3)

El rendimiento representa el % de actividad retenida respecto de la inicial. Se realizaron los cálculos correspondientes para obtener los rendimientos (R%) y factores de purificación (FP), en base de las mediciones de actividad enzimática y proteínas totales, a cada una de las fracciones de modo de evaluar la efectividad del proceso bioseparativo.

3.2.13. Matrices poliméricas

3.2.13.1. Síntesis de matrices poliméricas

3.2.13.1.1. Preparación de la matriz triturada de CHS 3% P/V en HAc 1% V/V

A partir del CHS pesado en balanza y la cantidad de agua destilada adecuada para formar una solución 3% P/V, se agregó cantidad de ácido acético glacial para lograr un 1% V/V y se mantuvo en agitación durante un día para asegurar su completa solubilización. Esta solución se transfirió a una jeringa de 50 mL de capacidad y se emitió en forma de gotas sobre una solución de NaOH 0,10 M en agitación suave (Figura 3.5). Cuando se neutralizaron las cargas positivas del polímero en medio básico se produjo la gelificación del mismo.

Las partículas resultantes fueron sometidas a ruptura con un molino a cuchillas para reducir el tamaño y aumentar el área superficial de la matriz. La matriz fue lavada reiteradas veces con buffer fosfato 50 mM a pH de trabajo (pH 6,00 ó 7,00) hasta alcanzar el pH correspondiente.

Finalmente la matriz triturada de CHS 3% P/V en HAc 1% V/V se almacenó en una solución limpia de buffer de lavado a 4°C hasta su utilización.

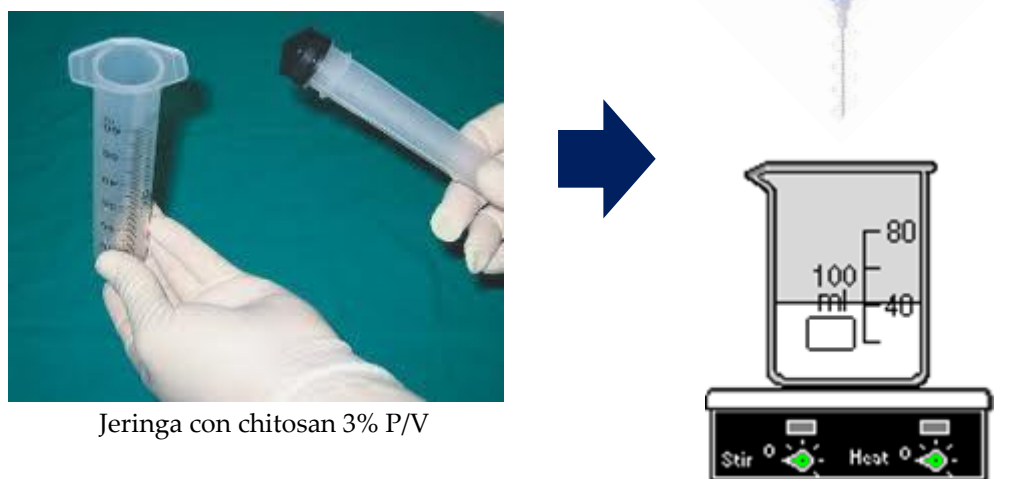


Figura 3.5: Esquema del sistema utilizado
para la elaboración de la matriz insoluble de CHS

3.2.13.1.2 Preparación de esferas de CHS 2,5% P/V en HAc 5% V/V

A partir del CHS pesado en balanza y la cantidad de agua destilada adecuada para formar una solución 2,5% P/V, se agregó cantidad de ácido acético glacial para lograr un 5% V/V y se mantuvo en agitación durante un día para asegurar su completa solubilización. Esta solución se transfirió a una jeringa de 50 mL de capacidad y se emitió en forma de gotas por medio de una aguja hipodérmica de 0,8 mm sobre una solución de NaOH 1 M en agitación suave (Figura 3.6). Cuando se neutralizaron las cargas positivas del polímero en medio básico se produjo la gelificación del mismo lográndose que la forma final del CHS sea de pequeñas esferas por medio del goteo de la solución del polímero con la jeringa.

Las esferas fueron lavadas reiteradas veces con buffer fosfato 50 mM pH 7,00 ó buffer citrato 50 mM pH 5,30 hasta alcanzar el pH correspondiente de trabajo.

Finalmente la matriz de CHS 2,5% P/V en HAc 5% V/V se almacenó en una solución limpia de buffer de lavado a 4°C hasta su utilización.



Figura 3.6: Matriz de CHS 2,5% P/V
en 5% V/V de HAc

3.2.13.1.3. Preparación de esferas de CHS entrecruzada con epíclorhidrina

A partir del CHS pesado en balanza y la cantidad de agua destilada adecuada para formar una solución 1% P/V, se agregó cantidad de ácido acético glacial para lograr un 1% V/V y se mantuvo en agitación durante un día para asegurar su completa solubilización. Esta solución se transfirió a una jeringa de 50 mL de capacidad y se emitió en forma de gotas por medio de una aguja hipodérmica de 0,5 mm sobre una solución de NaOH 0,1 M en agitación suave. Este paso neutraliza el ácido acético del gel de CHS y por lo tanto coagula el gel del CHS para formar esferas uniformes. Posteriormente las esferas de CHS fueron lavadas reiteradas veces con agua destilada para remover el NaOH.

Para entrecruzar el CHS con la epíclorhidrina (ECH) se preparó una solución de 0,10 M ECH agregando 0,05 M de NaOH para obtener un pH 10,00. Las esferas de CHS fueron suspendidas en la solución de ECH 0,1 M de forma de obtener una relación 1:1

ECH/CHS. Las esferas de CHS en solución de ECH 0,10 M se mantuvieron en baño termostatzado a 40°C por 24 h.

Luego de finalizado el tiempo de reacción las esferas se lavaron intensivamente con agua destilada para remover el exceso de solución de ECH (Nghah et al. 2008).

La matriz de CHS-ECH fue lavada reiteradas veces con buffer fosfato 50 mM pH 7,00 ó buffer citrato 50 mM pH 5,30 hasta alcanzar el pH correspondiente de trabajo.

Finalmente se almacenó en una solución limpia de buffer de lavado a 4°C hasta su utilización.

3.2.13.1.4. Preparación de esferas de CHS 2% P/V en HAc 5% V/V

Se preparó una solución 2% P/V de CHS en ácido acético 5% V/V a partir de ácido acético glacial manteniendo en agitación durante un día para asegurar la completa solubilización. Esta solución fue transferida a una jeringa de 50 mL de capacidad para la emisión en forma de gotas sobre una solución de NaOH 1 M en agitación orbital constante a 120 rpm. Cuando se neutralizaron las cargas positivas del polímero en el medio básico se produjo la gelificación del mismo lográndose que la forma final de la matriz de CHS sea esférica. Las esferas fueron lavadas varias veces con agua destilada, para remover restos de NaOH, hasta alcanzar el pH correspondiente de trabajo que se mantuvo aproximadamente en un rango entre 6,00 y 7,00.

Finalmente la matriz de CHS 2% P/V en HAc 5% V/V se almacenó en agua destilada en heladera, hasta su utilización.

3.2.13.1.5. Preparación de esferas de CHS 2% P/V entrecruzada con Glutaraldehído 0,5% P/V

Las matrices de CHS entrecruzadas con glutaraldehído fueron preparadas colocando esferas de CHS 2% P/V con glutaraldehído ($\delta = 1,06 \text{ g/cm}^3$) 0,5% P/V durante diferentes tiempos de incubación: 10 min (CHS-G10), 30 min (CHS-G30) y 60 min (CHS-G60). La incubación fue llevada a cabo en baño de hielo, con agitación orbital constante de 90 rpm y bajo campana. Luego las esferas se lavaron exhaustivamente, primero con etanol y finalmente varias veces con agua destilada para eliminar el exceso de glutaraldehído. Por último, se almacenaron en agua destilada, en heladera, hasta su utilización.

3.2.13.1.6. Preparación de esferas de CHS - Eudragit® EPO

Las matrices de Chitosán y Eudragit® EPO (CHS-EPO) fueron preparadas disolviendo 1,25 g de CHS y 0,35 g de Eudragit® EPO en 50 mL de ácido acético 1% V/V. Se dejó bajo agitación toda la noche hasta su completa disolución. Una vez disuelto se goteó la mezcla con una jeringa de 50 mL en una solución de NaOH 2 M bajo agitación orbital constante a 120 rpm. Las esferas así obtenidas se dejaron madurar en solución de NaOH 1 M una semana, en heladera. Luego fueron almacenadas en heladera en NaOH 0,1 M.

3.2.13.1.7. Preparación de esferas de Alginato – Goma Arábica

Para la preparación de las esferas de Alginato y Goma Arábica (ALG-GA) se preparó una solución de ambos polímeros. Para ello se disolvieron 0,80 g de Alginato y 0,20 g de Goma Arábica en 50 mL de agua destilada. La mezcla se mantuvo durante 24 h. con agitación constante hasta su completa disolución.

Las esferas se obtuvieron al gotear la solución de ambos polímeros, con la ayuda de una jeringa de 50 mL, en una solución de CaCl_2 0,2 M, bajo agitación orbital constante a 120 rpm. Las matrices así obtenidas fueron almacenadas en heladera en CaCl_2 0,2 M.

3.2.13.1.8. Preparación de membranas de CHS

Una solución de CHS 2,5% P/V fue preparada disolviendo CHS en ácido acético 3% V/V. La solución fue mantenida bajo agitación mecánica a 3000 rpm y luego fue almacenada a 4°C. La solución fue dispersada en placas de Petri. Las membranas obtenidas fueron secadas a 60°C hasta que alcanzar el 50% de la masa inicial. A continuación fueron inmersas en NaOH 1 M por 24 h a 25°C. Finalmente, fueron lavadas exhaustivamente con agua Milli-Q y almacenadas en agua Milli-Q a 4°C.

3.2.13.1.8.1. Funcionalización de membranas de CHS

La funcionalización de las membranas de CHS fue realizada de acuerdo el método propuesto por Sano y Murase (Sano and Murase 1980).

En primer lugar, la epiclorhidrina y cada aminoácido fueron mezclados en una proporción 1:1 en NaOH 2 M por 4 h a 60 °C. La solución luego fue llevada a 0°C y se agregó NaOH manteniendo una agitación constante.

Las membranas de CHS fueron agregadas a las soluciones conteniendo los aminoácidos y la epiclorhidrina. La reacción fue realizada a 65°C durante 16 h. A continuación fueron lavadas exhaustivamente con agua Milli-Q.

Los aminoácidos utilizados para la preparación de las membranas funcionalizadas fueron: L-aspártico (Asp), L-glutámico (Glu), L-histidina (His) y L-aurina (Tau), generando las siguientes membranas: CHS-Asp, CHS-Glu, CHS-His, CHS-Tau respectivamente.

La funcionalización con cobre fue realizada colocando las membranas funcionalizadas con aminoácidos en una solución de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 2,6 mM bajo agitación constante durante 60 h. Finalmente, las membranas fueron lavados con agua Milli-Q.

3.2.13.2. Caracterización de las matrices esféricas

3.2.13.2.1. Titulación de las matrices esféricas

Las matrices fueron lavadas en todos los casos con abundante agua destilada hasta que el pH se estabilizó en un valor entre 6,00 y 7,00. Luego se colocaron 0,50 g de matriz en dos recipientes con 10 mL de agua destilada cada uno, uno para la titulación ácida y otro para la titulación básica. Para la titulación ácida se usó HCl 0,2 M y para la básica, NaOH 0,1 M. Se procedió a realizar la titulación agregando pequeñas alícuotas de ácido o base, según corresponda, y agitando luego del agregado aproximadamente 4 o 5 min. Las lecturas fueron tomadas luego de unos minutos cuando fue lograda la estabilización del valor en el pHímetro (Hanna HI9017). Se realizaron agregados de manera que produjeran cambios de pH de aproximadamente 0,5 unidades. La carga total Q (mol/g) de la matriz se calculó en función del pH con la siguiente ecuación:

$$Q = \frac{C_a - C_b + [\text{OH}^-] - [\text{H}^+]}{m_s}$$

(3.4)

- Q= moles de carga/g de matriz
- C_a = concentración (final) de ácido agregado (teniendo en cuenta el volumen en que está la matriz)

- C_b = concentración (final) de base agregada (teniendo en cuenta el volumen en que está la matriz)
- $[OH^-]$ = concentración de oxhidrilos luego del equilibrio (se calcula a partir del pH)
- $[H^+]$ = concentración de protones luego del equilibrio (se calcula a partir del pH)
- $pH = -\log [H^+]$
- $[OH^-]$ se obtiene a partir de $K_w = [H^+] \times [OH^-]$
- m_s = concentración de la matriz en g/L

Finalmente se graficó Q vs. pH

3.2.13.2.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las matrices esféricas

Las matrices: CHS, CHS-G30, CHS-EPO, ALG-GA fueron deshidratadas en un equipo Liofilizador Modelo L-T8 (marca Rificor), utilizando una Temperatura de -40°C bajo vacío. Las matrices liofilizadas fueron luego analizadas utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido FEI QUANTA 200 F Feg a 12 Kev en bajo vacío a 0,35-0,5 mbar con un detector LFD (Large Field Detector).

3.2.13.3. Caracterización de las Membranas poliméricas

Las membranas, antes y después de la adsorción, fueron liofilizadas para remover el agua presente en los poros. Un equipo Labcomco (Freeze Dry System/ Freezone 4.5, Brazil) fue usado bajo vacío a una presión de 35×10^{-3} bar y a una temperatura de -65°C .

3.2.13.3.1. Microscopía Electrónica de Barrido de las Membranas de CHS

Las membranas liofilizadas fueron analizadas por SEM para estudiar la morfología de la superficie de las mismas. Las muestras fueron cubiertas con oro de 200 Å de espesor

utilizando un revestidor de bombardeo iónico EMITECH, Modelo K450 (Kent, Reino Unido).

Las muestras liofilizadas fueron examinadas usando un microscopio electrónico de barrido Leo 440i con detector Energía Dispersiva de Rayos X (EDS) modelo 6070 (Leo 440i, EDS 6070, SEM / EDS: LEO Electron Microscopy / Oxford Cambridge, Inglaterra).

3.2.13.3.2. Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de las matrices fueron obtenidos utilizando un espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier, Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Madison, USA) con accesorio ATR Smart Omni-Sampler. El barrido espectral fue realizado en un rango de número de onda de 4000 a 675 cm^{-1} con 4 cm^{-1} de resolución.

3.2.13.3.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

Los análisis fueron realizados utilizando un analizador termogravimétrico SHIMADZU modelo TGA-50 (Kyoto, Japón) bajo una atmósfera de nitrógeno. Las muestras fueron ubicadas en una celda de alúmina calentadas desde 22°C a 900°C, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

3.2.13.3.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Las mediciones de DSC fueron realizadas en un equipo Mettler Toledo DSC1 (Zurich, Suiza). Las muestras fueron calentadas desde -80°C a 350°C a una velocidad de calentamiento de 10 K/min bajo atmósfera de nitrógeno (velocidad de flujo: 50 mL/min).

3.2.13.4. Estudios de Cinética de adsorción de endoglucanasa sobre matrices poliméricas

3.2.13.4.1. Adsorción de endoglucanasa comercial (LCC) sobre matrices esféricas insolubles

Los estudios de la cinética de adsorción de la enzima endoglucanasa proveniente de una solución de LCC, se llevaron a cabo cuantificando la cantidad de enzima, a través de medidas de actividad endoglucanasa por el método del DNS, y proteínas totales libres en el sobrenadante por el método de Warburg.

El sistema se preparó con un volumen de matriz y solución de liofilizado de forma tal de obtener una relación mg proteínas/ g de matriz húmeda correspondiente a las condiciones de trabajo para cada caso, en un volumen de 5 mL del buffer de trabajo (buffer fosfato 50 mM pH 6,00 y 7,00, buffer citrato 50 mM pH 5,30). Se midió el tiempo, tomando como punto de partida el momento de agregado de la matriz y se realizaron mediciones a tiempos predeterminados durante 90 min, manteniendo al sistema bajo agitación suave. Durante los 90 min se tomaron muestras del sobrenadante para realizar las dos cuantificaciones mencionadas. El volumen retirado del sistema para llevar a cabo la medición de proteínas totales fue devuelto inmediatamente después de haber sido realizada la lectura. Las alícuotas retiradas para la determinación enzimática se consideraron despreciables ya que no modifica más que el 5% del volumen y no perturba el equilibrio del sistema.

3.2.13.4.1.1. Desorción de endoglucanasa de matrices insolubles

Se utilizaron los sistemas en los cuales se había llevado a cabo la adsorción tal como se explica en 3.2.10.4.1. Luego de la adsorción se filtró la matriz utilizando un colador

metálico de poro fino, la matriz se lavó con el buffer de trabajo correspondiente al utilizado en la etapa de adsorción. Se midió actividad endoglucanasa y la cantidad de proteínas totales en el volumen de lavado.

A continuación de la etapa de lavado, se filtró la matriz mediante el colador metálico y se incubó la misma en el buffer de trabajo utilizado en la adsorción pero incrementando la fuerza iónica, con el objetivo de favorecer la desorción de la enzima unida a la matriz insoluble. Se midió el tiempo, tomando como punto de partida el momento del agregado de dicho buffer a la matriz de trabajo y se realizaron mediciones de proteínas totales y de actividad enzimática a tiempos predeterminados durante 90 minutos, manteniendo el sistema en agitación suave.

3.2.13.4.1.2. Cálculo del rendimiento de la adsorción-desorción. Balance de masa.

La aplicación del procedimiento de adsorción y desorción de la endoglucanasa desde las matrices preparadas implica una serie de pasos que condicionan el cálculo del rendimiento global:

En la etapa de la adsorción se agrega sobre la matriz de trabajo, el buffer de trabajo correspondiente y la solución de LCC. El tiempo inicial es el momento de agregado de la matriz al cual se realiza la determinación de proteínas totales y actividad endoglucanasa.

Una vez finalizada la adsorción se descarta el sobrenadante al cual se le determina la cantidad de proteínas totales y actividad endoglucanasa. A continuación se procede al lavado de las matrices con el mismo volumen y el mismo buffer de trabajo utilizado en la etapa de adsorción. Se llevan a cabo las mismas determinaciones en el buffer de lavado.

Para el cálculo de proteína adsorbida se procedió a realizar la diferencia de masa entre el agregado inicial proteico y la masa de proteínas en el sobrenadante.

Luego se procedió a desorber la endoglucanasa desde la matriz, con distintas fuerzas iónicas dadas por la cantidad de NaCl agregado al buffer de trabajo utilizado en la adsorción.

La cantidad de proteína y enzima endoglucanasa en cada etapa de la adsorción fue expresada como mg proteína/ g de matriz húmeda y como U de actividad endoglucanasa/g de matriz húmeda respectivamente

3.2.13.4.2. Estudios Cinéticos de Adsorción de endoglucanasa de un cultivo fúngico sobre matrices insolubles

La cinética de adsorción de la enzima endoglucanasa sobre las matrices de CHS, CHS-G30, CHS-EPO, ALG-GA se llevó a cabo colocando en un vaso de precipitado 9,5 mL de agua destilada, 0,5 mL de extracto enzimático de un cultivo sólido sobre residuos de soja y 1,00 g de la matriz pesada en balanza analítica y con agitación orbital constante de 120 rpm. La actividad enzimática endoglucanasa y la concentración de proteínas totales en el sobrenadante fueron determinadas a distintos tiempos. Se consideró el tiempo cero o inicial en ausencia de la matriz, y luego se fijaron los tiempos de 15, 30, 60, 90 y 120 min. Se realizaron los blancos sin sustrato para cada uno de los tiempos determinados y el blanco sin enzima.

El volumen retirado del sistema para llevar a cabo la medición de proteínas totales fue devuelto inmediatamente después de haber sido realizada la lectura. Las alícuotas retiradas para la determinación de actividad enzimática se consideraron despreciables ya que no modifica más que el 5% del volumen y no perturba el equilibrio del sistema.

Basados en resultados previos (Beppu et al. 2004), se decidió llevar a cabo la adsorción en agua destilada controlando el pH del sistema cada 30 min. No se utilizó solución buffer dado que los contra-iones pueden interferir en el proceso de adsorción interaccionando con la matriz adsorbente (Beppu et al. 2004; Çetinus et al. 2009).

Una vez finalizada la adsorción, para realizar la etapa de lavado, se separó la matriz del líquido sobrenadante mediante la utilización de un colador metálico de poro fino. La matriz fue lavada colocándola en un vaso de precipitado con 10 mL de agua destilada y manteniendo agitación orbital constante a 120 rpm por 15 min.

Las matrices lavadas fueron sometidas a la desorción de la enzima por efecto del aumento de la fuerza iónica del medio. Para tal fin se colocaron en un vaso de precipitado, 10 mL de NaCl 250 mM y las esferas previamente lavadas y coladas. Se determinaron la actividad enzimática y la concentración de proteínas totales en el sobrenadante a distintos tiempos fijos de 15, 30, 60, 90 y 120 min, tomando como tiempo cero el momento en que la matriz toma contacto con NaCl. Durante el transcurso de la desorción se mantuvo el sistema en agitación orbital constante a 120 rpm.

3.2.13.4.3. Cálculos de Factor de Purificación y Rendimiento de endoglucanasa

Se realizaron los cálculos correspondientes para obtener los Porcentajes de Rendimiento (%R) y Factores de Purificación (FP), en base a las mediciones de actividad enzimática y proteínas totales de cada una de las fracciones, de modo de evaluar la efectividad del proceso bioseparativo.

Aplicando la ecuación 3.5 se determinaron las actividades específicas en cada uno de los casos.

$$Actividad\ específica_x = \frac{Actividad_x}{[Proteína]_x}$$

(3.5)

donde “x” representa la fracción de desorción, según el tiempo.

Con los datos previamente mencionados y aplicando la ecuación 3.6 fueron calculados los factores de purificación. El FP representa el número de veces que aumenta la actividad específica en el sobrenadante respecto a la actividad específica en el control.

$$\text{Factor de Purificación} = \frac{\text{Act. específica}_x}{\text{Act. específica}_{\text{control}}} \quad (3.6)$$

donde “control” representa la fracción de adsorción a tiempo cero.

Para la determinación del rendimiento se utilizó la ecuación 3.7. El %R representa el porcentaje de actividad retenida respecto de la inicial.

$$\%R = \frac{\text{Actividad}_x}{\text{Actividad}_{\text{control}}} \cdot 100 \quad (3.7)$$

3.2.13.4.4. Análisis estadístico de la adsorción de endoglucanasa de un extracto fúngico sobre matrices poliméricas

Las variables purificación y rendimiento fueron analizadas mediante un ANOVA Bifactorial, considerando en el modelo la interacción de primer orden Matriz-Tiempo. En todos los casos, se verificaron los supuestos requeridos por la técnica tanto de manera gráfica como a través de pruebas de hipótesis (Normalidad: Test de Anderson-Darling; Homocedasticidad: Test de Levene). Luego, las medias de los tratamientos fueron comparadas de a pares a través del método de comparaciones múltiples de Tukey, mediante el procedimiento *lsmeans* del paquete homónimo (Lenth R.V. 2015) del software estadístico R 3.2.3 (Team 2015). Se consideró significativo un $p < 0,05$.

3.2.13.4.5. Adsorción de endoglucanasa sobre membranas de CHS

Las membranas de CHS sintetizadas fueron inmersas en una solución de endoglucanasa comercial de Megazyme (EG) 5% V/V. La adsorción se llevó a cabo por 3 h a 25°C y 200 rpm. Luego las membranas fueron retiradas de la solución.

El porcentaje de adsorción de endoglucanasa fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$EG \text{ adsorption}(\%) = \frac{(A_i - A_f)}{A_i} \times 100$$

(3.8)

donde A_i (U/L) y A_f (U/L) son las actividades endoglucanasa antes y después de la adsorción, respectivamente.

3.2.14. Procesamiento de datos experimentales

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado de manera que el error relativo no supere el 5% para así poder asegurar la reproducibilidad de los estudios. El ajuste estadístico de los datos experimentales se realizó utilizando el programa *Sigma Plot* versión 10.0 para Windows, que emplea el algoritmo Marquardt-Levenber (Marquardt 1963).

Capítulo 4. Resultados *y Discusión*

Capítulo 4 Resultados y Discusión: Caracterización de endoglucanasa

4.1. Determinación de la temperatura óptima de actividad endoglucanasa y condiciones de estabilidad frente a pH y temperatura

4.1.1. Determinación de la temperatura óptima de actividad endoglucanasa

En la Figura 4.1 están representadas las determinaciones de actividad endoglucanasa de un liofilizado comercial de la enzima (LCC), a distintas temperaturas y para diferentes tiempos de incubación a cada temperatura. Puede observarse que presenta mayor actividad enzimática a 50°C y 65°C, no existiendo diferencia significativa entre las mismas. Por otra parte, para cada temperatura ensayada la actividad endoglucanasa disminuye cuando aumenta el tiempo de incubación.

Según bibliografía previa (Sohail et al. 2009; Farinas et al. 2011), y de acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionaron un tiempo de incubación de 10 min y una temperatura de incubación de 50°C para las medidas de actividad endoglucanasa.

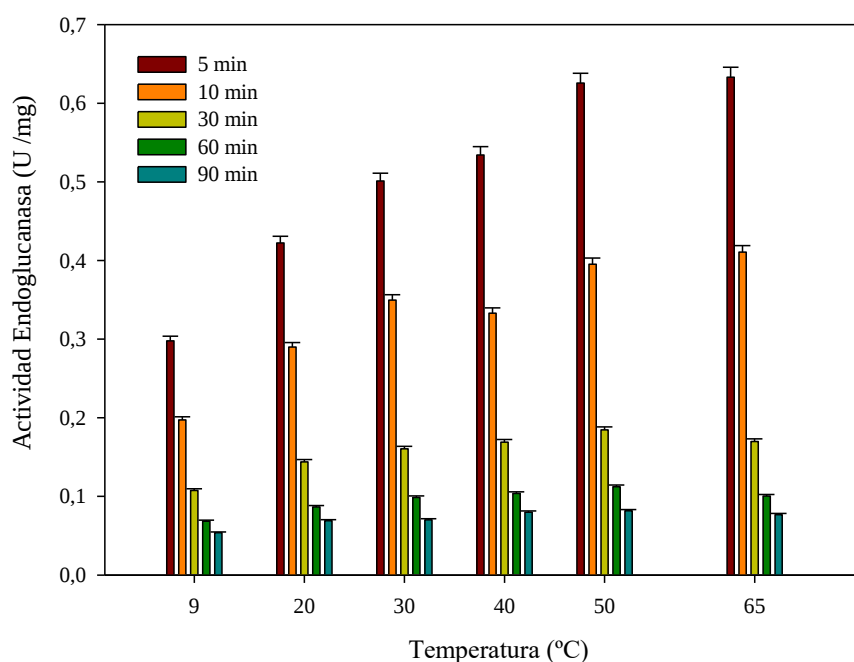


Figura 4.1: Determinación de tiempo y temperatura óptima para la medición de actividad endoglucanasa

4.1.2. Determinación de estabilidad endoglucanasa frente a la temperatura

En la Figura 4.2 se representa la actividad enzimática a diferentes temperaturas habiendo preincubado la misma durante diferentes tiempos. Se observa que la endoglucanasa presenta mayor estabilidad a 30°C y 50°C, registrándose la máxima estabilidad a una temperatura de 50°C. Por otra parte se puede apreciar una notable disminución de su actividad cuando la misma es preincubada a 65°C. Para cada una de las temperaturas estudiadas no se observan diferencias significativas en la estabilidad de la enzima para los distintos tiempos de incubación. Por lo tanto podría utilizarse la enzima aún cuando haya estado sometida a un precalentamiento de hasta 180 min sin que disminuya notoriamente su actividad a 30°C y 50°C.

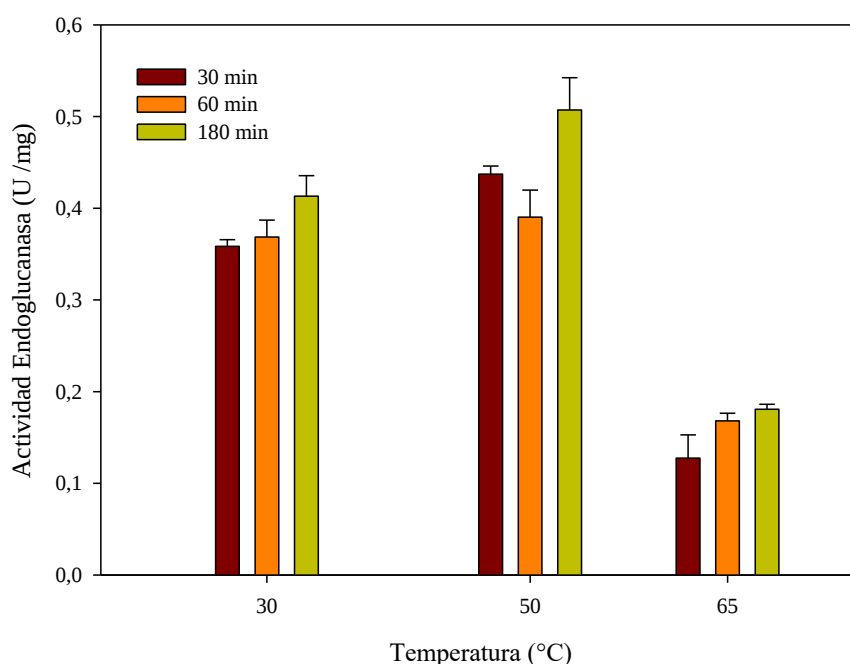


Figura 4.2: Determinación de Temperatura de estabilidad endoglucanasa

4.1.3. Determinación de estabilidad endoglucanasa frente al pH

En la Figura 4.3 se muestra la actividad endoglucanasa del liofilizado comercial a los diferentes valores de pH y a distintos tiempos. No se observa una diferencia significativa de la actividad enzimática para un tiempo de incubación de 30 min a los distintos pH estudiados. No obstante, a los 60 min, la actividad es mayor a los pH 5,30 y 6,00 con respecto a los pH 3,00 y 4,00. A pH 3,00 presenta una disminución de la actividad a los 120 y 180 min con respecto a los demás pH estudiados indicando que a este pH de trabajo la enzima no es estable a partir de tiempos de incubación mayores a 120 min.

Por lo tanto a tiempos menores a 60 min la estabilidad de la enzima no se ve afectada a los diferentes valores de pH estudiados.

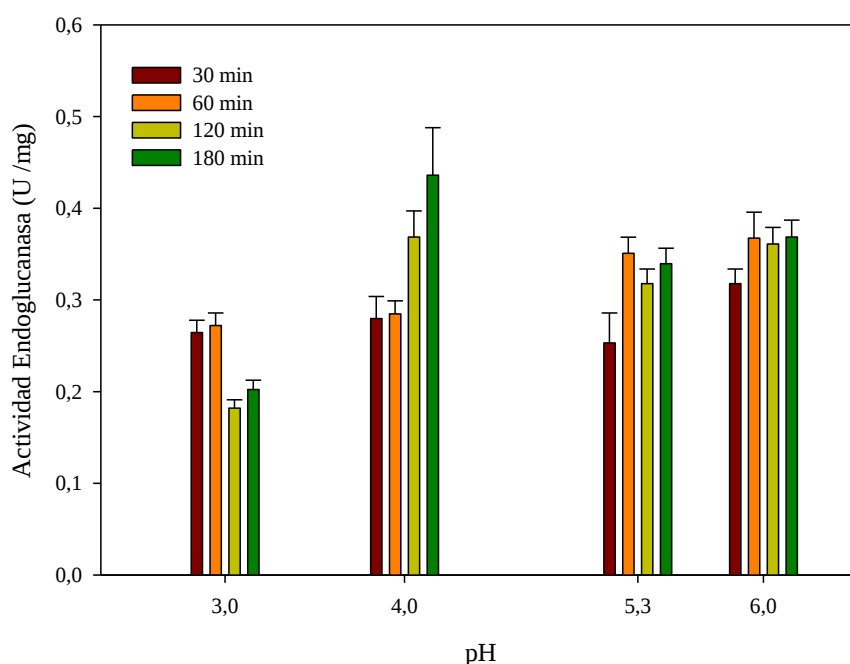


Figura 4.3.: Determinación de pH de estabilidad de endoglucanasa

4.1.4. Espectros de Dicroísmo circular a diferentes valores de pH

La estructura secundaria de la endoglucanasa comercial purificada adquirida de Megazyme (EG), fue analizada mediante espectropolarimetría (Fasman and Price 1996). Los espectros de DC en el UV lejano de EG presentan un pico positivo a 195 nm y pico negativo a 216 nm, que es un típico perfil observado para proteínas que presentan estructuras β -lámina antiparalelas (Greenfield 2006). Resultados similares se han encontrado en la enzima endoglucanasa de *Aspergillus niger* (Khademi et al. 2002). En este caso se estudió la estructura secundaria de la EG a los diferentes pH analizados. Se observó una mayor disminución del contenido de estructura secundaria a pH 5,30 y 6,00 respecto de los otros pH estudiados (Figura 4.4). A ambos pH la estructura secundaria es similar. A pH 4,00 el contenido de estructura es mayor lo cual no está en correlación con el pH de máxima estabilidad.

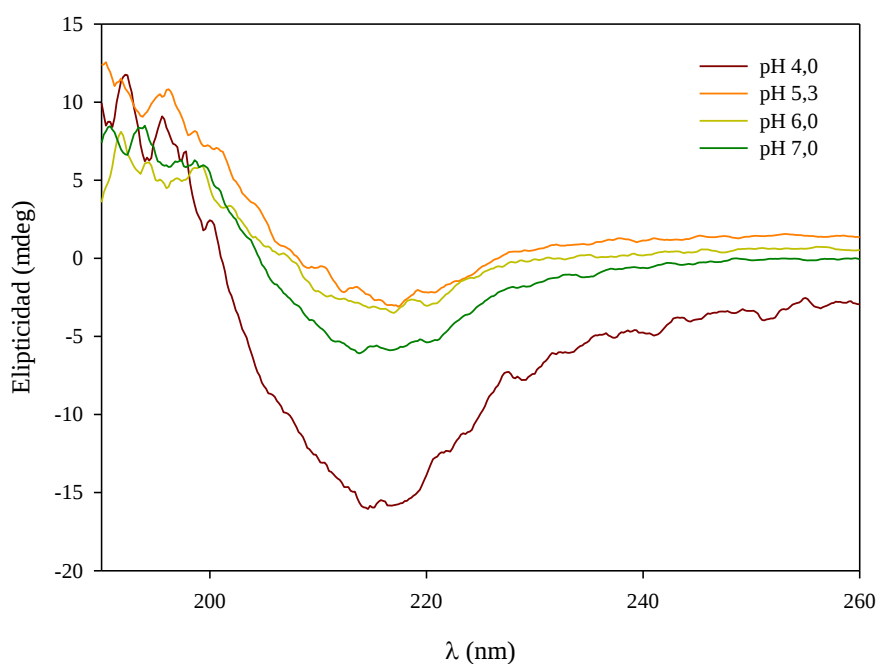


Figura 4.4.: Espectros de DC en el UV lejano de EG 5,0 μM
a diferentes valores de pH. Temperatura 20°C.

4.1.5. Extinción de la fluorescencia de endoglucanasa nativa a diferentes valores de pH

En la Figura 4.5 se muestran los gráficos de Stern-Volmer (I_f^0/I_f vs. $[\text{quencher}]$) de la EG a diferentes valores de pH.

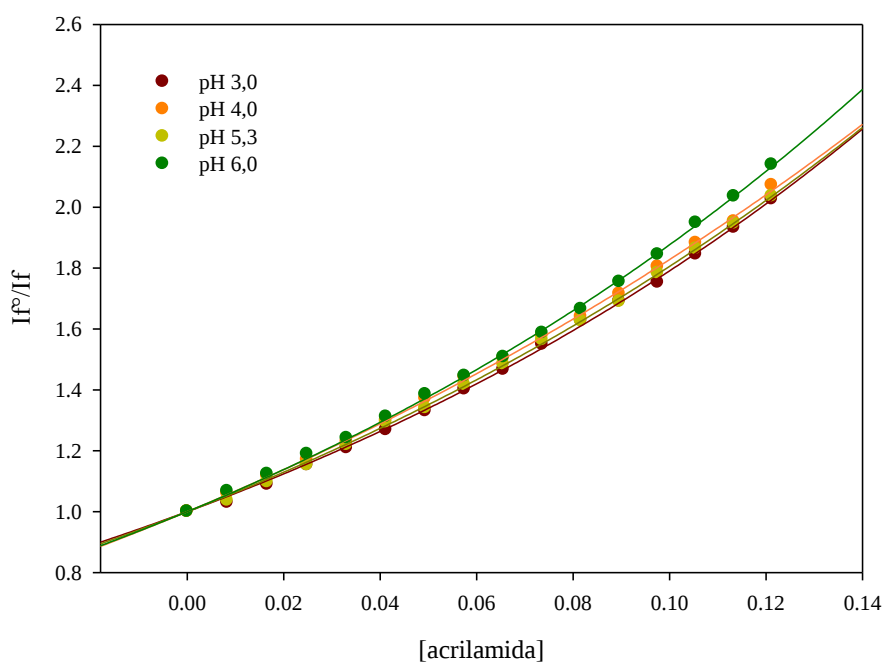


Figura 4.5.: Quenching de la fluorescencia nativa de la endoglucanasa a distintos valores de pH ajustado a la ecuación de Stern-Volmer. $[EG] = 0,8 \mu M$. Temperatura $25^\circ C$.

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 5.I: Parámetros de quenching de la EG con acrilamida a diferentes valores de pH, según el modelo de esfera de acción

pH	K_D	$V(cm^3)$	$r (\text{\AA})$
3,00	0,87	$8,28 \cdot 10^{-21}$	12,55
4,00	3,75	$4,72 \cdot 10^{-21}$	10,41
5,30	2,37	$6,27 \cdot 10^{-21}$	11,44
6,00	2,36	$6,92 \cdot 10^{-21}$	11,82

El valor de K_D fue menor cuando el pH fue de 3,00 y máximo cuando se trabajó a un pH de 4,00. Prácticamente no hubo diferencia entre los valores de radio de la esfera de acción y K_D obtenidos a los pH 5,30 y 6,00. En cuanto al volumen (o radio) de la esfera de acción, éste fue mayor a pH 3,00 y menor a pH 4,00. La constante de *quenching* de Stern-Volmer, tal como se mencionó en la sección 1.6.2. de la Introducción, es el producto del tiempo de vida media del fluoróforo y la constante de *quenching* bimolecular, siendo esta 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 a pH 3,00 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, el mayor valor de radio obtenido para la endoglucanasa en pH 3,00 indicaría 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 endoglucanasa se encuentra a valores de pH mayores a 4,00 se observaron mayores valores de K_D y menores radios de la esfera de acción.

Se puede asumir que a pH 3,00 disminuye la accesibilidad o afinidad del *quencher* por la enzima, disminuyendo su capacidad de interaccionar con dominios proteicos.

Capítulo 5. Resultados *y Discusión*

Capítulo 5. Resultados y Discusión: Producción de celulasas fúngicas

5.1. Evaluación del Crecimiento Radial a través del tiempo en cepas fúngicas

productoras de celulasas

Se analizó el crecimiento radial de cepas fúngicas productoras de celulasas través del tiempo para la selección de las mismas con el objeto de realizar estudios posteriores en fermentación en estado sólido (FES).

La Figura 5.1 muestra el avance radial de los micelios en tres cepas de hongos: *Trichoderma harzianum* T104, *Aspergillus niger* GH1, *Aspergillus niger* NRRL3 durante 96 h.

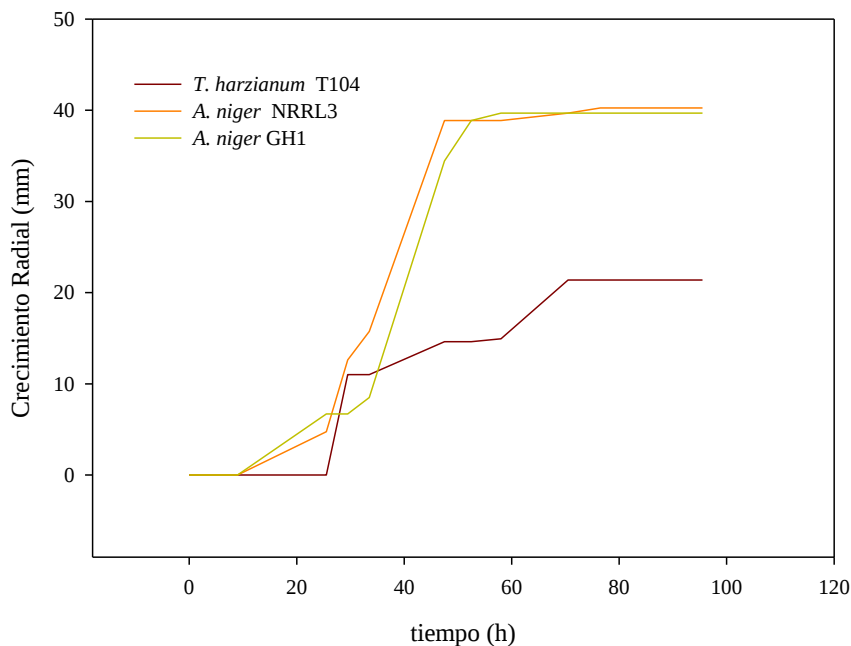


Figura 5.1: Crecimiento radial tiempo y temperatura óptima para la medición de de actividad endoglucanasa

Debido a que los datos de crecimiento radial han sido recolectados a través del tiempo, se llevó adelante un análisis estadístico longitudinal a través de un modelo mixto de

medidas repetidas. Según el análisis de la estructura de correlación de las medidas de crecimiento de las cepas en el tiempo, se determinó que la mejor alternativa para modelar los datos es la estructura autorregresiva.

El modelo de medidas repetidas considerado, reveló que existe relación entre el tipo de cepa y el tiempo de crecimiento ($p < 0,0001$) para al menos una de las cepas. Evaluando luego los contrastes de a pares de los medidas de crecimiento para cada cepa, se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al crecimiento en el tiempo de las cepas *A. niger* NRRL3 y *A. niger* GH1 ($p = 0,5841$), mientras que se hallaron diferencias entre cada una de éstas y la cepa *T. harzianum* T104 (*A. niger* NRRL3 vs *T. harzianum* T104: $p = 0,0369$ y *A. niger* GH1 vs *T. harzianum* T104: $p = 0,0036$).

La velocidad de crecimiento radial (V_r) se obtuvo de la pendiente de la recta determinada en la fase exponencial del crecimiento del hongo de la gráfica crecimiento radial (mm) vs. tiempo (h). Luego de realizar la regresión lineal para cada conjunto de datos se obtuvieron los resultados que se observan en la Tabla 5.I.

Tabla 5.I: Velocidad de Crecimiento Radial

Cepa	V_r (mm.h ⁻¹)	R^2
<i>T. harzianum</i> T104	0,2809	0,9605
<i>A. niger</i> NRRL3	1,5262	0,9929
<i>A. niger</i> GH1	1,2129	0,9978

A. niger GH1 y *A. niger* NRRL3 presentaron valores de V_r superiores a *T. harzianum* T104, siendo cuatro y cinco veces mayor respectivamente. Por los resultados obtenidos las cepas de *Aspergillus niger* fueron seleccionadas para los estudios posteriores.

5.2. Producción de celulasa en FES sobre marlo de maíz blanco

Uno de los desafíos en este trabajo de Tesis es el empleo de desechos provenientes de diversas actividades productivas como fuentes de carbono y soportes de crecimiento para la obtención de celulasas bajo fermentación en estado sólido. En este caso se utilizó marlo de maíz blanco, el principal residuo agroindustrial de la zona de Saltillo, Coahuila, México, el cual también es un residuo de fácil obtención en nuestra zona, y por otra parte la cepa de *Aspergillus niger* GH1 para los estudios de FES durante la estadía.

5.2.1. Determinación de pH en FES sobre marlo de maíz blanco

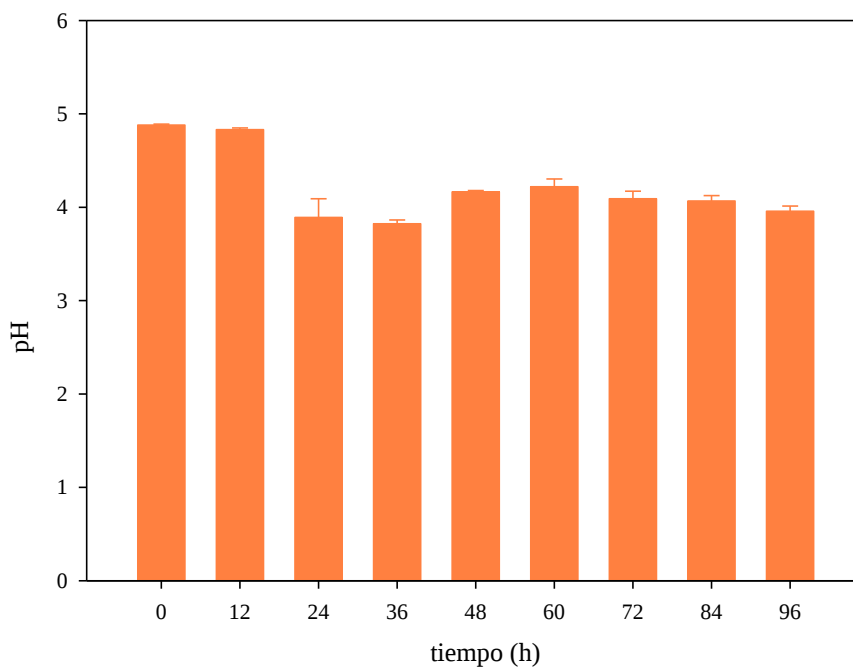


Figura 5.2: pH vs tiempo en FES sobre marlo de maíz

La Figura 5.2 muestra los valores de pH del extracto fúngico obtenido del cultivo en medio sólido sobre marlo de maíz blanco utilizando la cepa *Aspergillus niger* GH1.

Según la gráfica, el pH se mantuvo en un rango de 3,80 – 4,80 observándose un mínimo a las 36 h. La acidificación del extracto observada podría deberse a la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* (Vandenberghe et al. 2000).

5.2.2. Actividad exoglucanasa y β -glucosidasa en FES sobre marlo de maíz blanco

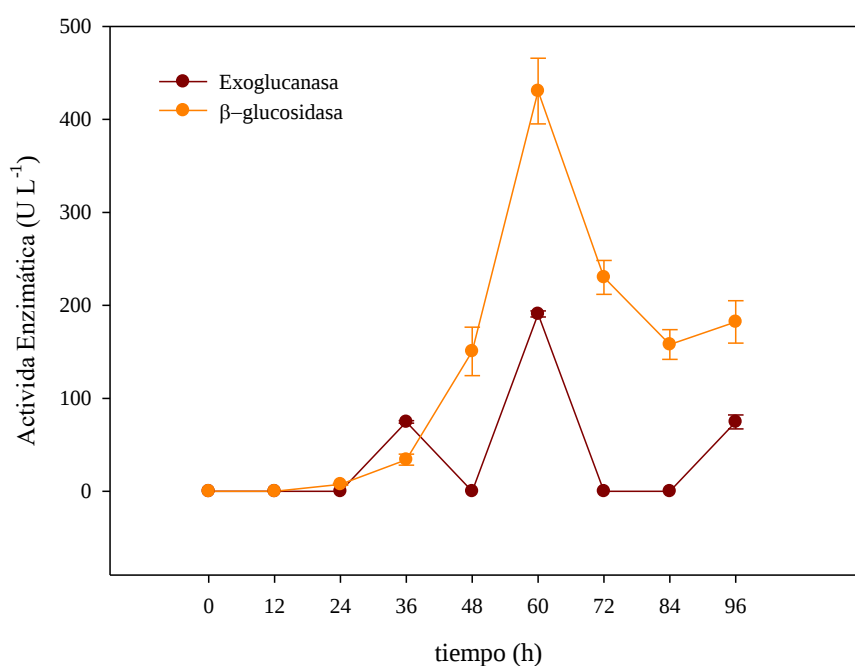


Figura 5.3: Actividad exoglucanasa y β -glucosidasa vs tiempo en FES sobre marlo de maíz

En la Figura 5.3 está representada la actividad exoglucanasa y β -glucosidasa determinada durante 96 h en el extracto fúngico obtenido del cultivo en medio sólido sobre marlo de maíz blanco.

Según la Figura 5.3 se observa una máxima actividad exoglucanasa y β -glucosidasa a las 60 h de la FES sobre marlo de maíz blanco siendo de 190,75 U L⁻¹ y 430,46 U L⁻¹ respectivamente.

5.2.3. Determinación cualitativa de endoglucanasa en el extracto fúngico obtenido de FES en marlo de maíz blanco

Debido a que no se pudo cuantificar actividad endoglucanasa por métodos espectrofotométricos (método del DNS), se realizó un análisis cualitativo.

Se seleccionaron los extractos fúngicos obtenidos a las 0 h, 72 h y 96 h y se sembraron los mismos en un equipo de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) para separar azúcares presentes en el extracto que podrían estar inhibiendo la reacción enzimática para la detección de la enzima endoglucanasa.

Se obtuvieron 13 tubos por cada muestra sembrada. Se sembraron en forma creciente y consecutiva del 1 al 7 en la primer fila y del 8 al 13 en la segunda fila para cada tiempo en la placa conteniendo agar 1% P/V y CMC 0,2% P/V en buffer acetato 50 mM a pH 4,50. La Figura 5.4 muestra los halos claros de actividad endoglucanasa contra el *background* rojo.



Figura 5.4: Actividad cualitativa endoglucanasa sobre los extractos fúngicos a 0, 72 y 96 h tratados con FPLC

No se detectó actividad endoglucanasa a tiempo 0 h. Por el contrario se obtuvieron halos claros a las 72 h en las muestras recogidas entre los tubos 2 y 13, y a las 96 h en las muestras recogidas del tubo 1 al 13. Estos resultados indican que la fermentación en estado sólido sobre marlo de maíz blanco por *A. niger* GH1 produjo actividad endoglucanasa al menos a las 72 h y 96 h del inicio de la fermentación.

5.2.4. SDS-PAGE y análisis de Zimograma de actividad endoglucanasa del extracto fúngico de la FES sobre marlo de maíz blanco

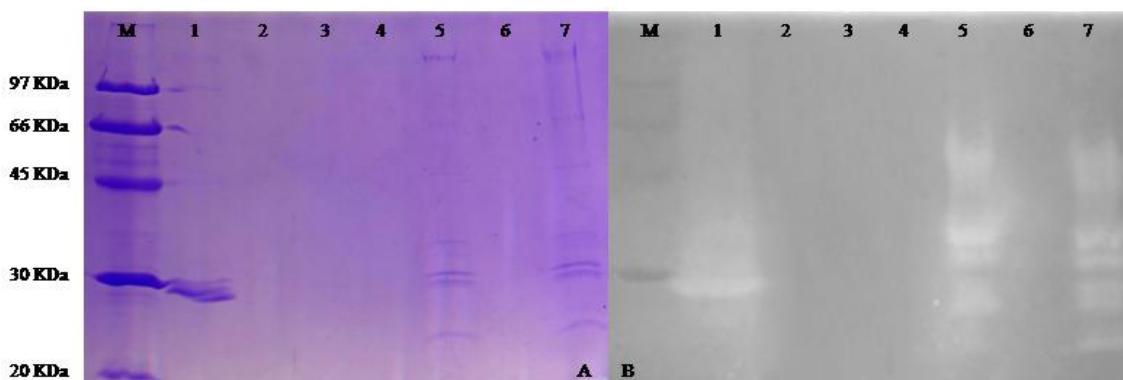


Figura 5.5: Geles de poliacrilamida-SDS seguidos por la tinción para visualización de proteínas (A) y actividad endoglucanasa (B) del extracto fúngico del cultivo sobre marlo de maíz blanco para los tiempos 0 h, 72 h, 96 h. Marcadores de PM: Fosforilasa b (97 KDa), Albúmina (66 KDa), Ovoalbúmina (45 KDa), Anhidrasa carbónica(30 KDa), Inhibidor de Tripsina (20 KDa) (calle M). Endoglucansa Megazyme de 27 KDa (calle 1). Extracto fúngico 0 h tratado con FPLC (calle 3). Extracto fúngico 72 h tratado con FPLC (calle 5). Extracto fúngico 96 h tratado con FPLC (calle 7).

La producción de proteínas del cultivo de *A. niger* GH1 sobre marlo de maíz blanco fue analizada por SDS-PAGE. La Figura 5.5 (A) muestra los patrones proteicos del extracto fúngico del cultivo sobre marlo de maíz blanco tratados con FPLC a los tiempos 0, 72 y 96 h. No se observan bandas proteicas en el extracto fúngico correspondiente al tiempo 0 h del cultivo sobre marlo de maíz blanco. Por el contrario en el extracto fúngico

correspondiente a las 72 h y 96 h se observan bandas de proteínas de 136, 66, 50, 35, 30 y 24 KDa.

La Figura 5.5 (B) muestra las mismas muestras después de la tinción con Rojo Congo para la visualización de actividad endoglucanasa. El análisis del zimograma revela la presencia de al menos seis bandas de actividad endoglucanasa comprendidas en un rango de pesos moleculares entre 20 KDa y 66 KDa para el extracto fúngico a las 72 h y 96 h del inicio de la fermentación. Algunas bandas coinciden con el patrón proteico obtenido en la Figura 5.5 (A), sin embargo aparecen otras nuevas probablemente debido a la mayor sensibilidad de la técnica de tinción con Rojo Congo.

Estos resultados coinciden con trabajos previos que han informado producción de endoglucanasa de diferentes pesos moleculares por otros microorganismos (Sun et al. 2008; Zhou et al. 2008; Liu et al. 2011).

5.2.5. Proteínas totales en FES sobre marlo de maíz blanco

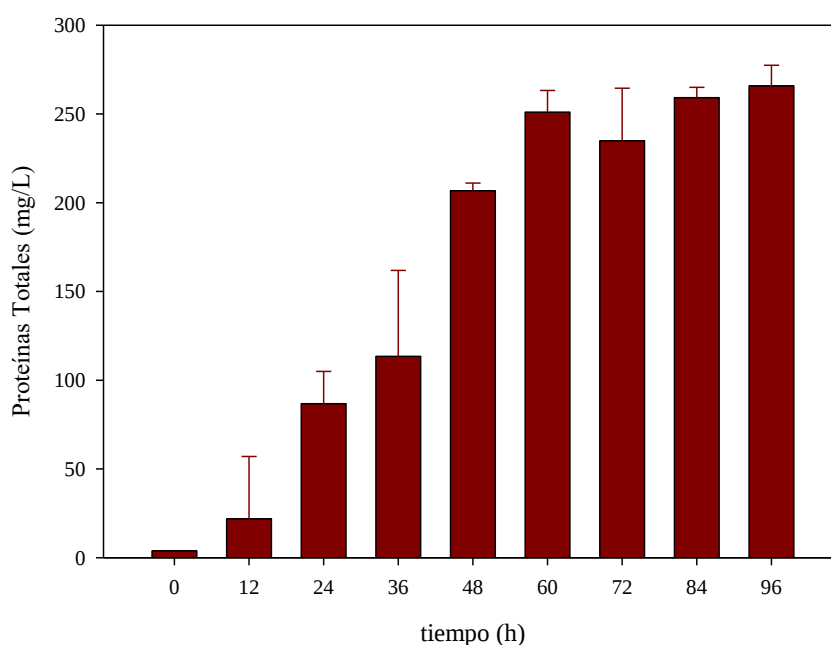


Figura 5.6: Proteínas totales vs tiempo en FES sobre marlo de maíz

La Figura 5.6 muestra las proteínas totales producidas por fermentación en estado sólido por *A. niger* GH1 en marlo de maíz blanco durante 96 h.

Se observa un incremento de las proteínas totales a través del tiempo alcanzándose el máximo a las 96 h de la FES. Sin embargo no se observa diferencia significativa entre los tiempos 60 h y 96 h. Este hecho es coincidente con lo observado en la Figura 5.5 (A) donde no se visualiza diferencia en la intensidad de las bandas proteicas correspondientes a los extractos fúngicos de 72 h y 96 h.

5.2.6. Actividad específica exoglucanasa y β -glucosidasa en FES sobre marlo de maíz

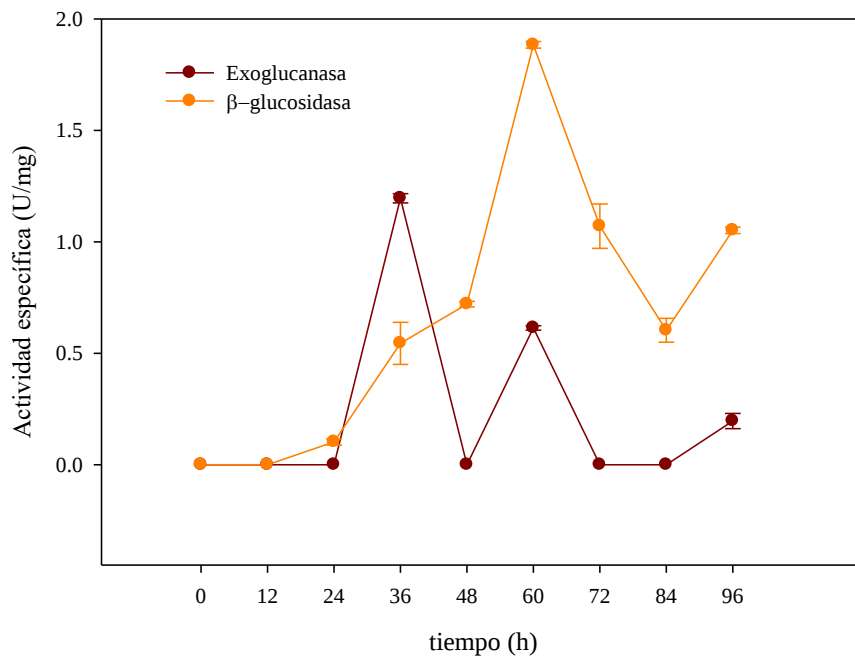


Figura 5.7: Actividad específica exoglucanasa y β -glucosidasa vs tiempo en FES sobre marlo de maíz

La Figura 5.7 representa la actividad específica exoglucanasa y β -glucosidasa obtenida del cultivo sobre marlo de maíz blanco a través del tiempo.

Los resultados muestran que la actividad específica fue máxima a las 36 h para exoglucanasa y a las 60 h para β -glucosidasa. Estos resultados además indican que la extracción selectiva de los cultivos a los tiempos de máxima actividad específica podría mejorar las condiciones para una futura purificación de las diferentes enzimas que conforman el complejo celulolítico.

5.2.7. Productividad volumétrica de exoglucanasa y β -glucosidasa en FES sobre marlo de maíz

En todo proceso, el tiempo es una variable importante a tener en cuenta para diseñar un modelo óptimo de trabajo, siendo la productividad volumétrica uno de los parámetros más importantes para caracterizar el tiempo de obtención de un producto deseado.

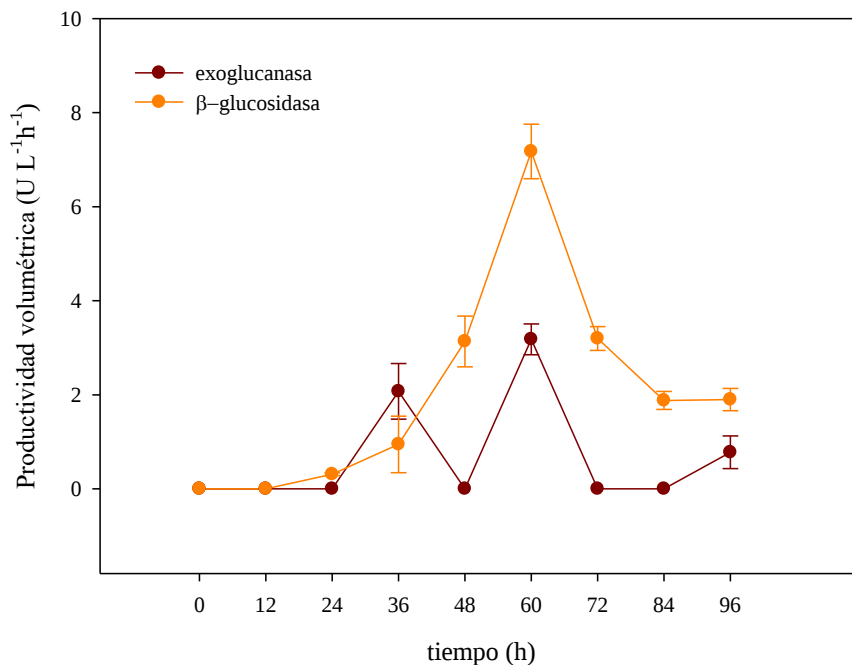


Figura 5.8: Productividad volumétrica exoglucanasa y β -glucosidasa vs tiempo en FES sobre marlo de maíz

La Figura 5.8 muestra la productividad volumétrica exoglucanasa y β -glucosidasa a través del tiempo. La productividad volumétrica resultó máxima a las 60 h para ambas enzimas. Este resultado podría considerarse para la producción de estas enzimas en mayor escala, dado que la obtención de la máxima productividad a menores tiempos de la fermentación disminuiría los costos del proceso.

5.3. Fermentación en estado sólido sobre cáscaras de soja y papel residual

Debido a la ubicación geográfica de Rosario, resultan accesibles los productos provenientes de la actividad agrícola la cual es una actividad muy explotada en la zona. Es por esto que se propuso emplear cáscaras de soja como fuente de carbono y soporte de crecimiento. Se utilizó además papel residual debido a que también es un importante producto de desecho. En este caso se utilizó la cepa *Aspergillus niger* NRRL3 para los siguientes estudios de FES.

5.3.1. Caracterización fisicoquímica de los soportes cáscaras de soja y papel para FES

Las propiedades del soporte tienen un rol importante en las tasas de crecimiento de microorganismos (Manpreet et al. 2005).

La Tabla 5.II muestra los parámetros fisicoquímicos: índice de absorción de agua (WAI), punto de humedad crítico (CHP), densidad de empaquetamiento (PD) de los soportes cáscaras de soja y papel residual. Ambos soportes ensayados presentaron valores de CHP por debajo del 40%, límite recomendado para el crecimiento de *A. niger* en FES (Moo-Young et al. 1983).

El valor de WAI fue más alto en cáscaras de soja, el cual es un 37% mayor que el obtenido en papel. Según bibliografía previa (Robledo et al. 2008), los materiales con

alto WAI son más aptos dado que cooperan con el crecimiento y desarrollo del microorganismo.

El alto valor de WAI y bajo valor de CHP obtenidos en cáscaras de soja hace que sea un excelente material para ser utilizado como soporte en FES. Además el valor más bajo de PD fue obtenido con cáscaras de soja. Los soportes con menores valores de PD son más indicados dado que un incremento en la densidad de empaquetamiento puede reducir el espacio vacío entre las partículas y así reducir el área de intercambio con la atmósfera circundante y la transferencia de partículas (Barrios-González et al. 1993).

Tabla 5.II: Parámetros fisicoquímicos de los soportes cáscaras de soja y papel residual

Soportes	WAI (g/g)	CHP (%)	PD (g/cm ³)
Cáscaras de soja	4,69 ± 0,06	11,0 ± 0,7	17,86 10 ⁻² ± 5.10 ⁻³
Papel	3,4 ± 0,2	9,2 ± 0,7	20,50 10 ⁻² ± 7, 10 ⁻³

5.3.2. Producción de biomasa en la FES sobre cáscaras de soja y papel residual

La glucosamina (C₆H₁₃NO₅) es un amino-azúcar que se encuentra principalmente en el exoesqueleto de crustáceos y artrópodos, y forma parte de la pared celular de hongos y otros microorganismos siendo el monosacárido más abundante. La cuantificación de la misma permite estimar el contenido de biomasa en el cultivo (Blix 1948).

En la Figura 5.9 está representado el contenido de biomasa producido por el cultivo de *A. niger* NRRL3 sobre cáscaras de soja y papel residual.

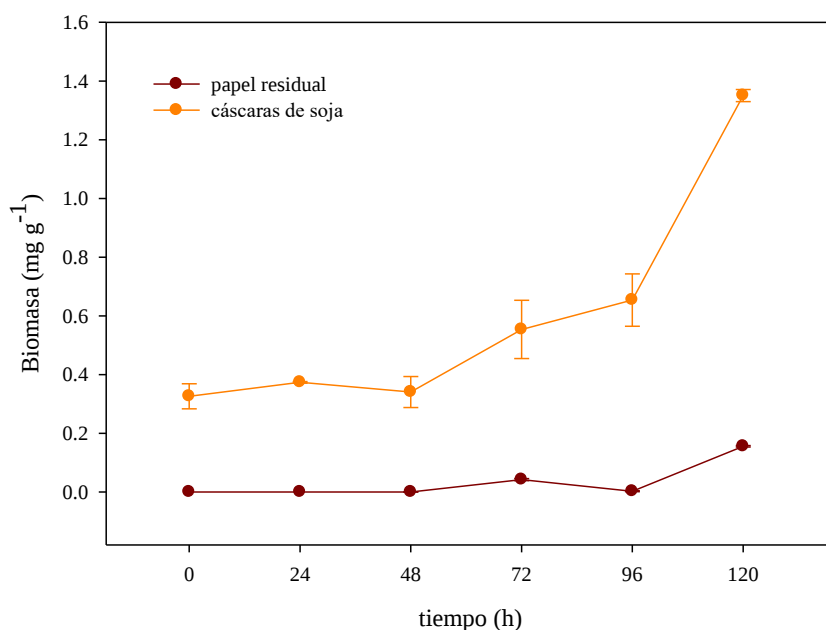


Figura 5.9: Producción de biomasa a través del tiempo

A. niger NRRL3 presentó una máxima producción de biomasa a las 120 h en cáscaras de soja. Este valor resultó ocho veces mayor al obtenido a las 120 h utilizando papel residual.

5.3.3. Producción de celulasas en la FES sobre cáscaras de soja y papel residual

La actividad de las tres enzimas que conforman el complejo celulolítico fue determinada separadamente.

Las Figuras 5.10, 5.11 y 5.12 muestran las actividades endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa, respectivamente, obtenidas de la FES sobre los soportes cáscaras de soja y papel residual a través del tiempo.

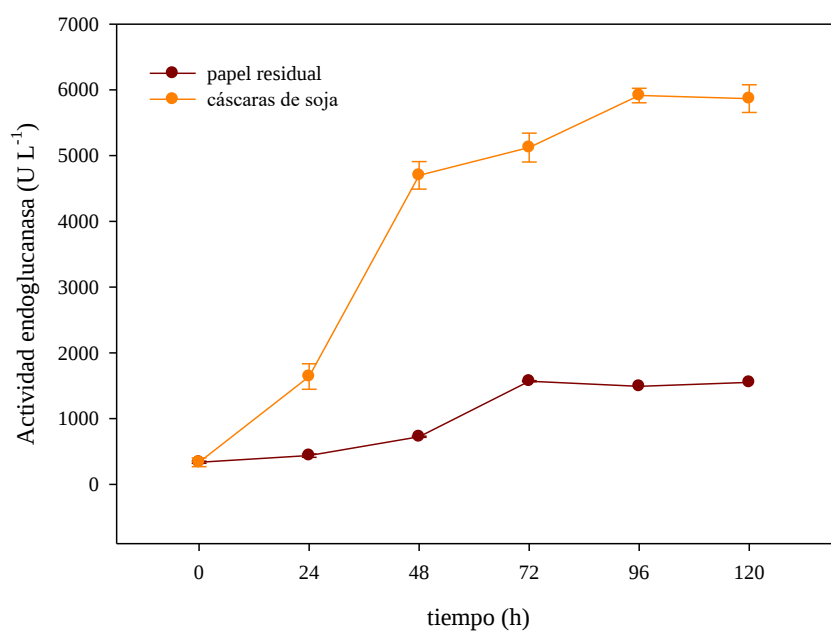


Figura 5.10: Actividad endoglucanasa a través del tiempo

En la FES sobre cáscaras de soja se obtuvo mayor actividad endoglucanasa para todos los tiempos estudiados (Figura 5.10). La misma situación se encontró para las actividades exoglucanasa y β -glucosidasa (Figuras 5.11 y 5.12).

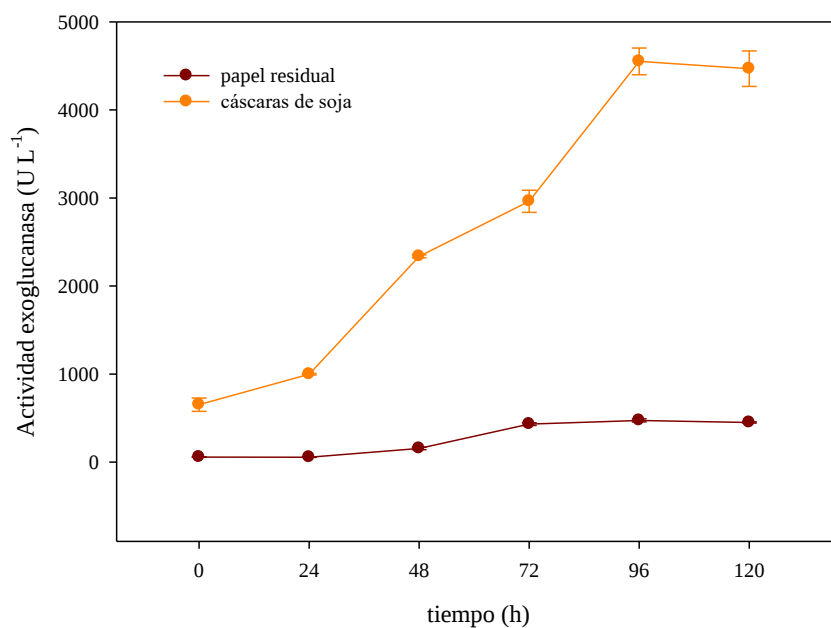


Figura 5.11: Actividad exoglucanasa a través del tiempo

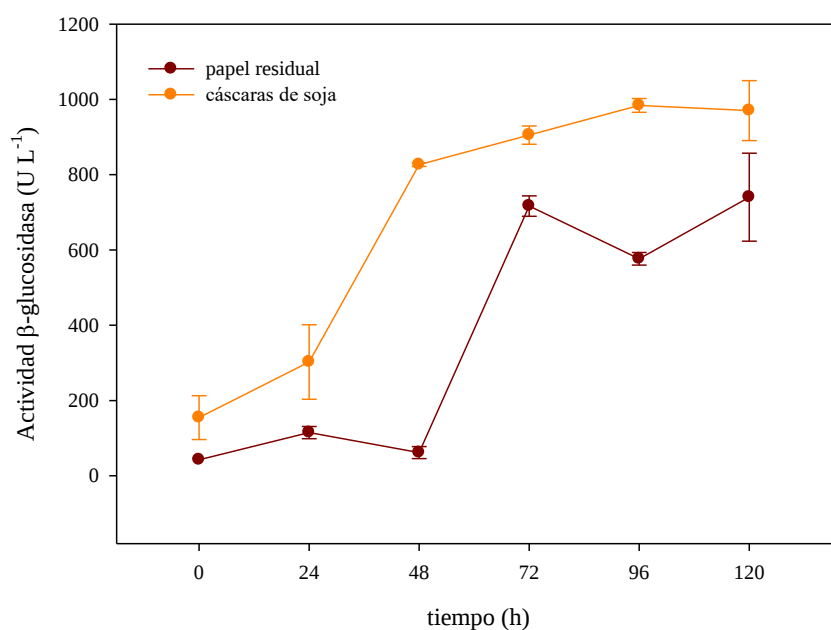


Figura 5.12: Actividad β -glucosidasa a través del tiempo

La máxima actividad endoglucanasa fue encontrada a las 96 h (5914 U L^{-1}), siendo cuatro veces mayor que la obtenida usando papel al mismo tiempo de fermentación. La actividad exoglucanasa en cáscaras de soja fue máxima a las 96 h (4551 U L^{-1}), siendo nueve veces mayor a la obtenida en papel al mismo tiempo de fermentación. La Figura 5.12 muestra que la máxima actividad β -glucosidasa en cáscaras de soja (984 U L^{-1}) fue lograda a las 96 h siendo dos veces mayor a la obtenida en papel.

Estos resultados sugieren que el soporte de cáscaras de soja contiene los nutrientes apropiados para una óptima producción del complejo celulolítico. El alto valor de WAI y el bajo valor de PD obtenidos en cáscaras de soja podrían favorecer la producción de celulasa y el desarrollo y crecimiento del hongo.

5.3.4. Proteínas totales en FES sobre cáscaras de soja y papel residual

La Figura 5.13 muestra las proteínas totales producidas por fermentación en estado sólido de *A. niger* NRRL3 sobre los soportes papel residual y cáscaras de soja.

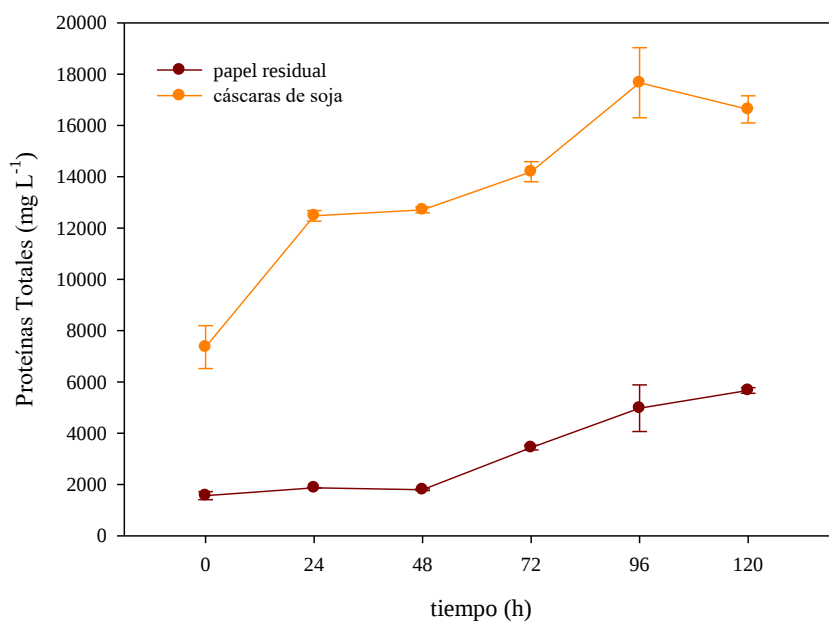


Figura 5.13: Proteínas totales a través del tiempo

La FES sobre cáscaras de soja produjo mayor concentración de proteínas para todos los tiempos de fermentación estudiados. El máximo fue logrado a las 96 h de la FES (17667 mg L⁻¹).

5.3.5. Productividad volumétrica celulasa en la FES sobre papel residual y cáscaras de soja

Las figuras 5.14, 5.15, 5.16 muestran las productividades volumétricas endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa, respectivamente, obtenidas en la fermentación en estado sólido de *A. niger* NRRL3 sobre los soportes papel residual y cáscaras de soja.

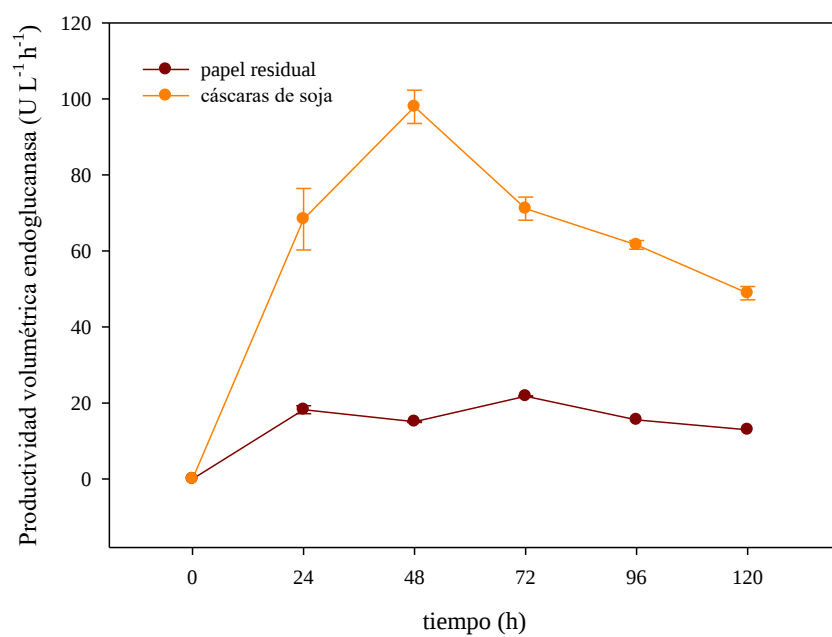


Figura 5.14: Productividad volumétrica endoglucanasa a través del tiempo

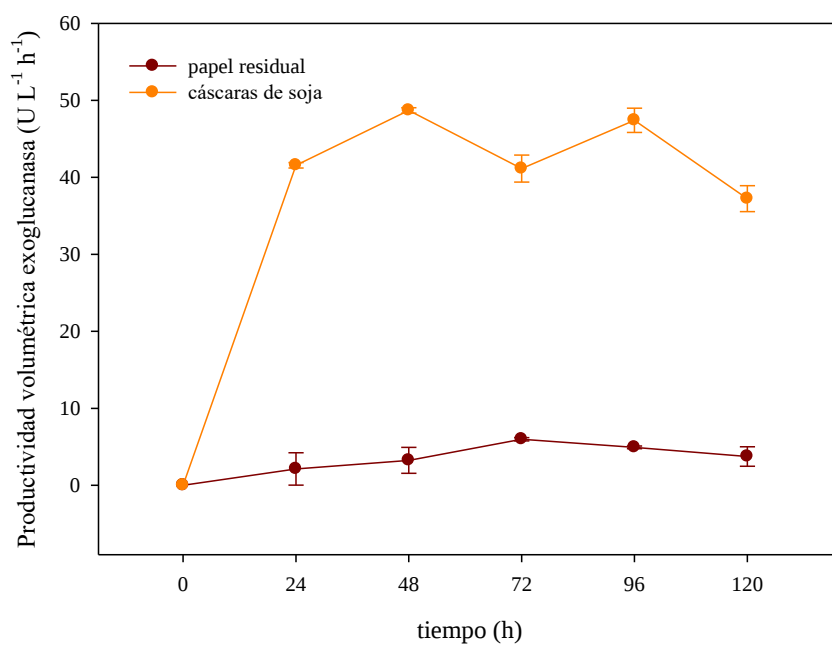


Figura 5.15: Productividad volumétrica exoglucanasa a través del tiempo

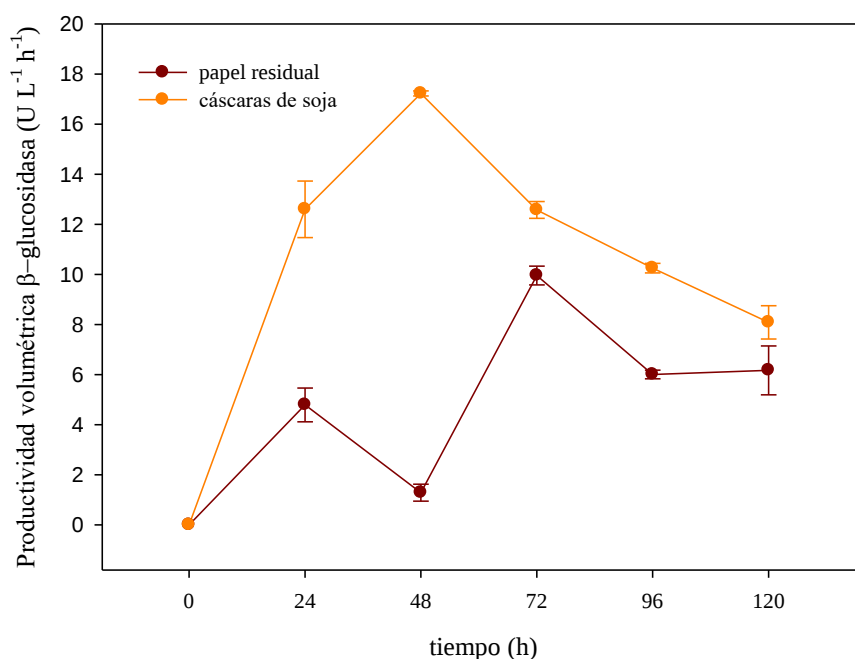


Figura 5.16: Productividad volumétrica β -glucosidasa a través del tiempo

La utilización de cáscaras de soja produjo la mayor productividad volumétrica a cortos tiempos para las enzimas que conforman el complejo celulolítico. La máxima productividad volumétrica fue encontrada para las tres enzimas a las 48 h de la FES utilizando cáscaras de soja como soporte.

5.3.6. Análisis estadístico para evaluar el efecto del soporte sobre la producción de celulasa

Para analizar el efecto del soporte sobre la producción de celulasa se llevó a cabo un diseño bifactorial completamente aleatorizado. Los tratamientos fueron la combinación de los factores soporte (cáscaras de soja y papel residual) y tiempo (0, 24, 48, 72, 96, 120 h). Las variables estudiadas fueron: biomasa; proteínas totales; actividad endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa; actividad específica endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa; productividad volumétrica endoglucanasa, exoglucanasa

y β -glucosidasa; productividad específica endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa.

Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 5.III.

Tabla 5.III: ANOVA para evaluar el efecto de los factores soporte y tiempo sobre la producción de celulasas

Valores de F		Variables												
	Biom.	A.En.	A.Ex.	A.β.	P.V.En.	P.V.Ex.	P.V.β.	P.E.En.	P.E.Ex.	P.E.β.	Prot.	A.E.En.	A.E.Ex.	A.E.β.
SopORTE	36,9 ***	37,0 ***	36,3 ***	200,3 ***	38,7 ***	4370,0 ***	36,4 ***	38,4 ***	36,4 ***	99,9 ***	36,3 ***	30,7 ***	113,2 ***	172,0 ***
Tiempo	16,2 ***	45,9 ***	46,0 ***	146,4 ***	31,9 ***	267,0 ***	10,3 ***	320,1 ***	11,5 ***	67,6 ***	30,0 ***	106,0 ***	21,2 ***	82,3 ***
SopORTE*Tiempo	27,1 ***	80,3 ***	64,5 ***	19,6 ***	27,1 ***	188,0 ***	14,5 ***	26,8 ***	3,2 *	32,7 ***	22,0 ***	18,6 ***	5,3 **	44,0 ***
A.En.: Actividad Endoglucanasa. A.Ex.: Actividad Exoglucanasa. A.β.: Actividad β-Glucosidasa. P.V.En.: Productividad Volumétrica Endoglucanasa. P.V.Ex.: Productividad Volumétrica Exoglucanasa. P.V.β.: Productividad Volumétrica β-Glucosidasa. P.E.En.: Productividad Específica Endoglucanasa. P.E.Ex.: Productividad Específica Exoglucanasa. P.E.β.: Productividad Específica β-Glucosidasa. A.E.En.: Actividad Específica Endoglucanasa. A.E.Ex.: Actividad Específica Exoglucanasa. A.E.β.: Actividad Específica β-Glucosidasa														
* p ≤ 0,05														
** p ≤ 0,01														
*** p ≤ 0,001														

La interacción soporte-tiempo fue significativa para todas las variables estudiadas.

De acuerdo a los resultados del análisis estadístico, aún cuando la producción de biomasa fue mayor en cáscaras de soja para todos los tiempos en el estudio descriptivo, no hubo diferencias significativas a los tiempos 24, 72 y 96 h entre ambos soportes.

No se encontraron diferencias significativas en las actividades endoglucanasa y exoglucanasa a las 48 y 72 h.

Se detectaron diferencias significativas en la actividad β -glucosidasa a los tiempos 48, 72, 96, 120 h entre ambos soportes.

No se encontraron diferencias significativas en la productividad volumétrica endoglucanasa a los tiempos 24, 72 y 96 h. Se detectaron diferencias significativas en la productividad volumétrica exoglucanasa para todos los tiempos estudiados excepto a las 0 h de la FES. No hubo diferencias significativas en la productividad volumétrica β -glucosidasa a los tiempos 24, 72, 96 y 120 h.

Para la variable productividad específica endoglucanasa sólo se detectó diferencia significativa entre los soportes a las 24 h de la FES. A pesar de que la productividad específica exoglucanasa fue mayor en cáscaras de soja para todos los tiempos estudiados, no se encontraron diferencias significativas entre ambos soportes para el nivel de significación deseado. Para la variable productividad específica β -glucosidasa se detectaron diferencias significativas a los tiempos 24 y 72 h.

A pesar de que las proteínas totales fueron mayores en cáscaras de soja para todos los tiempos estudiados, se detectaron diferencias significativas a las 0 y 96 h de la FES.

Se encontraron diferencias significativas entre ambos soportes para la actividad específica endoglucanasa a 0, 24 y 72 h. Mientras que la actividad específica exoglucanasa fue mayor en cáscaras de soja, se detectaron diferencias estadísticamente significativas a 48, 96 y 120 h. Además, se detectaron diferencias significativas entre

ambos soportes para la actividad específica de β -glucosidasa a los tiempos 24, 72, 96 y 120 h.

5.3.7. Análisis estadístico para evaluar el efecto del tiempo sobre la producción de celulasa en cáscaras de soja

Se evaluó el efecto del tiempo en la producción de celulasa para el soporte cáscaras de soja bajo un diseño completamente aleatorizado mediante un ANOVA unifactorial para cada una de las variables estudiadas (biomasa, actividad enzimática, proteínas totales, actividad específica, productividad volumétrica, productividad específica) (Tabla 5.IV). Se observaron diferencias estadísticamente significativas para todas las variables estudiadas en los distintos tiempos ensayados.

Tabla 5IV: ANOVA para evaluar el efecto del tiempo sobre la producción de celulasa

Valores de F	Variables													
	Biom.	A. En.	A. Ex.	A. β .	P.V.En.	P.V.Ex.	P.V. β .	P.E.En.	P.E.Ex.	P.E. β .	Prot.	A.E.En.	A.E.Ex.	A.E. β .
Tiempo	80,2 ***	350,9 ***	386,9 ***	78,0 ***	130,7 ***	456,8 ***	23,0 ***	123,0 ***	219,0 ***	21,2 ***	52,6 ***	256,0 ***	62,7 ***	31,1 ***
A.En.: Actividad Endoglucanasa. A.Ex.: Actividad Exoglucanasa. A. β .: Actividad β -Glucosidasa. P.V.En.: Productividad Volumétrica Endoglucanasa. P.V.Ex.: Productividad Volumétrica Exoglucanasa. P.V. β .: Productividad Volumétrica β -Glucosidasa. P.E.En.: Productividad Específica Endoglucanasa. P.E.Ex.: Productividad Específica Exoglucanasa. P.E. β .: Productividad Específica β -Glucosidasa. A.E.En.: Actividad Específica Endoglucanasa. A.E.Ex.: Actividad Específica Exoglucanasa. A.E. β .: Actividad Específica β -Glucosidasa														
*	$p \leq 0.05$													
**	$p \leq 0.01$													
***	$p \leq 0.001$													

5.3.8. Microscopía Electrónica de Barrido del soporte cáscaras de soja

Para visualizar el crecimiento de *A. niger* NRRL3 sobre el soporte cáscaras de soja se realizó Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) del soporte en ausencia de *A. niger* NRRL3 (Figura 5.17 (A)) y con crecimiento de *A. niger* NRRL3 (Figura 5.17 (B-D)). Las cáscaras de soja exhibieron una superficie rugosa con presencia de algunos microporos. Las dimensiones del microporo observadas fueron de 3,63 μm de largo y 1,14 μm de ancho. En la figura 5.17 (B) se observa el crecimiento de *A. niger* NRRL3 sobre el soporte. En la figura 5.17 (C) se observa que el conidióforo presenta un ancho de 12,18 μm y las dimensiones de la cabeza conidial son de 66,60 μm y 45,73 μm de ancho y largo respectivamente. En la Figura 5.17 (D) pueden observarse las esporas que presentan un rango de 2,00-3,00 μm de diámetro.

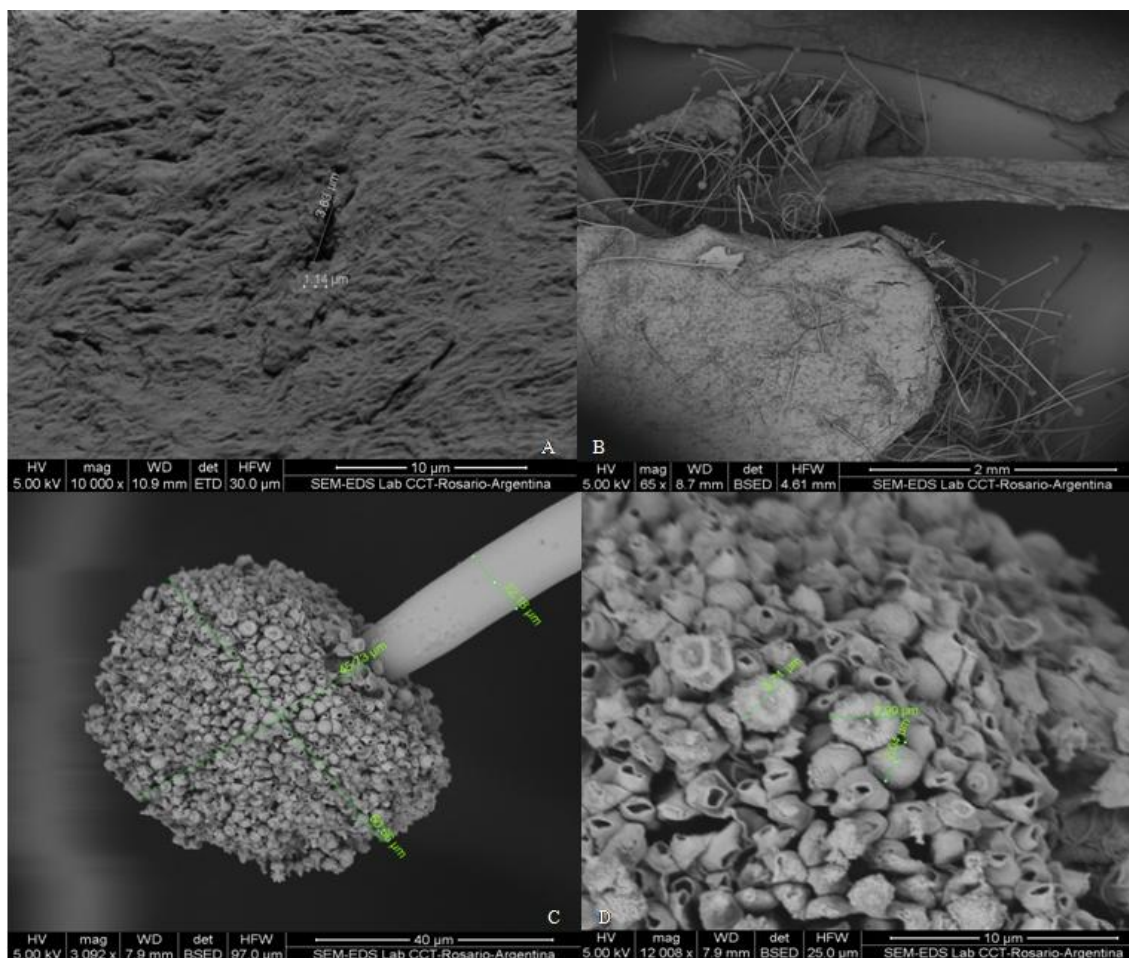


Figura 5.17: SEM de cáscaras de soja (A). SEM del crecimiento de *A. niger* NRRL3 sobre cáscaras de soja (B). SEM del conidióforo y la cabeza conidial de *A. niger* NRRL3 (C). SEM de las esporas de *A. niger* NRRL3

5.4. Comparación de los soportes utilizados para FES

De acuerdo a los resultados exhibidos anteriormente, se puede realizar un análisis comparativo de los mismos.

La actividad endoglucanasa no pudo ser cuantificada en el soporte de marlo de maíz aunque se pudo determinar cualitativamente la presencia de la misma en el cultivo. En cáscaras de soja la actividad endoglucanasa fue máxima (5914 U L^{-1}) y cuatro veces superior a la obtenida en papel residual a las 96 h de la FES.

La actividad exoglucanasa resultó máxima a las 96 h en cáscaras de soja (4551 U L^{-1}), siendo nueve veces superior a la obtenida en papel residual y sesenta veces superior a la obtenida en marlo de maíz al mismo tiempo del cultivo.

La máxima actividad β -glucosidasa se obtuvo a las 96 h en cáscaras de soja (984 U L^{-1}) siendo dos veces superior a la obtenida en papel residual y cinco veces superior a la obtenida en marlo de maíz al mismo tiempo de FES.

La productividad volumétrica endoglucanasa fue máxima a las 48 h en cáscaras de soja. ($98 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y seis veces mayor a la obtenida en el cultivo sobre papel residual.

La productividad volumétrica exoglucanasa fue máxima a las 48 h en cáscaras de soja. ($48.68 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

La máxima productividad β -glucosidasa se alcanzó a las 48 h en cáscaras de soja siendo trece veces superior a la obtenida en papel y cinco veces superior a la obtenida en marlo de maíz al mismo tiempo de fermentación.

La selección del sustrato es un aspecto clave en la FES (Pandey 2003). Estos resultados sugieren que el soporte cáscaras de soja es un potencial material para la producción de celulasas por FES.

Argentina es un importante productor de soja, y por lo tanto, las cáscaras de soja es un residuo agroindustrial ampliamente disponible de la zona. Por lo tanto el desarrollo de un bioproceso para la producción de celulasa utilizando cáscaras de soja ofrecería ventajas económicas y medio-ambientales. Además tendría un impacto positivo sobre la economía de las industrias que requieren el uso del complejo celolítico.

Capítulo 6. Resultados *y Discusión*

Capítulo 6. Resultados y Discusión: Precipitación de endoglucanasa utilizando polielectrolitos

6.1. Formación del complejo insoluble PVS-Endoglucanasa

6.1.1. Curvas de precipitación de proteína con PVS

Dado que el punto isoeléctrico de la endoglucanasa se encuentra cercano a 4,50, a ese pH la enzima tendrá carga neta positiva. Al otro pH ensayado la enzima se encuentra con muy baja carga neta, por lo tanto, explicaría la escasa precipitación con este polímero en estas condiciones.

La Figura 6.1 muestra la variación de la turbidez (absorbancia a 420 nm) de una solución de liofilizado comercial de endoglucanasa (LCC) titulada con una solución de Polivinil sulfonato (PVS) 1% P/P, a dos valores de pH diferentes. Al analizar las gráficas, se observó un patrón hiperbólico, lo cual indica que las variables están asociadas a un proceso de saturación, hasta una cierta relación crítica a partir de la cual la turbidez disminuye ante el aumento de la relación polímero-proteína. También se puede observar que la formación del complejo insoluble se encuentra afectada por el pH del medio, estando favorecida a un pH aproximado de 2,70. Dado que el punto isoeléctrico de la endoglucanasa se encuentra cercano a 4,50, a ese valor de pH la enzima tendrá carga neta positiva. Al otro pH ensayado la enzima se encuentra con muy baja carga neta, por lo tanto, explicaría la escasa precipitación con este polímero en estas condiciones.

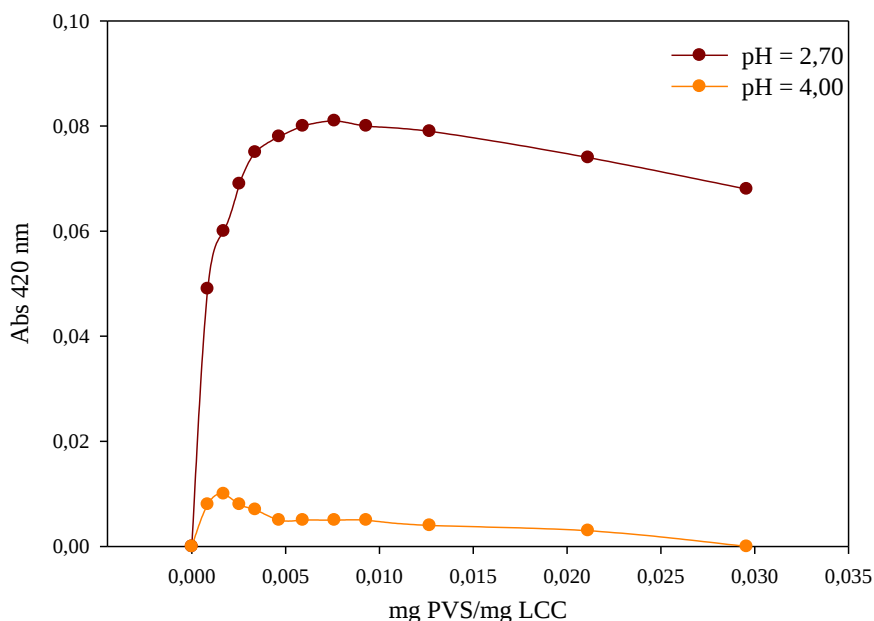


Figura 6.1: Curvas de titulación de LCC 30 mg/ml con PVS 1,00 % P/P por medidas de absorbancia a 420 nm en función de la relación de mg PVS/mg LCC a dos pH diferentes.

Medio buffer citrato 50 mM, temperatura 15°C.

Se determinó la relación estequiométrica polímero/proteína como la mínima concentración requerida de polímero para alcanzar el *plateau* en la curva de titulación turbidimétrica. Para el complejo PVS/LCC a pH 2,70, se obtuvo una relación estequiométrica de 0,0042 mg PVS/mg LCC, utilizando en este caso, como en la mayoría de los ensayos, una solución de LCC de 30 mg/ml. Con el objeto de asegurar la formación del complejo insoluble se eligió trabajar con una relación de masa levemente superior, (0,0051mg PVS/mg LCC) en la mayoría de los ensayos.

Dado que el liofilizado no sólo contiene endoglucanasa, sino otras proteínas se determinaron las proteínas totales según el método explicado en la sección 3.2.5 de *Materiales y Métodos*. La relación estequiométrica expresada como mg de PVS por mg de proteínas totales fue de 0,0894 mg PVS/mg proteínas totales. Este dato es necesario

para fijar las condiciones en ensayos posteriores de la precipitación de la enzima desde el cultivo fúngico.

6.1.2. Efecto del pH en la formación del complejo insoluble. Diagramas de solubilidad

La Figura 6.2 muestra los diagramas de solubilidad para el complejo PVS/LCC. Estos permitieron determinar el rango de pH de insolubilidad del mismo.

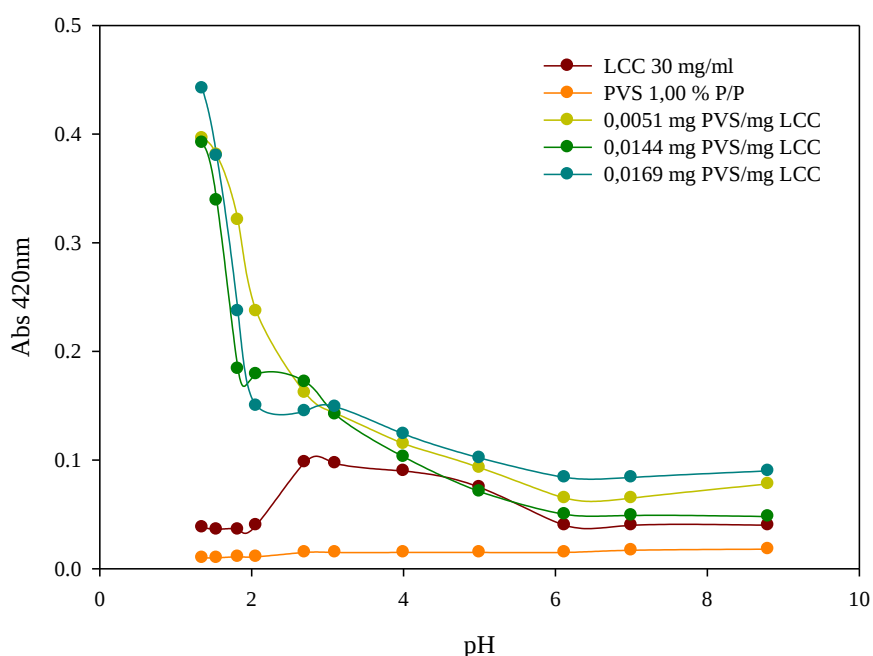


Figura 6.2: Diagramas de solubilidad para el complejo PVS-LCC. Medio buffer citrato 50 mM, temperatura: 15°C.

Los diagramas de solubilidad obtenidos para las diferentes relaciones mg PVS/mg LCC, mostraron un comportamiento similar y presentaron un rango de insolubilidad a pH menores a 3,5. Por lo tanto, el rango de insolubilidad es independiente de las relaciones de masas ensayadas.

La solución de PVS no evidenció turbidez en el rango de pH estudiado. Por el contrario, la solución del liofilizado comercial presentó un aumento de turbidez en el rango de pH de 2,00 a 6,00. Por lo tanto en el resto de las mediciones se procedió a restar estos valores.

6.1.3. Efecto de la concentración de PVS en la formación del complejo insoluble

La Figura 6.3 muestra la titulación turbidimétrica del LCC variando la concentración de las soluciones de PVS.

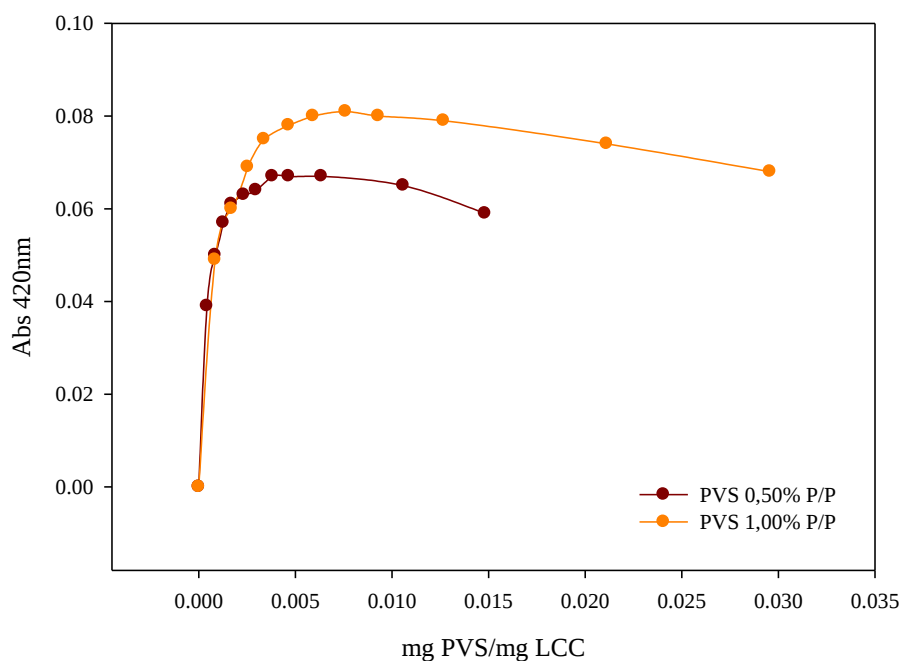


Figura 6.3: Titulación turbidimétrica de LCC con PVS de distintas concentraciones. Medio buffer citrato 50 mM pH 2,70, temperatura 15°C.

Los relaciones de masas PVS/LCC se detallan en la tabla 6.I.

Las determinaciones realizadas para una solución de PVS al 2,00% P/P se descartaron debido a las altas variaciones de las mismas, y la dificultad para asignarles un perfil de precipitación.

Tabla 6.I: Relación e para distintas concentraciones de PVS

[PVS] (% P/P)	e (mg PVS/mg LCC)
0,50	0,0017
1,00	0,0042

Se observa para ambas concentraciones de PVS, la turbidez aumenta con el incremento de la cantidad de polímero hasta alcanzar un máximo, y luego disminuye.

Para una concentración del 1,00% P/P de PVS los valores de absorbancia a 420 nm fueron mayores, indicando una mayor formación de complejo insoluble. Por lo tanto, se seleccionaron estas condiciones para las experiencias posteriores.

6.1.4. Efecto de la concentración de enzima en la formación del complejo insoluble

La Figura 6.4 muestra las curvas de titulación turbidimétrica de LCC a diferentes concentraciones agregando cantidades crecientes de PVS 1,00 % P/P a pH 2,70. Las relaciones estequiométricas obtenidas de la curva para cada concentración de LCC se muestran en la tabla 6.II.

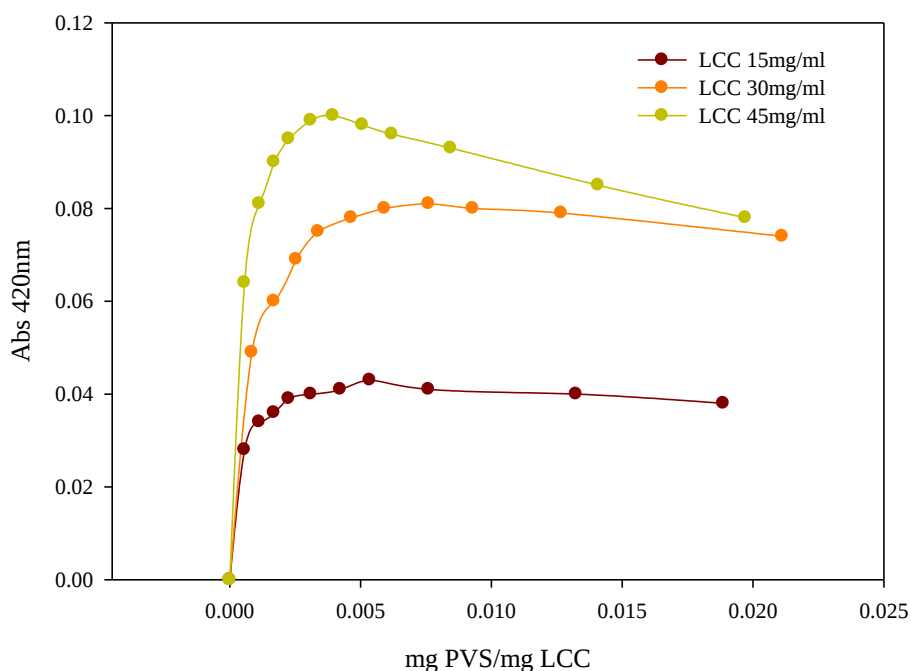


Figura 6.4: Curvas de precipitación para diferentes concentraciones de LCC.
Medio buffer citrato 50mM, temperatura 15°C.

La turbidez se incrementó después del agregado de pequeñas cantidades de PVS. Por otra parte, la estequiometría del complejo no aumentó proporcionalmente al incrementarse la concentración de LCC. Se observó una disolución del complejo cuando se utilizó una concentración de LCC 45 mg/mL. Por otra parte, debido a que los valores de absorbancia a 420 nm fueron cuando se empleó una solución de LCC de 30 mg/mL se seleccionó esta concentración para los estudios posteriores.

Tabla 6.II: Relación e para distintas concentraciones del LCC

[LCC] (mg/ml)	e (mg PVS/mg LCC)
15	0,0017
30	0,0042
45	0,0019

6.1.5. Cinética de formación del complejo insoluble

El tiempo requerido para la formación del complejo insoluble se ensayó a diferentes temperaturas. La Figura 6.5 muestra la cinética de formación del complejo PVS-LCC determinada por la medida de absorbancia a 420 nm a diferentes temperaturas. El complejo insoluble alcanzó la máxima turbidez a los 10 min a las temperaturas de 15, 20 y 25°C. Una menor cantidad de complejo insoluble fue producida cuando se incrementó la temperatura, lo que indicó que la formación del complejo insoluble involucra un proceso exotérmico.

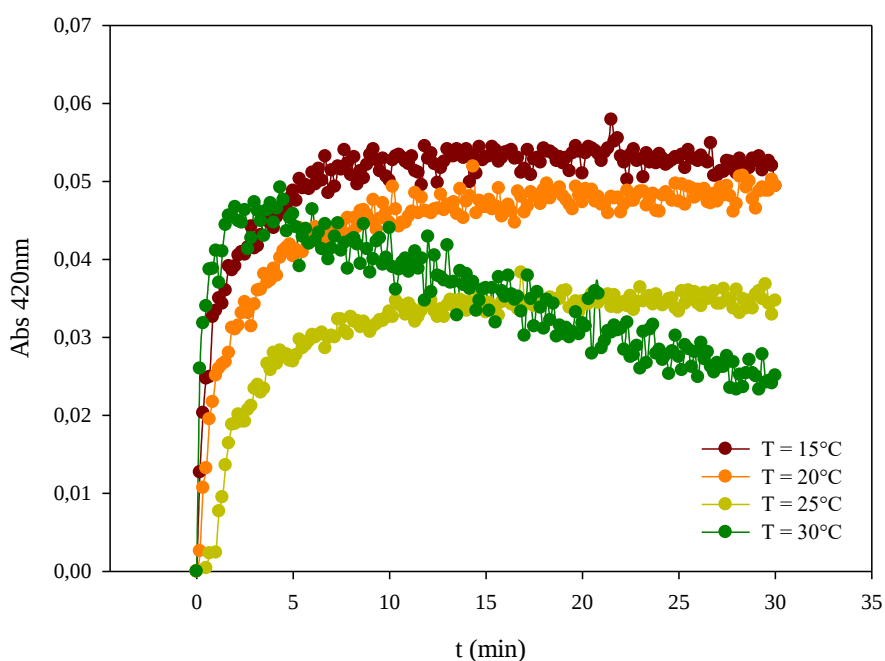


Figura 6.5: Cinética de formación del complejo PVS-LCC a distintas temperaturas.

Medio buffer citrato 50 mM, pH 2,70. $e = 0,0051\text{mg PVS/mg LCC}$.

A una temperatura de 30°C el perfil obtenido fue diferente en comparación con las otras temperaturas estudiadas. Se observó un aumento brusco de la absorbancia a 420 nm a tiempos iniciales y una inmediata disminución de la misma con el avance del tiempo, correspondiente a la disolución del complejo PVS-LCC.

6.1.6. Efecto de la fuerza iónica sobre la formación del complejo insoluble

La Figura 6.6 muestra el efecto de la concentración de NaCl sobre la formación del complejo insoluble.

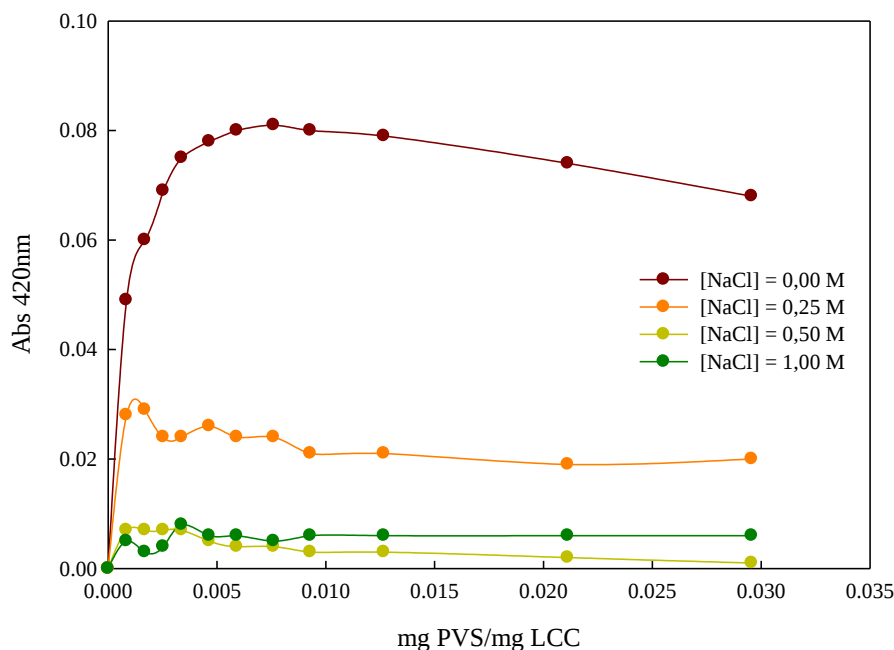


Figura 6.6: Formación del complejo PVS/LCC a distintas fuerzas iónicas.

Medio buffer citrato 50 mM, pH 2,70, temperatura 15°C.

Se observa una disminución mayor al 50% de la turbidez obtenida para una solución de NaCl 0,25M con respecto a la titulación en ausencia de NaCl, siendo prácticamente nula a mayores concentraciones (NaCl 0,50 y 1,00 M).

Estos resultados evidencian que el precipitado puede ser redissuelto a altas fuerzas iónicas. Por consiguiente, podemos suponer que las interacciones existentes entre el PVS y LCC son mayoritariamente electroestáticas. Resultados similares se han encontrado para la interacción de lipasa con polietilenimina (Bassani et al. 2011).

6.1.7. Estabilidad enzimática endoglucanasa en presencia de PVS y NaCl

Se analizó la actividad enzimática endoglucanasa en ausencia y presencia de PVS 1,00% P/P, y en presencia de NaCl 1,00 M, con la finalidad de establecer si la actividad se mantiene aún en presencia de mayor cantidad del polímero o si la presencia de NaCl en el medio genera alguna variación.

Como se observa en la Figura 6.7, la presencia de PVS no afecta la actividad endoglucanasa para las relaciones ensayadas. En presencia de NaCl 1 M se puede visualizar un leve aumento en los valores de actividad enzimática.

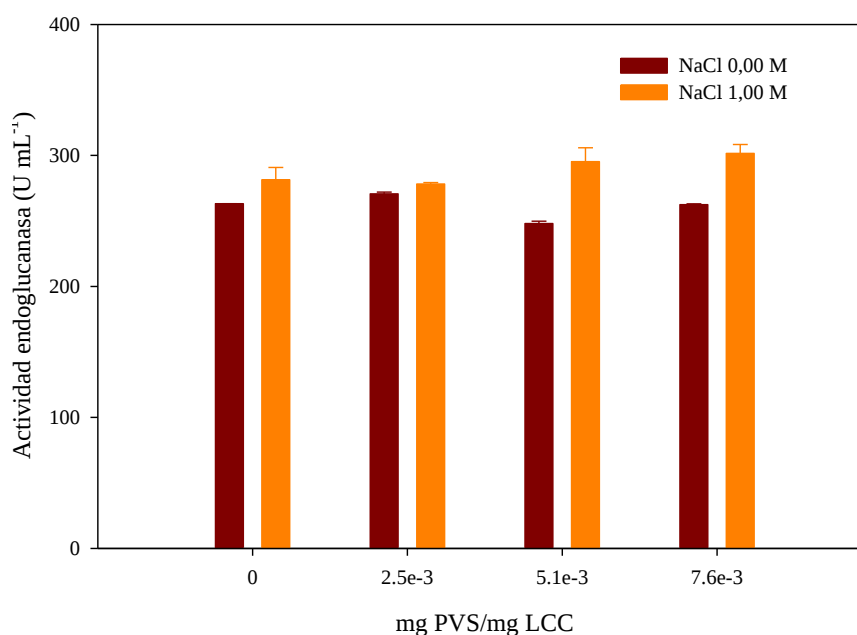


Figura 6.7: Actividad endoglucanasa para distintas relaciones PVS/LCC, en ausencia y presencia de NaCl 1,00 M. Medio buffer citrato 50 mM, pH 2,70, temperatura 15°C. Incubado por 15 min.

6.1.8. Actividad endoglucanasa en función del tiempo en presencia de PVS

La actividad endoglucanasa en presencia de PVS es un indicador de la estabilidad de la proteína y de posibles cambios en su estructura terciaria y secundaria inducida por el polímero. Muchos polímeros sintéticos de cadena flexible cargados que forman

complejos con enzimas, no sólo incrementan significativamente la actividad enzimática de la misma, sino que también estabilizan a la proteína de modo que su actividad se mantiene constante durante más tiempo (Spelzini et al. 2005).

Se procedió a realizar la precipitación enzimática en buffer citrato 50 mM, pH 2,70, con una relación de masas de 0,0108 mg PVS/mg LCC, mayor al ensayado hasta el momento. Se incubó a distintos tiempos a 15°C, se centrifugó a 2700 rpm por 10 min y se redisolvió el pellet en buffer citrato 50 mM, pH 5,30, hasta alcanzar el volumen original. Finalmente se calculó la actividad enzimática para el sobrenadante, el precipitado redisoluto (máxima concentración de PVS), y un control de la solución del LCC. Los resultados se muestran en la Figura 6.8.

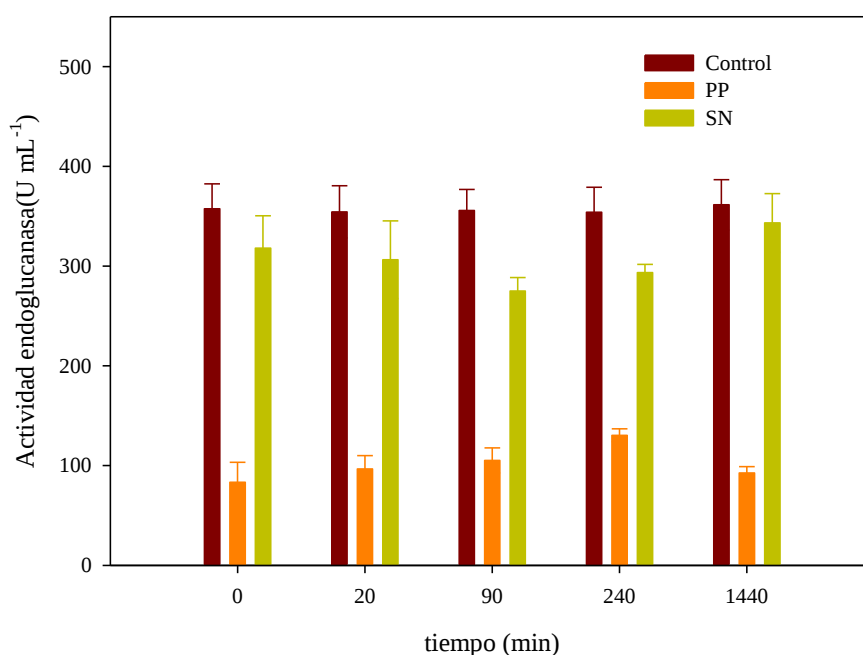


Figura 6.8: Actividad enzimática en función del tiempo en presencia de una mínima concentración de PVS (sobrenadante) y una máxima concentración de PVS (precipitado redisoluto) de PVS.

La gráfica muestra que la actividad enzimática no es afectada por la presencia del polímero a lo largo del tiempo, ya que la actividad en el precipitado muestra un

comportamiento similar a lo largo del tiempo. La suma de la actividad endoglucanasa en el precipitado y en el sobrenadante fue de 6 a 20% mayor a la obtenida en el control para todos los tiempos ensayados. Debido a estos resultados se puede pensar en un efecto estabilizante por parte del PVS sobre la endoglucanasa.

6.1.9. Precipitación de endoglucanasa comercial con PVS a distintos tiempos

La Tabla 6.III muestra los factores de purificación (FP) y el porcentaje de rendimiento de (%R) la endoglucanasa en la precipitación con la enzima comercial (LCC) empleando PVS. Una solución de LCC se utilizó como control. Se obtuvieron altos valores de FP para el preceipitado re-disuelto para todos los tiempos de incubación, alcanzándose un máximo de 6.3. El FP no se modificó significativamente después de los 20 min. Estos resultados son consistentes con los estudios cinéticos (sección 6.1.5) que mostraron que el complejo PVS/LCC estaba completamente formado luego de los 10 min. Por otra parte, se alcanzó un máximo rendimiento de 37% en el precipitado re-disuelto.

Tabla 6.III: Precipitación de endoglucanasa comercial. Factor de Purificación FP y porcentaje de rendimiento (%R) en el precipitado re-disuelto y en el sobrenadante a diferentes tiempos. Proporciones de masas: 0,0108 mg PVS/mg LCC. T = 15°C.

	t (min)	FP		%R	
		Precipitado re-disuelto	Sobrenadante	Precipitado re-disuelto	Sobrenadante
PVS	0	4,0 ± 0,6	1,1 ± 0,1	23 ± 3	89 ± 6
	20	6,30 ± 0,08	1,19 ± 0,03	27 ± 2	86 ± 4
	90	6 ± 1	0,84 ± 0,08	30 ± 1	75 ± 5
	240	6 ± 1	0,96 ± 0,07	37 ± 4	81 ± 3
	1440	6 ± 1	1,17 ± 0,09	26 ± 2	95 ± 1

6.1.10. Precipitación de endoglucanasa obtenida de un cultivo fúngico con PVS

Se realizó el cultivo de *A. niger* NRRL3 sobre pellet de cáscaras de soja de acuerdo a lo descrito en la sección de *Materiales y Métodos* 3.2.11.4. Una vez obtenido el extracto fúngico se aplicó la metodología bioseparativa de precipitación con PVS. Para la precipitación de endoglucanasa del extracto fúngico, se seleccionaron las proporciones de masa PVS/proteína aproximadas a las obtenidas en los estudios con la enzima comercial.

Para ello se llevó el pH del medio a 2,70 con buffer citrato 50 mM, se agregó un volumen de PVS 1,00 % P/P que permitiera una relación de masas (en función de las proteínas totales, como se comentó y calculó en 6.1.1) aproximada a 0,1086 mg PVS/mg proteínas totales. De manera similar se hizo para una relación por debajo y por encima del mismo. En todos los casos se incubó a 15°C durante 20 min y luego de dicho tiempo se centrifugó a 2700 rpm por 10 min. La metodología de redisolución fue la misma que se utilizó para el LCC, la redisolución con buffer citrato 50 mM, pH 5,30.

Finalmente se determinaron proteínas totales y actividad para cada fracción, y se obtuvieron los factores de purificación y porcentaje de rendimiento para cada caso. Los resultados se muestran en la Tabla 6.IV.

Tabla 6.IV. Parámetros de purificación de precipitación de endoglucanasa del extracto fúngico en diferentes proporciones de masas PVS/ proteínas totales (P.T.).

PVS/P.T. (mg/mg)	Fracción	P. T. (mg mL ⁻¹)	Act. Endo. (U mL ⁻¹)	FP	%R
	Control	13,7 ± 0,4	338 ± 6	1	100
0,0845	Precipitado	0,51 ± 0,01	109 ± 1	8,7 ± 0,2	32,2 ± 0,6
	Sobrenadante	12,3 ± 0,3	302 ± 3	0,99 ± 0,02	89 ± 2
0,1126	Precipitado	0,65 ± 0,01	120 ± 2	7,5 ± 0,2	36,0 ± 0,6
	Sobrenadante	12,9 ± 0,4	307 ± 2	0,96 ± 0,03	91 ± 2
0,1408	Precipitado	0,50±0,01	108±1	8,7±0,3	31,8±0,5
	Sobrenadante	12,2±0,3	300±3	0,99±0,01	89±1

Se puede apreciar claramente un comportamiento similar al obtenido con la endoglucanasa comercial, obteniendo elevados valores de purificación y bajos rendimientos enzimáticos.

6.1.10.1. SDS-PAGE y análisis de zimograma de actividad endoglucanasa del extracto fúngico y del precipitado re-disuelto utilizando PVS

La Figura 6.9 (A) muestra el patrón proteico del extracto fúngico y el precipitado re-disuelto utilizando PVS como agente precipitante. Puede observarse que la cantidad de proteína disminuyó en el precipitado re-disuelto con respecto al extracto fúngico.

La Figura 6.9 (B) muestra las mismas muestras después de la tinción con Rojo Congo para la visualización de actividad endoglucanasa. El análisis de zimograma presentó al menos cinco bandas en el extracto fúngico. En el precipitado re-disuelto se detectaron dos bandas más intensas que presentaron un peso molecular de 61 y 47 KDa y otras bandas más débiles que se encontraron en un rango de peso molecular entre 20-30 KDa.

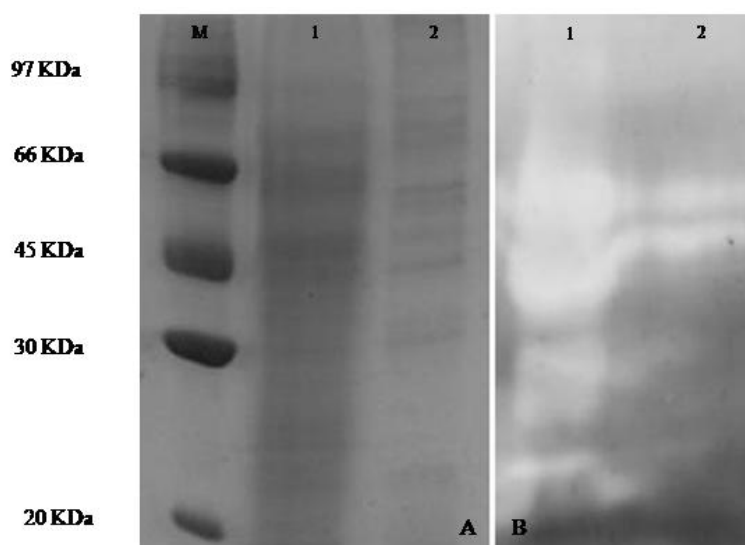


Figura 6.9: Geles de SDS-poliacrilamida seguidos por la tinción para visualización de proteínas (A) y actividad endoglucanasa (B) en el extracto fúngico y en el precipitado re-disuelto usando PVS como agente precipitante. Marcadores de PM: Fosforilasa b (97 KDa), Albúmina (66 KDa), Ovoalbúmina (45 KDa), Anhidrasa carbónica (30 KDa), Inhibidor de Tripsina (20 KDa) (calle M). Extracto fúngico de pellet de cáscaras de soja (calle 1). Precipitado re-disuelto utilizando PVS (calle 2).

Estos resultados coinciden con trabajos previos que han informado producción de endoglucanasa de diferentes pesos moleculares por otros microorganismos (Sun et al. 2008; Zhou et al. 2008; Liu et al. 2011).

6.2. Formación del complejo insoluble CHS-endoglucanasa

En esta sección, se muestran los mismos estudios realizados con PVS, pero en este caso se utilizó chitosán (CHS) como polímero para la precipitación de endoglucanasa.

6.2.1. Curvas de precipitación de proteína con CHS

Al igual que en la mayoría de los experimentos ensayados, la concentración del LCC fue de 30 mg/mL y la de CHS de 0,05% P/V.

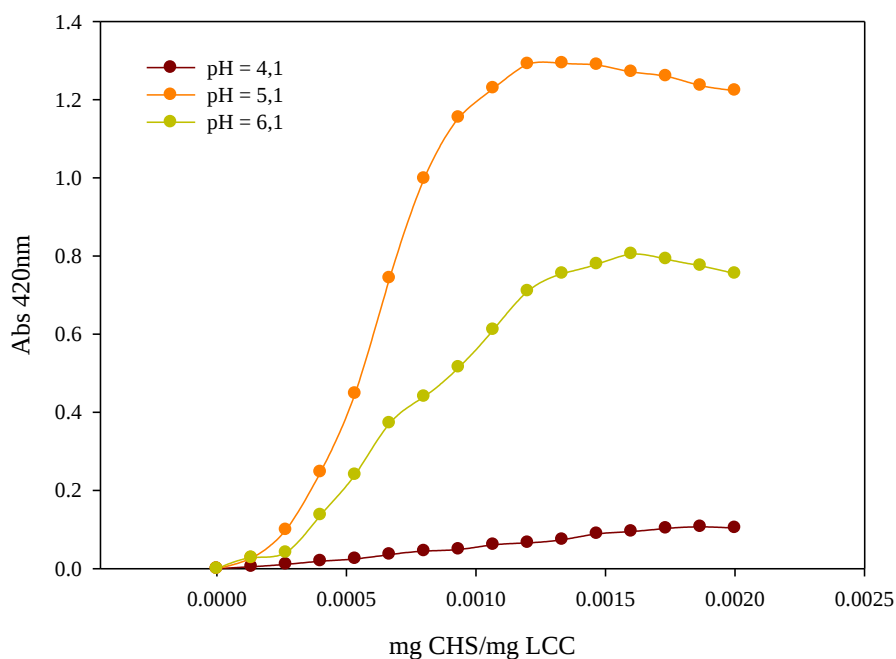


Figura 6.10: Curvas de titulación de LCC 30 mg/ml con CHS 0,05 % P/V por medidas de absorbancia a 420 nm en función de la relación de mg CHS/mg LCC a diferentes valores de pH.

Temperatura 15°C.

En la Figura 6.10 se observa la variación de la turbidez de una solución de LCC 30 mg/mL titulada con CHS de 0,05% P/V a diferentes valores de pH. Las curvas presentaron un patrón sigmoideo, indicando un proceso de saturación, donde la turbidez

aumenta con el incremento de la cantidad de polímero hasta una cierta relación crítica a partir de la cual comienza a disminuir.

Se vuelve a corroborar que para la formación de un complejo polímero-proteína es importante el pH del medio. A un pH del medio superior al punto isoeléctrico de la endoglucanasa ($pI=4,50$), es probable que la enzima tenga una carga neta negativa. Este hecho explicaría la precipitación favorable obtenida a los valores de pH de 5,10 y 6,00 con este polímero.

La relación estequiométrica del complejo CHS/LCC determinada para pH 5,10, donde se observan los mayores valores de absorbancia a 420 nm, fue de 0,0010 mg CHS/mg LCC, y considerando la concentración de proteínas totales es equivalente a 0,0220 mg CHS/mg proteínas totales. De acuerdo a los resultados, puede destacarse que los valores de absorbancia a 420 nm con CHS fueron mayores a los obtenidos con PVS. Por lo tanto la precipitación de endoglucanasa es más significativa cuando se emplea CHS, y además se requiere una menor relación polímero/proteína.

Para asegurar la formación del complejo insoluble, en algunos ensayos se eligió trabajar con una relación levemente superior, 0,0013 mg CHS/mg LCC (0,0286 mg CHS/mg proteínas totales).

6.2.2. Efecto del pH en la formación del complejo insoluble CHS-endoglucanasa.

Diagramas de solubilidad

La Figura 6.11 muestra los diagramas de solubilidad para distintas relaciones de masa. Estos permitieron determinar el rango de pH de insolubilidad del complejo resultante. Los valores de absorbancia fueron mayores cuando se incrementó la concentración de CHS. Sin embargo, el rango de pH de precipitación se mantuvo constante, en un rango de pH entre 4,00 y 7,00, para las tres relaciones de CHS/LCC ensayadas.

La solución de CHS 0,05 % P/V evidenció turbidez recién a partir de un pH igual a 7,00. A pesar de la baja contribución en las medidas de absorbancia por parte de la solución de LCC, se siguió utilizando el valor medido para la misma como blanco para el resto de las medidas realizadas.

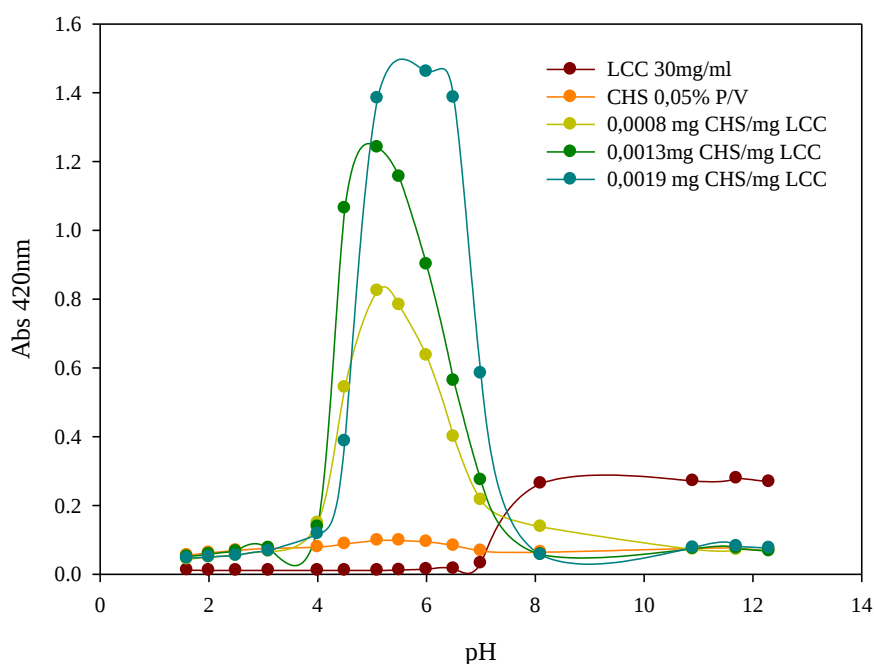


Figura 6.11: Diagramas de solubilidad para el complejo CHS-endoglucanasa.

Temperatura: 15°C.

6.2.3. Efecto de la concentración de CHS en la formación del complejo insoluble

La Figura 6.12 muestra la titulación turbidimétrica de LCC 30 mg/mL con diferentes concentraciones de CHS a pH 5,10.

Se observa que ante cantidades crecientes de CHS la turbidez aumenta hasta alcanzar un máximo, y luego comienza a disminuir.

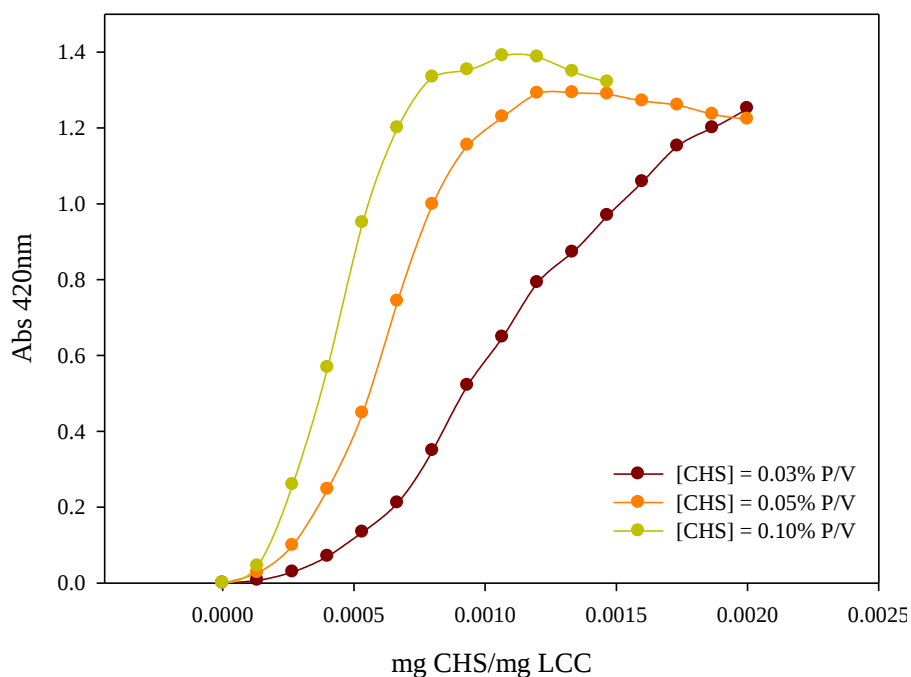


Figura 6.12: Titulación turbidimétrica de LCC con de distintas concentraciones de CHS, pH 5,10, temperatura 15°C.

La Tabla 6.V muestra las relaciones polímero/LCC para cada una de las concentraciones de CHS.

Tabla 6.V: Relación e para distintas concentraciones de CHS.

[CHS] (% P/V)	e (mg CHS/mg LCC)
0,05	0,0010
0,10	0,0008

Los resultados para el caso del CHS 0,03 % P/V no son informados debido a que la curva correspondiente no alcanzó el *plateau*. Solamente podemos estimar que la relación e es mayor a 0,0020 mg CHS/mg LCC. La concentración de CHS 0,10% P/V no se consideró para posteriores trabajos debido a que después de alcanzada la máxima

precipitación disminuye la formación del complejo, probablemente debido a un aumento de la fuerza iónica del medio proporcionada por el mismo polímero.

Debido a los resultados obtenidos se seleccionó una concentración de CHS 0,05 % P/V para estudios posteriores.

6.2.4. Efecto de la concentración de enzima en la formación del complejo insoluble

La Figura 6.13 muestra las curvas de titulación turbidimétrica de LCC a diferentes concentraciones con CHS 0,5 %P/V a pH 5,10.

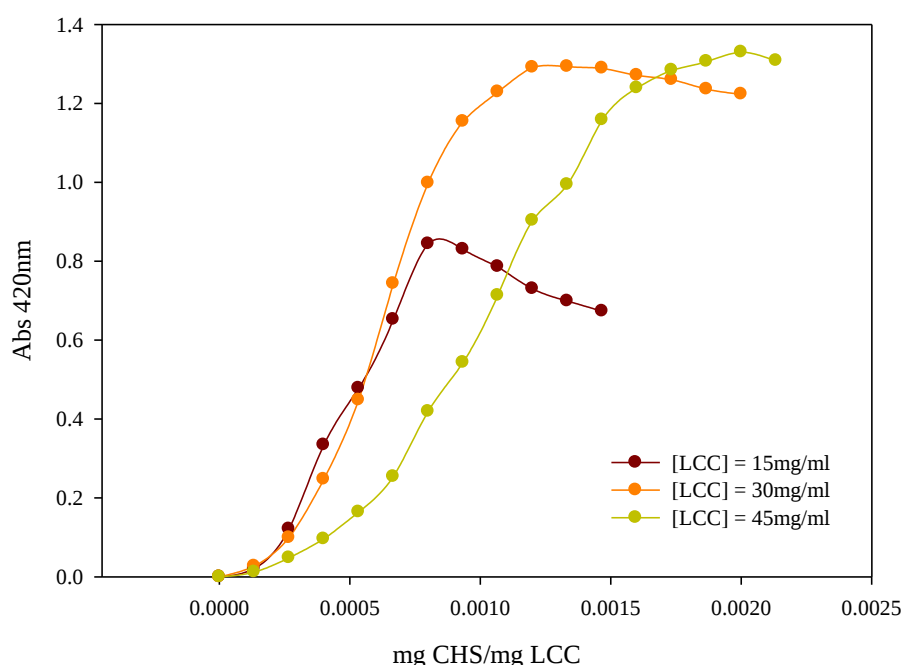


Figura 6.13: Curvas de precipitación para tres concentraciones de enzima diferentes. Temperatura 15°C.

Se observa que la relación estequiométrica aumenta al aumentar la cantidad de enzima. Además, a una concentración de LCC de 15 mg/ml se visualiza una disminución mayor de la turbidez luego de alcanzado el *plateau*, en comparación con las otras concentraciones ensayadas. La disolución del complejo a altas relaciones

polímero/proteína podría deberse a que el aumento de la fuerza iónica del medio solubiliza al complejo formado.

Las relaciones de masas obtenidas se detallan en la Tabla 6.VI.

Tabla 6.VI: Relación e para distintas concentraciones del LCC.

[LCC] (mg/ml)	e (mg CHS/mg LCC)
15	0,0008
30	0,0010
45	0,0015

6.2.5. Cinética de formación del complejo

El tiempo requerido para la formación del complejo insoluble fue determinado a diferentes temperaturas (Figura 6.14). El perfil cinético obtenido con CHS fue similar al obtenido con PVS, sugiriendo un mecanismo exotérmico para la formación del complejo insoluble.

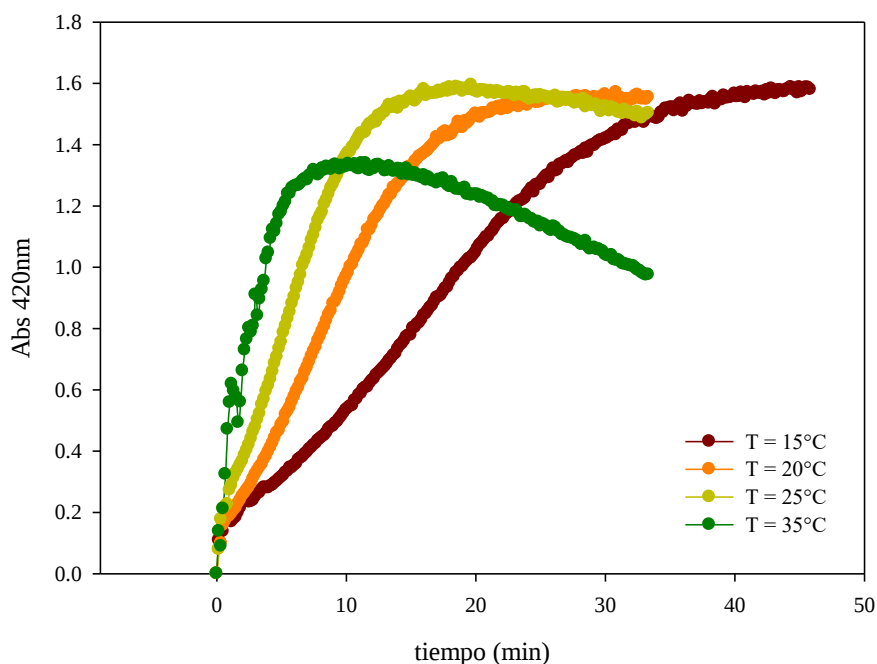


Figura 6.14: Cinética de formación del complejo CHS/LCC a distintas temperaturas, pH 5,10
e = 0,0013 mg CHS/mg LCC.

6.2.6. Efecto de la fuerza iónica sobre la formación del complejo insoluble

La Figura 6.15 muestra el efecto de la concentración de NaCl sobre la formación del complejo insoluble.

Se puede apreciar una importante disminución de la turbidez a partir de la menor concentración salina ensayada (NaCl 0,25 M), siendo prácticamente nula a altas concentraciones de sal (NaCl 0,50 y 1,00 M).

De esta manera podemos decir que el aumentar la fuerza iónica del medio es una alternativa para la redisolución del complejo CHS-endoglucanasa.

La disolución del complejo a altas relaciones polímero/proteína podría deberse a que el aumento de la fuerza iónica del medio solubiliza al complejo formado. Además, podría suponerse que la naturaleza de la interacción entre CHS y la enzima endoglucanasa es electrostática.

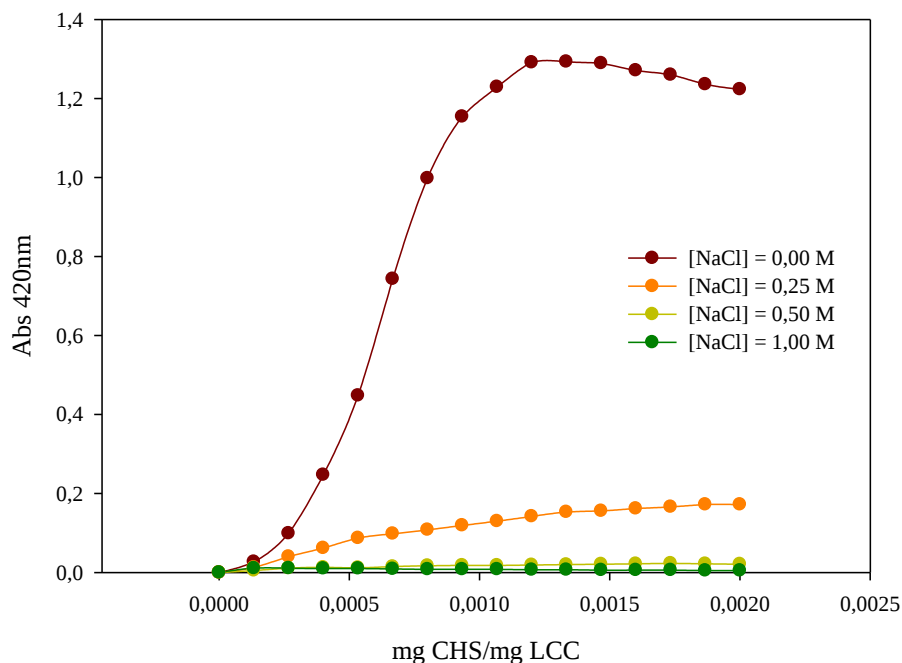


Figura 6.15: Formación del complejo CHS/LCC a distintas fuerzas iónicas
pH 5,10, temperatura 15°C.

6.2.7. Estabilidad enzimática en presencia de CHS y NaCl

La variación de actividad enzimática en presencia y ausencia de polímero permiten la estimación del efecto del mismo sobre la estabilidad enzimática. Ciertos polímeros incrementan la actividad enzimática mientras que otros la disminuyen (Geng et al. 2012; Porfiri et al. 2012). Para establecer si la concentración de polímero o la concentración de sal afectan la estabilidad enzimática, la actividad endoglucanasa de muestras sin polímero fueron comparadas con muestras en presencia de CHS a diferentes concentraciones y en presencia y ausencia de NaCl 1M.

La Figura 6.16 muestra que la actividad enzimática no es afectada cuando se incrementa la concentración de polímero. En presencia de NaCl 1 M la actividad endoglucanasa se incrementa levemente en la mayoría de los casos, a diferentes relaciones mg CHS/mg LCC.

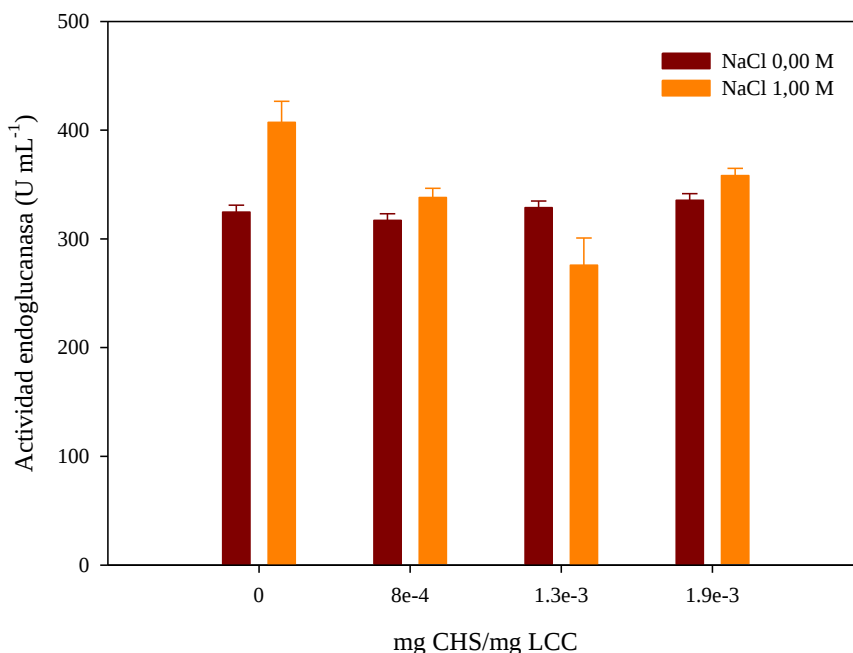


Figura 6.16: Actividad endoglucanasa para distintas relaciones CHS/LCC, en ausencia y presencia de NaCl 1,00 M, pH 5,10, temperatura 20°C. Tiempo de incubación: 1 h.

6.2.8. Actividad endoglucanasa en función del tiempo en presencia de CHS

La Figura 6.17 muestra la actividad endoglucanasa como una función del tiempo para el control, el precipitado re-disuelto y el sobrenadante. Se consideró control a una solución de LCC idéntica a la utilizada para realizar la precipitación.

Se ensayó la precipitación enzimática utilizando una relación de masas de 0,0013 mg CHS/mg LCC a pH 5,10. Se incubó a distintos tiempos a 15°C, se centrifugó a 6500 rpm por 5 min y se redisolvió el precipitado a pH 5,10 con NaCl 0,50 M hasta alcanzar el volumen original. Se calculó la actividad enzimática endoglucanasa para el sobrenadante, el precipitado redisoluelto y el control de LCC.

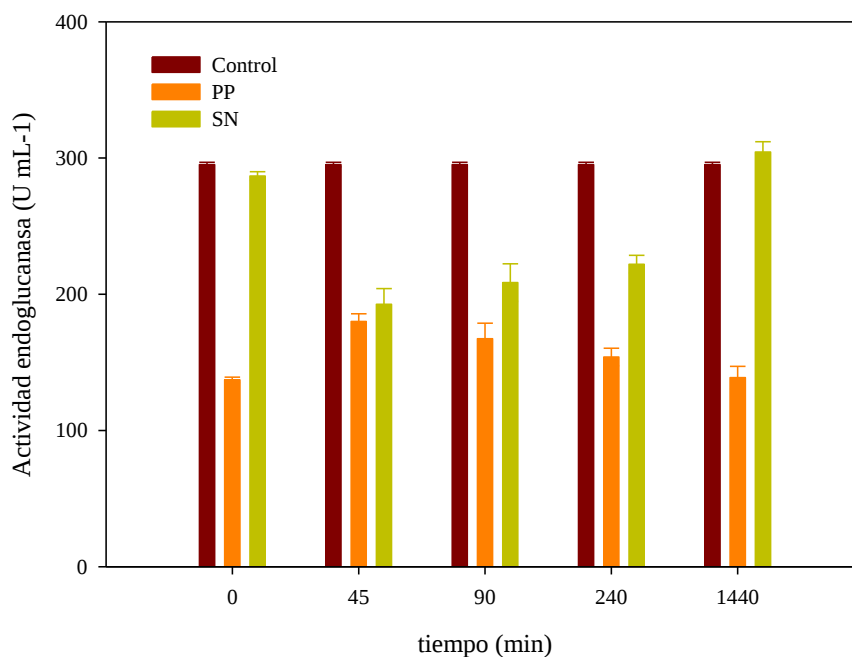


Figura 6.17: Actividad enzimática en función del tiempo en presencia de la mínima concentración de CHS (sobrenadante) y en presencia de la máxima concentración de CHS (precipitado re-disuelto).

El efecto estabilizante utilizando CHS fue mayor que el obtenido con PVS, dado que la suma del precipitado y el sobrenadante fue 26 a 50% mayor a la obtenida en el control.

6.2.9. Precipitación de endoglucanasa comercial con CHS a distintos tiempos

La Tabla 6.VII muestra los factores de purificación y porcentajes de rendimiento para los sobrenadantes y precipitados re-disueltos obtenidos de la precipitación de endoglucanasa comercial (LCC) con CHS a diferentes tiempos de incubación.

Tabla 6.VII: Precipitación de endoglucanasa comercial. Factor de Purificación (FP) y porcentaje de rendimiento (%R) en el precipitado re-disuelto y en el sobrenadante a diferentes tiempos. Proporciones de masas: 0,0108 mg PVS/mg LCC. T = 15°C.

	t (min)	FP		%R	
		Precipitado re-disuelto	Sobrenadante	Precipitado re-disuelto	Sobrenadante
CHS	0	2,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1	46,5 ± 0,2	97 ± 4
	45	2,3 ± 0,3	0,85 ± 0,02	61 ± 1	65 ± 5
	90	2,4 ± 0,2	0,99 ± 0,04	57 ± 4	71 ± 1
	240	2,50 ± 0,08	0,97 ± 0,06	52,2 ± 0,2	75 ± 2
	1440	2,03 ± 0,09	1,30 ± 0,03	47 ± 3	98 ± 6

Podemos observar un considerable proceso de purificación cuando la proteína inmediatamente entra en contacto con el polímero (tiempo cero). En todos los casos la relación entre purificación y rendimiento es inversa.

6.2.10. Precipitación de endoglucanasa obtenida de un cultivo fúngico con CHS

De la misma forma que con PVS, se utilizó el extracto fúngico obtenido del cultivo de la fermentación en estado sólido sobre pellet de cáscaras de soja para aplicar la metodología bioseparativa de precipitación con CHS.

La precipitación se realizó en las condiciones más favorables establecidas previamente en este trabajo. Se seleccionó una relación de masas polímero/proteína cercana a la obtenida en los estudios sobre la enzima comercial.

A un determinado volumen del extracto se le adicionó un volumen de CHS 0,05% P/V que permitiera las relaciones de masas, calculadas en función de las proteínas totales,

cercanas a 0,0286 mg CHS/mg proteínas totales. También se realizó para una relación de masas superior e inferior a la misma.

Se incubó a 15°C durante 50 min y luego se centrifugó a 3300 rpm por 10 min. Para redissolver el precipitado se llevó a pH 5,10 con agregado de NaCl 0,50 M. Se determinaron proteínas totales y actividad para cada fracción, y se calcularon los valores de factores de purificación y porcentaje de rendimiento para cada caso.

La Tabla 6.VIII muestra los parámetros de purificación de endoglucanasa del extracto fúngico a diferentes proporciones de masas CHS/proteína. Una muestra del extracto fúngico fue considerada como control. Los factores de purificación fueron mayores a los obtenidos con la endoglucanasa comercial. Sin embargo, los porcentajes de rendimiento fueron menores.

Tabla 6.VIII. Parámetros de purificación de precipitación de endoglucanasa del extracto fúngico en diferentes proporciones de CHS/ proteínas totales (P.T.).

CHS/P.T. (mg/mg)	Fracción	P. T. (mg mL ⁻¹)	Act. Endo. (U mL ⁻¹)	FP	%R
	Control	13,5 ± 0,4	334 ± 5	1	100
0,0185	Precipitado	0,58 ± 0,01	60,6 ± 0,8	4,2 ± 0,1	18,2 ± 0,3
	Sobrenadante	13,2 ± 0,4	309 ± 3	0,94 ± 0,03	92 ± 1
0,0296	Precipitado	0,55 ± 0,01	94,2 ± 0,8	6,9 ± 0,2	28,2 ± 0,4
	Sobrenadante	12,9 ± 0,5	299 ± 5	0,94 ± 0,04	89 ± 1
0,0407	Precipitado	0,52 ± 0,01	-	-	-
	Sobrenadante	12,1 ± 0,4	268 ± 5	0,89 ± 0,01	80 ± 1

6.2.10.1. SDS-PAGE y análisis de zimograma de actividad endoglucanasa del extracto fúngico y del precipitado re-disuelto utilizando CHS

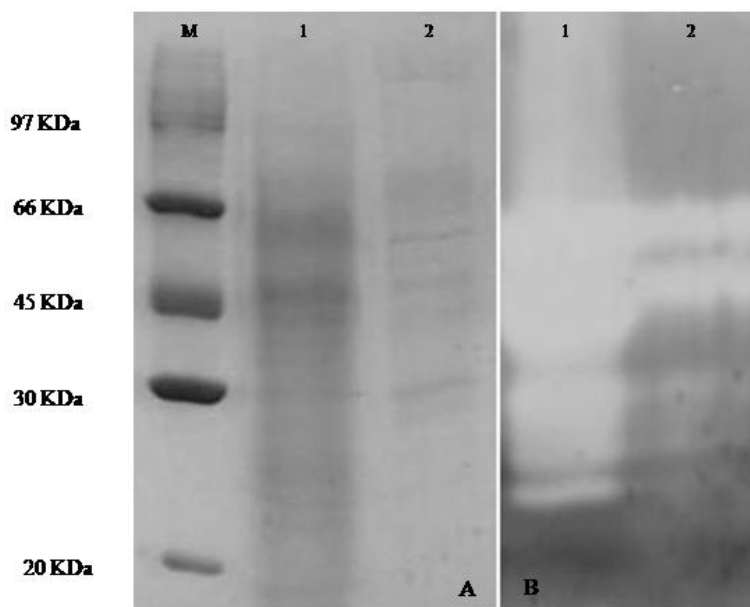


Figura 6.18: Geles de SDS-poliacrilamida seguidos por la tinción para visualización de proteínas (A) y actividad endoglucanasa (B) en el extracto fúngico y en el precipitado re-disuelto usando CHS como agente precipitante. Marcadores de PM: Fosforilasa b (97 KDa), Albúmina (66 KDa), Ovoalbúmina (45 KDa), Anhidrasa carbónica (30 KDa), Inhibidor de Tripsina (20 KDa) (calle M). Extracto fúngico de pellet de cáscaras de soja (calle 1). Precipitado re-disuelto utilizando CHS (calle 2).

La Figura 6.18 (A) muestra el patrón proteico del extracto fúngico y el precipitado re-disuelto utilizando CHS como agente precipitante. De la misma forma que utilizando PVS, se observa que la cantidad de proteína disminuyó en el precipitado re-disuelto con respecto al extracto fúngico.

La Figura 6.18 (B) muestra las mismas muestras después de la tinción con Rojo Congo para la visualización de actividad endoglucanasa. Se obtuvieron resultados similares a los observados en la sección 6.1.10.1. El análisis de zimograma presentó al menos cinco bandas en el extracto fúngico. En el precipitado re-disuelto se detectaron dos bandas

intensas que presentaron un peso molecular de 61 y 47 KDa y otras bandas débiles que se encontraron en un rango de peso molecular entre 20-30 KDa.

6.3. Espectros de dicroísmo circular de endoglucanasa en ausencia y presencia de CHS

La Figura 6.19 muestra los espectros de dicroísmo circular (DC) de EG en presencia y ausencia de CHS. El espectro de DC en el UV lejano de EG presenta un pico positivo a 195 nm y pico negativo a 216 nm, que es un típico perfil observado para proteínas que presentan estructuras β -lámina antiparalelas (Greenfield 2006).

Cuando la enzima interacciona con CHS se puede observar una disminución en la intensidad de la banda a 216 nm y un aumento en el pico a 195 nm, sugiriendo una modificación de su estructura secundaria.

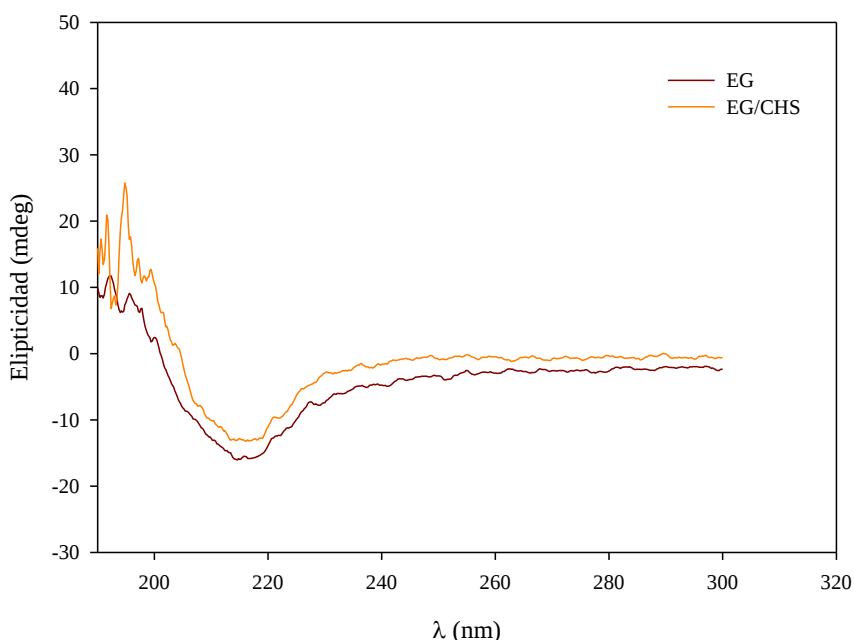


Figura 6.19: Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de EG 5,00 μM en ausencia y presencia de CHS. T =20°C.

6.4. Espectros de emisión de fluorescencia nativa de endoglucanasa en ausencia y presencia de CHS

La Figura 6.20 muestra los espectros de emisión de fluorescencia nativa de la endoglucanasa comercial purificada adquirida de Megazyme (EG) en presencia y ausencia de CHS a diferentes concentraciones para estudiar el entorno de los residuos de triptófanos, principales responsables de la señal fluorescente (Lakowicz 1983).

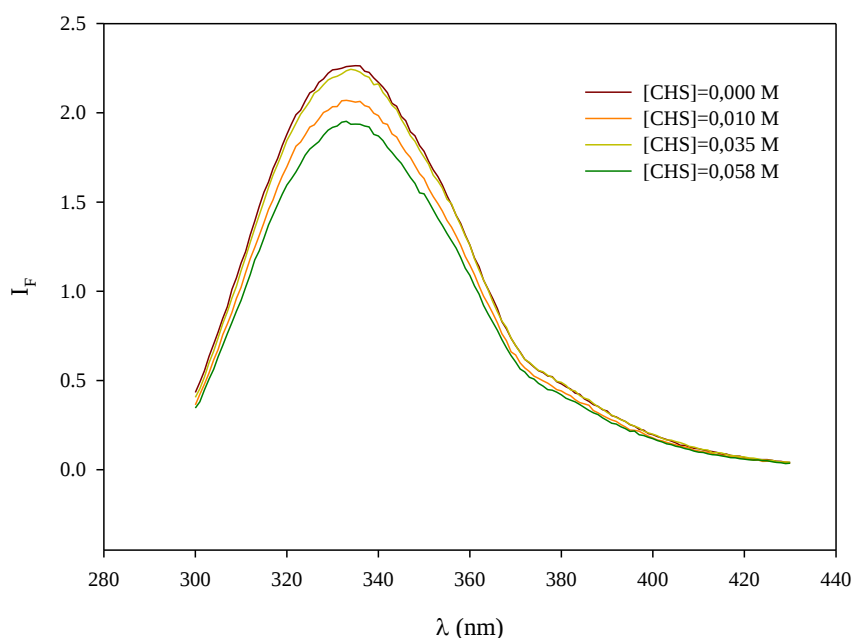


Figura 6.20: Espectro de emisión de fluorescencia de EG 0,8 μM en ausencia y presencia de CHS a diferentes concentraciones. $T = 25^\circ\text{C}$. $\lambda_{\text{exc}} 280 \text{ nm}$

La posición del pico de emisión de una proteína puede considerarse como representativa del ambiente del fluoróforo (Burstein et al. 1973). Cuanto más próximo esté el máximo de emisión a 330 nm, más escondido se encontrará el fluoróforo en el interior no polar de la proteína, y cuanto más próximo esté a 350 nm, estará más accesible al solvente.

Puede observarse que en ausencia de CHS el máximo de emisión de fluorescencia se encuentra ubicado a 335 nm, esto sugiere que los mismos están ubicados en zonas no

polares. El agregado de CHS disminuye la altura de la banda de emisión sin corrimiento de la posición del pico de emisión, esto último está indicando que no hay cambio en la energía de la emisión por la presencia del CHS, sugiriendo que la interacción CHS-EG no produce cambios conformacionales que afecten el entorno del anillo indólico del tripófano.

Capítulo 7. Resultados *y Discusión*

Capítulo 7. Resultados y Discusión: Síntesis de matrices poliméricas

7.1. Caracterización de las matrices esféricas

De acuerdo a la metodología descrita en Materiales y Métodos se sintetizaron las matrices de chitosán (CHS), chitosán modificada con Glutaraldehído (CHS-GLUT), chitosán con Eudragit® EPO (CHS-EPO), y de Alginato con Goma Arábica (ALG-GA).

7.1.1. Curvas de titulación para la determinación del punto isoelectrico de las matrices esféricas

El punto isoelectrico (pI) es el valor de pH en el que el adsorbente tiene una carga neta superficial nula. La superficie adsorbente tendrá carga positiva neta a un pH del medio menor al pI, mientras que a un pH mayor al pI, la superficie tendrá una carga neta negativa. Desde el punto de vista de la interacción electrostática, la carga positiva de las muestras bajo condiciones ácidas favorecería la adsorción de especies cargadas negativamente y, en solución básica, las condiciones pueden mejorar la adsorción de especies cargadas positivamente.

Para determinar el punto isoelectrico de las matrices se realizaron titulaciones con ácido y base, de acuerdo al método descrito en la sección 3.2.13.2.1. de Materiales y Métodos.

Las Figuras 7.1, 7.2, 7.3 y 7.4 muestran la carga total superficial del adsorbente en función del pH, para las matrices de CHS, CHS-GLUT, CHS-EPO, ALG-GA, respectivamente.

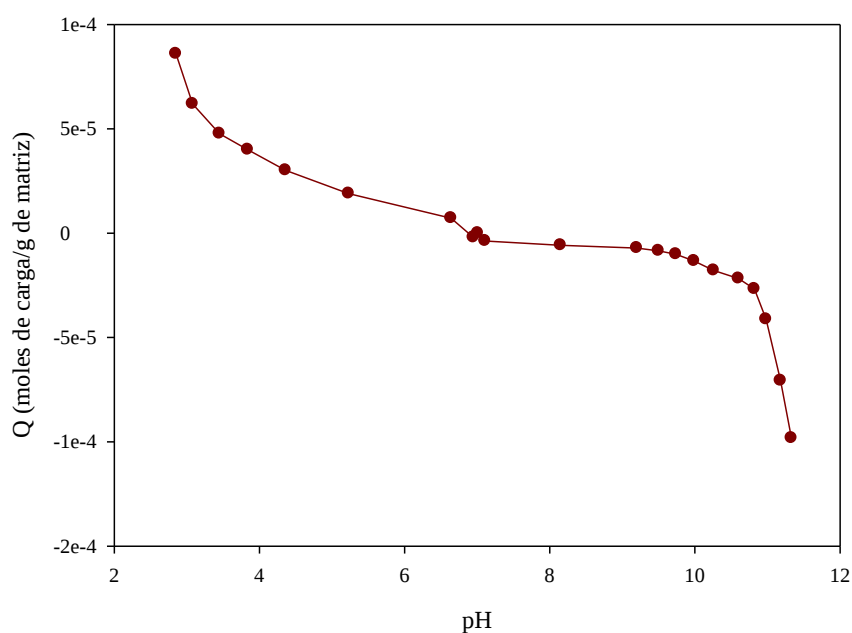


Figura 7.1: Curva de Titulación Potenciométrica de la matriz de CHS 2% P/V

De acuerdo a la Figura 7.1, la matriz CHS 2% P/V presenta un valor de pKa cercano a 6,70. Estos resultados son coincidentes con datos de bibliografía previa (Liu et al. 2005).

Por otra parte, puede observarse que a valores de pH menores a 6,70, la carga superficial del bioadsorbente es positiva, mientras que a valores de pH superiores a 6,70 la carga es negativa.

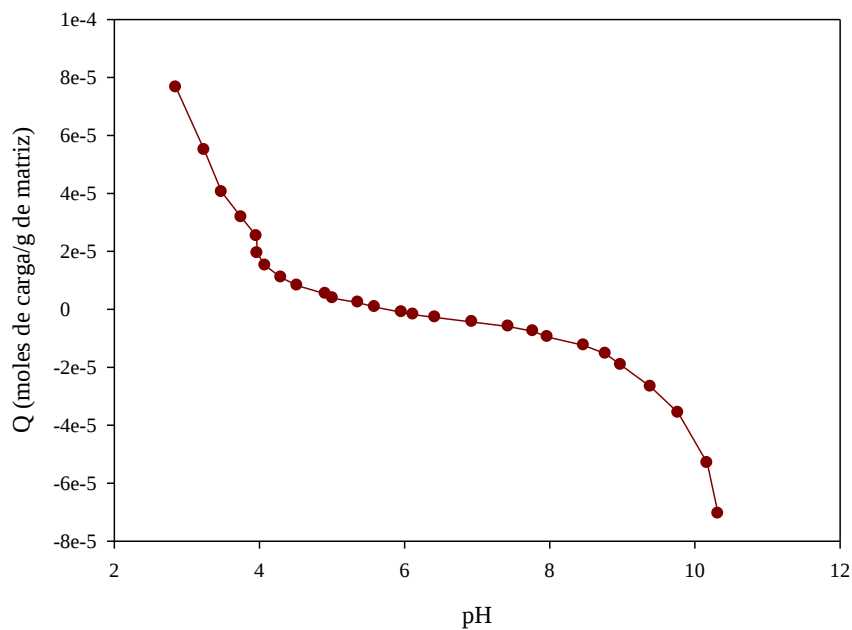


Figura 7.2: Curva de Titulación Potenciométrica de matriz CHS-GLUT

De acuerdo a bibliografía previa (Vieira and Beppu 2006), el CHS puede interaccionar químicamente con el Glutaraldehído a través de los grupos amino. Por lo tanto, en condiciones ácidas, luego de la reacción de entrecruzamiento con Glutaraldehído, se espera que la matriz de CHS 2% P/V modificada químicamente tenga una considerable disminución del número de grupos amino protonados.

En la Figura 7.2 se puede observar una ligera disminución del pI, comparando con el gráfico 7.1. Se puede apreciar que a valores de pH inferiores a 6,00, la carga de superficie es positiva, mientras que a pH superiores a 6,00, es negativa, probablemente la disminución del pI se deba a la disminución de los grupos amino cargados.

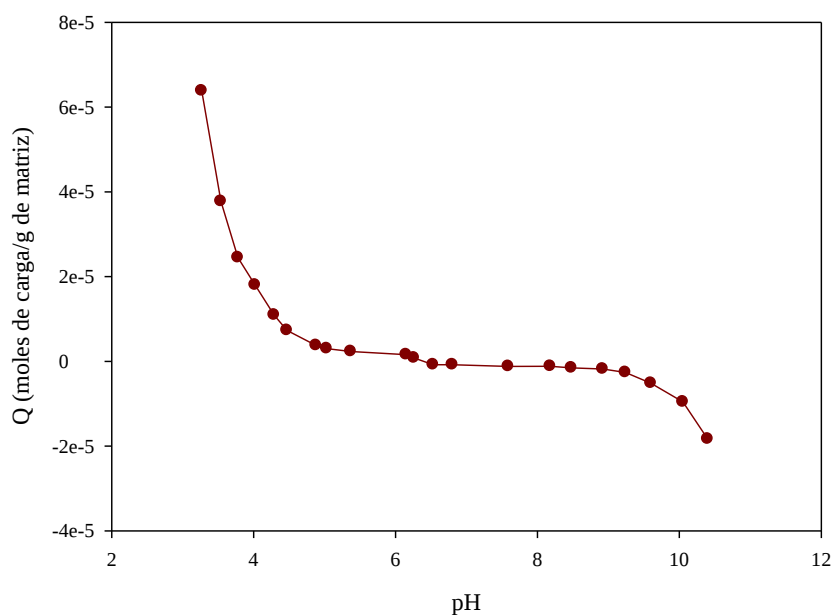


Figura 7.3: Curva de Titulación Potenciométrica de la matriz CHS-EPO

La curva de titulación de la matriz CHS-EPO, según puede observarse en la Figura 7.3, muestra un comportamiento similar al de las matrices con CHS referidas recientemente. En este caso se puede apreciar que a valores de pH por debajo de 6,30 la carga de superficie es positiva, mientras que a valores de pH por encima de 6,30, la carga de superficie de la matriz es negativa.

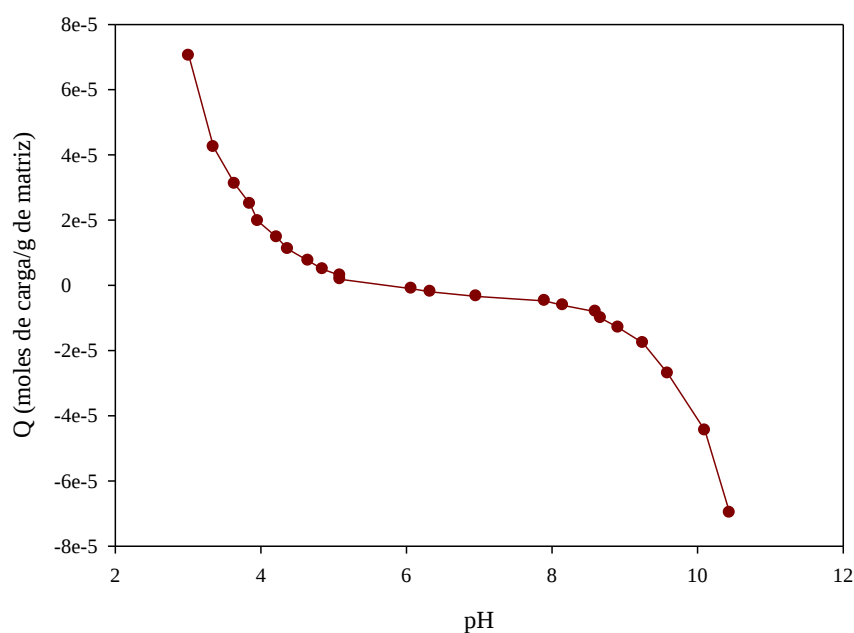


Figura 7.4: Curva de Titulación Potenciométrica de la matriz ALG-GA

La Figura 7.4 describe la curva de titulación de la matriz ALG-GA, en la cual se observa que a valores de pH inferiores a 6,00, la matriz presenta carga de superficie positiva, mientras que a valores de pH superiores a 6,00, la carga es negativa.

En la Figura 7.5 se puede apreciar las curvas de titulación potenciométricas de las cuatro matrices. Como puede observarse en la gráfica, a valores de pH ácidos la matriz de CHS tiene mayor carga positiva que el resto de las matrices. Por el contrario, a pH básico, las matrices de CHS y CHS-EPO tienen menos carga negativa que las matrices de CHS-GLUT y ALG-GA.

Si bien no se ha encontrado diferencia significativa entre los rangos de pI de las matrices estudiadas, una interacción matriz-proteína más favorable podría explicarse por la presencia de diferentes grupos químicos expuestos en la superficie de cada matriz.

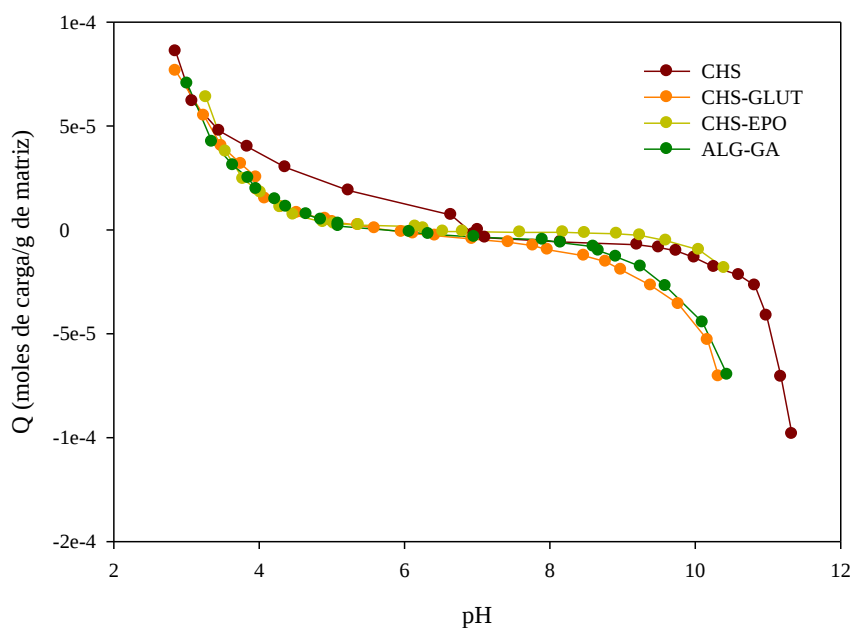


Figura 7.5: Curva de Titulación Potenciométricas de las matrices de CHS, CHS-GLUT, CHS-EPO, ALG-GA

7.1.2. Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier de las matrices esféricas

Con el objeto de identificar y verificar modificaciones químicas sobre la matriz de CHS luego de la síntesis de CHS-GLUT y CHS-EPO se realizó espectrometría infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) utilizando Reflectancia Total Atenuada (ATR) de las matrices. Los espectros obtenidos se muestran en la Figura 7.6.

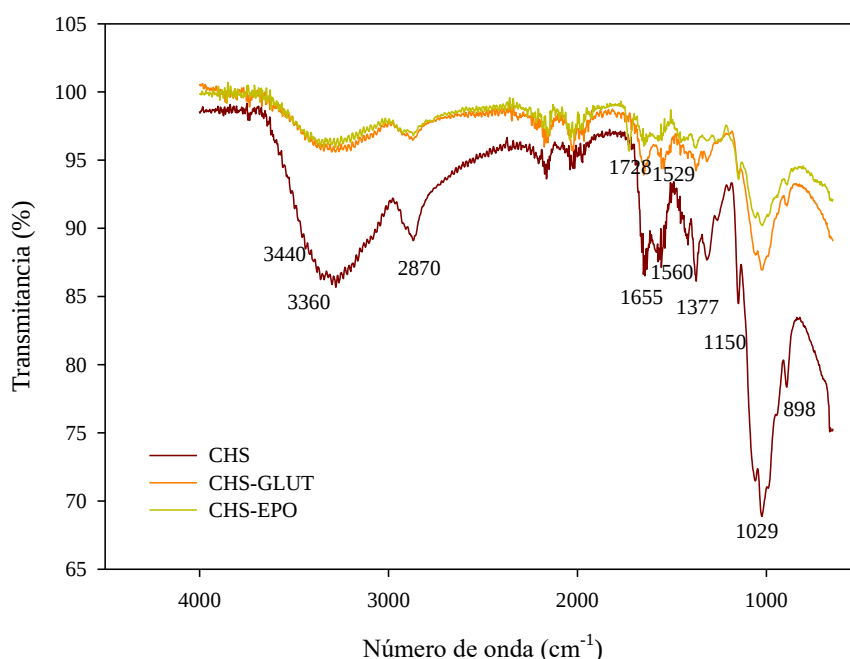


Figura 7.6: Espectros FTIR-ATR de las matrices CHS, CHS-GLUT, CHS-EPO

El espectro de la matriz de CHS muestra los clásicos picos asignados a la estructura del polisacárido. Las principales señales son: una intensa y amplia banda a 3360 cm^{-1} , que se atribuye a vibraciones de estiramiento del grupo NH, que se superpone con el pico a 3440 cm^{-1} correspondiente a la presencia de grupos -OH ; un pico a 2870 cm^{-1} asociado a vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas del anillo piranosa; el pico a 1655 cm^{-1} correspondiente al estiramiento axial del grupo C=O en el grupo amida; la señal a 1560 cm^{-1} atribuida a la vibración de flexión de NH en el grupo amida y la vibración de OH en el anillo piranosa localizada a 1415 cm^{-1} . El pico localizado a 1377 cm^{-1} corresponde a la deformación simétrica del grupo CH_3 . Finalmente, la región entre $1150\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ pertenece a vibraciones de los grupos C-O y C-O-C del enlace glucosídico, señales características del chitosán (Pawlak and Mucha 2003; Corazzari et al. 2015).

De acuerdo a la Figura 7.6, se observa una notoria reducción en la intensidad en la banda a 3360 cm^{-1} correspondiente a los grupos NH y una disminución de la señal a

1100 cm^{-1} , correspondiente a grupos amino alifáticos, luego de la modificación química de la matriz de CHS para obtener la matriz de CHS-GLUT. Este hecho es coherente dado que el *crosslinking* del glutaraldehído del chitosán ocurre principalmente a través de los grupos amino del chitosán (Vieira and Beppu 2006; Beppu et al. 2007).

Además, después de la reacción de *crosslinking*, un nuevo pico surge a 1529 cm^{-1} sugiriendo una interacción de los grupos $-\text{NH}_2$ del CHS con los grupos $-\text{CHO}$ del GLUT (Kamari et al. 2009).

Por otra parte la matriz CHS-EPO presenta una banda a 1728 cm^{-1} , característica del Eudragit® EPO, perteneciente a vibraciones de $\text{C}=\text{O}$ en el grupo éster. Además, los grupos dimetilamina no-ionizados del EPO, presentan una señal a 2823 cm^{-1} que se superpone con la banda 2870 cm^{-1} como se observa en la Figura 7.6.

7.1.3. Microscopía Electrónica de Barrido de las matrices esféricas

Se llevó a cabo Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las matrices para comparar la morfología de superficie de las mismas. La Figura 7.7 muestra las imágenes de SEM de las matrices de CHS, CHS-GLUT, CHS-EPO Y ALG-GA. Puede apreciarse la diferencia en la morfología de superficie de las matrices de CHS, CHS-GLUT y CHS-EPO. Este hecho evidencia que la modificación química de la matriz de CHS ha ocurrido.

De acuerdo a la Figura 7.7, las matrices de CHS y ALG-GA presentan una superficie lisa y no porosa. Por el contrario, la matriz de CHS-GLUT presenta una superficie estriada y la matriz de CHS-EPO exhibe una superficie rugosa. Una mayor rugosidad en la superficie de la matriz podría contribuir a aumentar la adsorción de biomoléculas (Rodrigues et al. 2013)

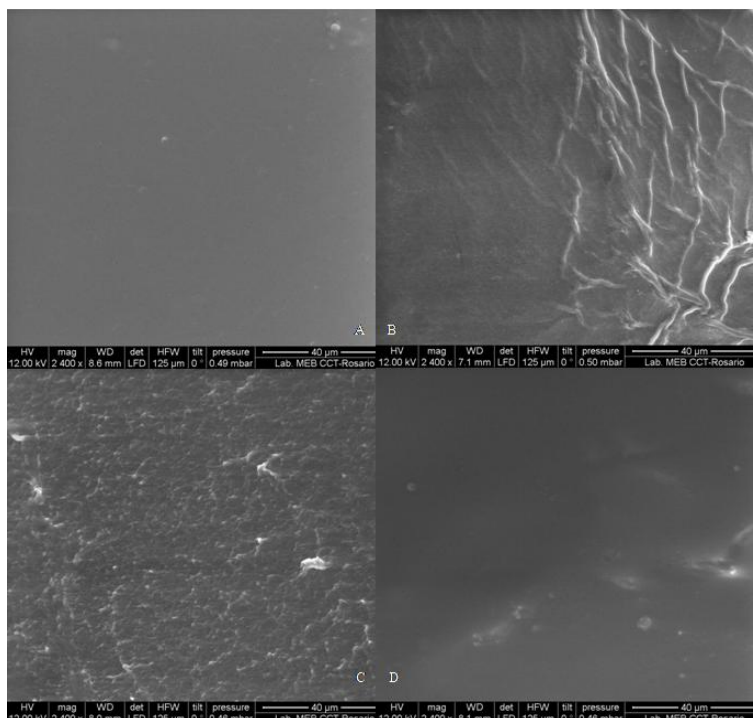


Figura 7.7: SEM de las matrices de CHS (A), CHS-GLUT (B), CHS-EPO (C), ALG-GA (D)

7.2. Caracterización de las membranas poliméricas

Recientemente, ha incrementado el interés en membranas poliméricas para la separación de proteínas (Plate et al. 2006; Sun and Wu 2014).

Membranas poliméricas con grupos funcionales mejoran la capacidad y eficiencia de adsorción. Por este motivo, el desarrollo de membranas poliméricas químicamente modificadas es de gran interés debido al rol protagónico que tiene el adsorbente en el proceso de adsorción (Emik 2014).

Para mejorar la selectividad de adsorción de endoglucanasa se sintetizaron membranas de CHS funcionalizadas con aminoácidos y cobre tal como se describe en la sección 3.2.13.1.8. de Materiales y Métodos.. Las membranas obtenidas se caracterizaron a través de FTIR-ATR, SEM, Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

7.2.1. SEM de las membranas de CHS

La técnica SEM fue realizada para comparar la morfología de superficie de las membranas de CHS. La Figura 7.8 muestra micrografías electrónicas de barrido de la membranas de CHS y las membranas de CHS funcionalizadas con aspartato, glutamato, histidina, taurina y cobre. Se observa que después de la funcionalización todas las membranas exhibieron su superficie modificada, especialmente en relación a sus poros. La membrana de CHS, no modificada químicamente, presentó poros de gran tamaño, siendo algunos mayores a 30 μm de diámetro (Figura 7.8. A). Sin embargo, el diámetro del poro se redujo después de la funcionalización. La membrana CHS-Asp-Cu (membrana de quitosán funcionalizada con aspartato y cobre) presentó una morfología de superficie más lisa que las otras (Figuras 7.8 B-E). La membrana CHS-Glu-Cu (membrana de quitosán funcionalizada con glutamato y cobre) exhibió poros de 720 nm de diámetro aproximadamente. El ancho del poro de la membrana CHS-His-Cu (membrana de quitosán funcionalizada con histidina y cobre) varió dentro de un rango de 500 nm a 1 μm . La membrana CHS-Tau-Cu (membrana de quitosán funcionalizada con taurina y cobre) presentó tamaños de poro por encima de 857 nm de diámetro. Los resultados obtenidos comprobaron que la funcionalización de las membranas de quitosán se produjo dado que la superficie de la membrana de CHS ha sido modificada.

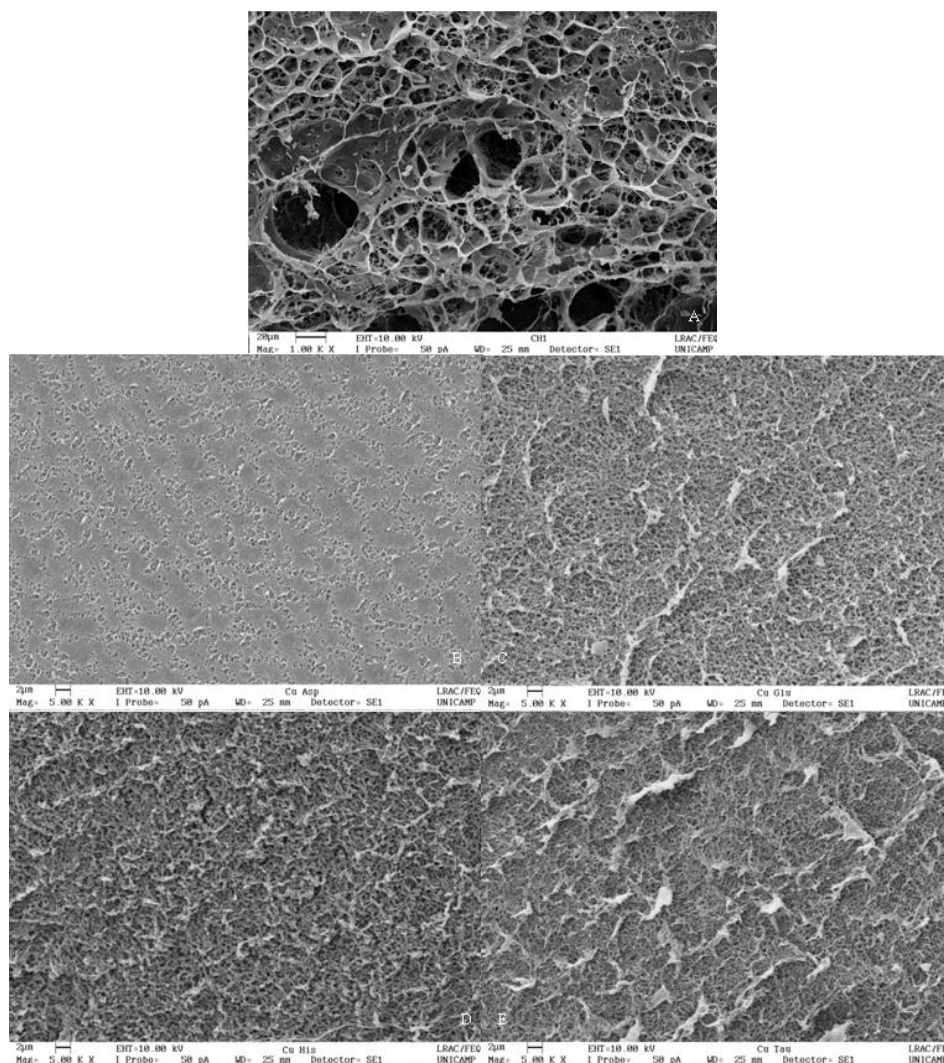


Figura 7.8: SEM de las membranas de CHS (A), CHS-Asp-Cu (B), CHS-Glu-Cu (C), CHS-His-Cu (D), CHS-Tau-Cu (E)

7.2.2. Análisis FTIR de membranas

Se obtuvieron espectros FTIR-ATR de las membranas de chitosán funcionalizadas con aminoácidos y cobre para identificar los cambios en las interacciones químicas que podrían tomar lugar después de la funcionalización de las membranas de chitosán y la adsorción endoglucanasa de Megazyme (EG) (Figura 7.9-7.12).

En general, se observó que los principales cambios en los espectros FTIR-ATR después de la adsorción endoglucanasa fueron similares para todas las membranas analizadas,

sugiriendo que el mecanismo de adsorción endoglucanasa sobre los 4 tipos de membranas funcionalizadas fue esencialmente el mismo.

En las Figuras 7.9-7.12, se observa que el pico a 3440 cm^{-1} , atribuido a la presencia de grupos $-\text{OH}$, se superpone con la vibración de estiramiento de $-\text{NH}$ a 3360 cm^{-1} . Las bandas a $2910\text{-}2870$, 1730 , 1655 , 1590 , 1560 , 1415 , 1377 , 1255 , 898 cm^{-1} corresponden a vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas de grupos CH_2 en el anillo piranosa, vibraciones del grupo carbonilo, estiramiento axial del $\text{C}=\text{O}$ en el grupo amida, NH_2 en el grupo amino, vibración de flexión de NH en el grupo amida, vibración de OH en el anillo piranosa, deformación simétrica de CH_3 , grupo C-O , y vibración de estiramiento del grupo CH_3OH , respectivamente (Pawlak and Mucha 2003; Corazzari et al. 2015; Wang et al. 2016). Se observan variaciones en la intensidad de estos picos luego de la funcionalización con aminoácidos y cobre y la adsorción de endoglucanasa. Finalmente, la región que se encuentra entre $1150\text{-}1024\text{ cm}^{-1}$, corresponde a vibraciones del grupo $-\text{C-O-C}-$ en el enlace glicosídico. En esta región, se observaron intensos picos a 1069 cm^{-1} y 1029 cm^{-1} en la membrana de CHS, pero disminuyeron significativamente luego de la funcionalización con cobre.

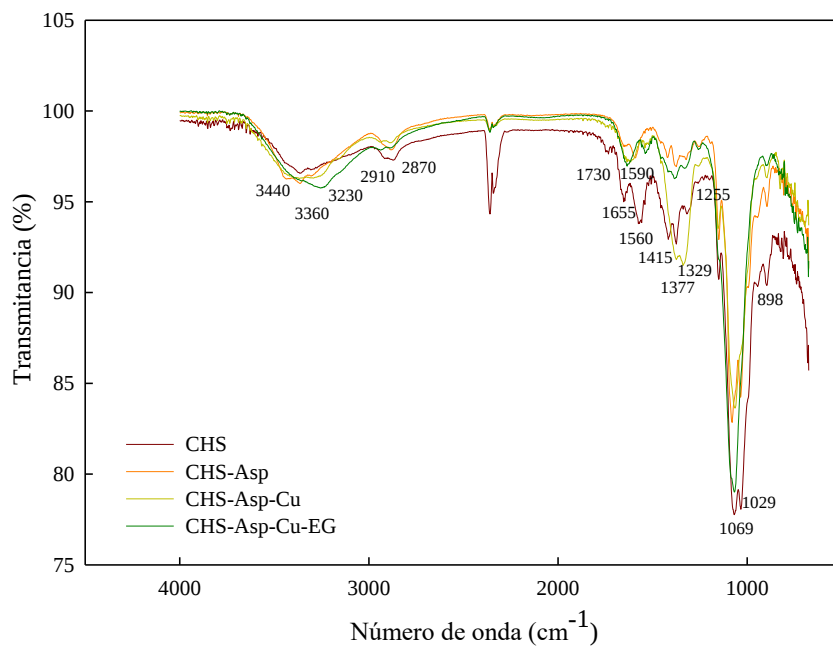


Figura 7.9: Espectros FTIR-ATR de la membrana de CHS funcionalizada con Asp y Cu

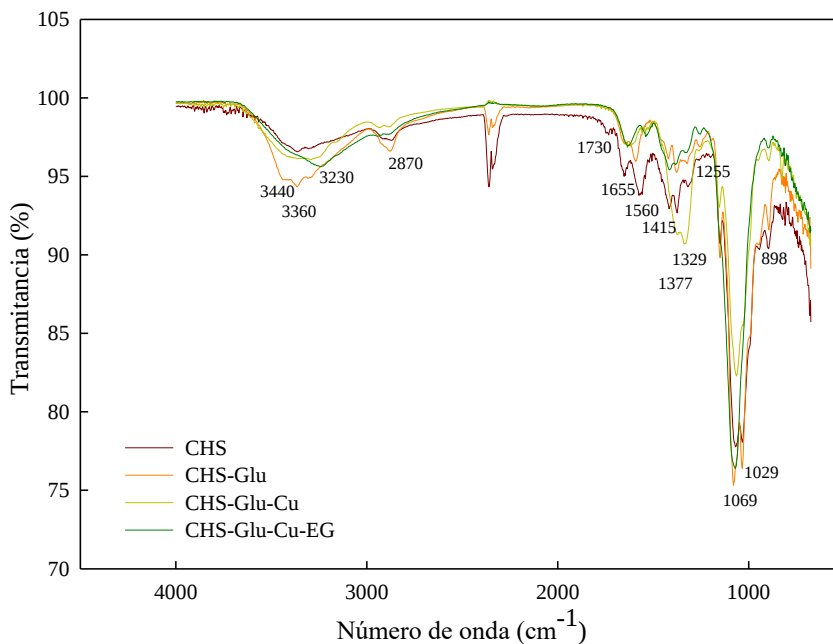


Figura 7.10: Espectros FTIR-ATR de la membrana de CHS funcionalizada con Glu y Cu

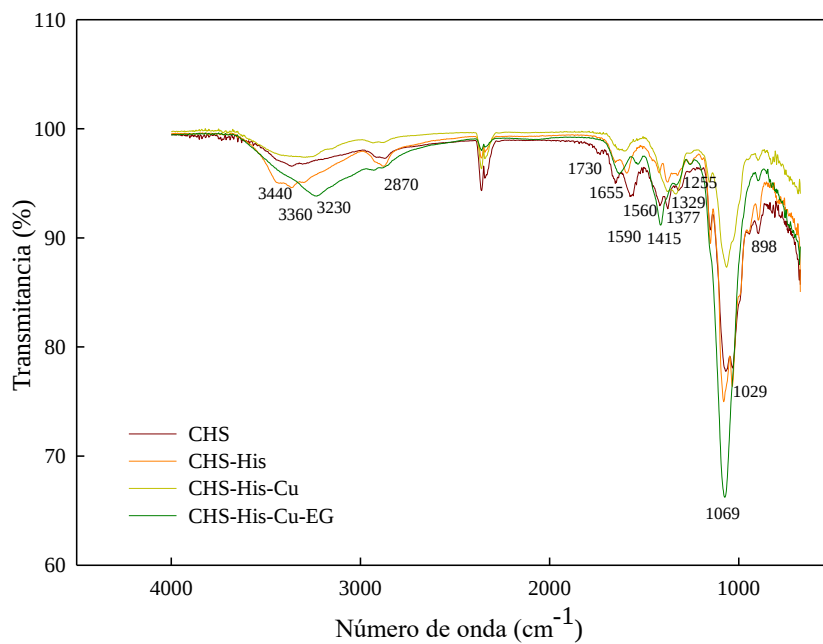


Figura 7.11: Espectros FTIR-ATR de la membrana de CHS funcionalizada con His y Cu

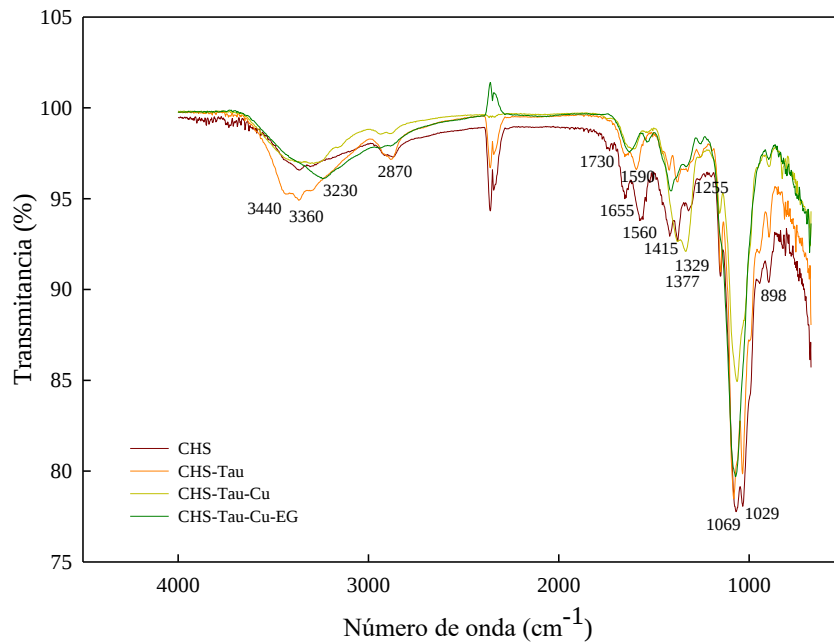


Figura 7.12: Espectros FTIR-ATR de la membrana de CHS funcionalizada con Tau y Cu

Estos resultados sugieren una efectiva modificación química de las membranas de chitosán con aminoácidos y cobre. Además, una nueva banda, atribuída a N-Cu-O, surgió a 1329 cm^{-1} luego de la funcionalización con cobre (Cheng et al. 2010).

Además, los picos localizados a 1560 cm^{-1} , asociados con grupos -NH , disminuyeron su intensidad después de la funcionalización de la membrana de chitosán. Esta disminución en la banda a 1560 cm^{-1} en todas las membranas de chitosán modificadas y la simultánea aparición de un pico a 1329 cm^{-1} atribuído a N-Cu-O confirman que la funcionalización con cobre ha ocurrido, probablemente debido a un proceso de quelación entre el cobre y los grupos aminos (Beppu et al. 2004).

Después de la adsorción de la endoglucanasa, se observó la aparición de una banda a 3230 cm^{-1} la cual indica una relación con vibraciones de estiramiento de N-H en las moléculas de endoglucanasa (Gole et al. 2002). Esto evidencia la adsorción efectiva de la enzima sobre las membranas de chitosán modificadas.

7.2.3. Análisis termogravimétrico de las membranas de CHS

La degradación térmica de las membranas de chitosán funcionalizadas con aminoácidos y cobre se estudió a través de un análisis termogravimétrico (TGA). La Figura 7.13 muestra las curvas de TG (termogravimetría) y DTG (derivada de TG), pérdida de masa vs. Temperatura, para la membrana de CHS funcionalizada con taurina y cobre. Patrones similares fueron obtenidos para las otras membranas funcionalizadas.

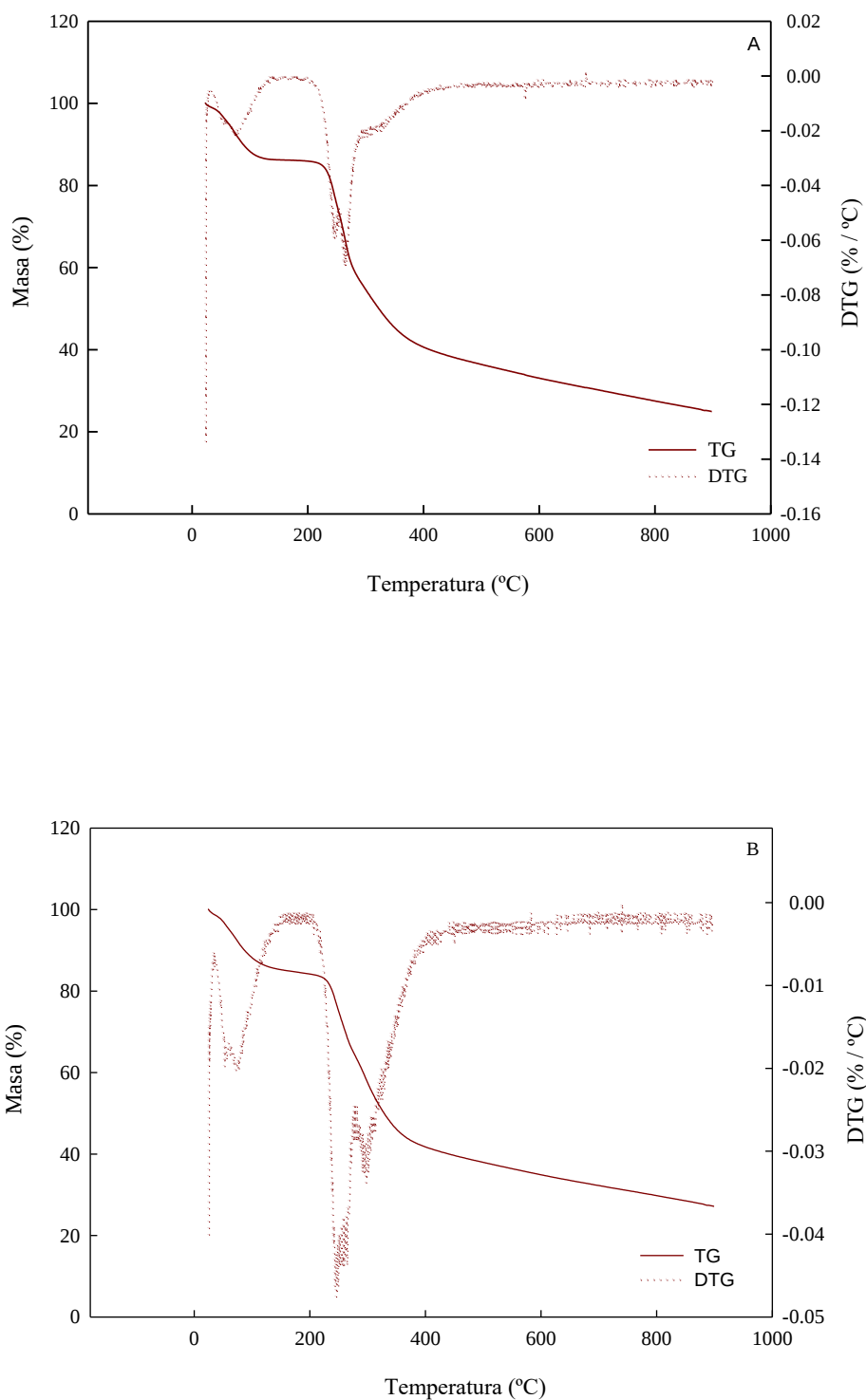


Figura 7.13: Curvas de TG y DTG para membrana de CHS-Tau-Cu sin EG adsorbida (A) y con EG adsorbida (B).

Los parámetros termogravimétricos característicos son: la temperatura a la cual comienza la degradación térmica (T_{onset}), la temperatura a la cual la degradación

térmica es máxima (T peak), la temperatura a la cual el proceso es completo (T end set) y el porcentaje de pérdida de masa durante cada etapa (W%). La Tabla 7.I muestra los datos comparativos de la degradación térmica. La degradación de las membranas funcionalizadas con aminoácidos y cobre se dividió en dos etapas. El primer proceso de degradación que comienza a 100°C se atribuye a la pérdida de agua unida a la membrana. El segundo estadio observado en el rango de temperaturas 223-362°C está relacionado a la descomposición del chitosán (Rusu et al. 2015).

Las membranas de chitosán funcionalizadas con aminoácidos y cobre sin endoglucanasa adsorbida mostraron una reducción en su estabilidad térmica en el primer estadio en relación a las que tenían endoglucanasa adsorbida. La Tabla 7.I muestra que la T onset en el estadio I para la pérdida de masa inicial se incrementó cuando las membranas de chitosán funcionalizadas fueron unidas a endoglucanasa. Esta mayor resistencia térmica en las membranas adsorbidas con endoglucanasa probablemente se deba a una disminución en la hidrofiliidad de la membrana polimérica cuando la endoglucanasa es adsorbida sobre la membrana representando una menor retención de agua por parte de la misma.

Sin embargo, en el estadio II la degradación térmica de las membranas funcionalizadas unidas a endoglucanasa comenzó a menor temperatura (se observa una T onset menor en el estadio II para las membranas funcionalizadas unidas a endoglucanasa con respecto a las mismas sin la enzima adsorbida). Esto indica que la adsorción de endoglucanasa convierte a la membrana de chitosán funcionalizada menos estable en este rango de temperatura. Según estudios previos (Tirkistani 1998), los grupos amino libres tienen un efecto estabilizante sobre el polímero. Por lo tanto, la adsorción de endoglucanasa podría ocurrir a través de grupos amino, dejando a la matriz menos estable como se observa en el rango de temperatura del segundo estadio.

Tabla 7.I. Características termogravimétricas de las membranas de chitosán funcionalizadas

Membranas	Etapas	T onset (°C)	T end set (°C)	T peak (°C)	W(%)
CHS-Asp-Cu	I	37,24	80,63	50,08	14,72
	II	230,96	362,29	263,70	72,69
CHS-Asp-Cu-EG	I	58,33	113,42	72,88	18,41
	II	224,20	333,12	293,40	29,39
CHS-Glu-Cu	I	59,30	106,60	74,32	15,26
	II	230,95	298,96	259,70	35,52
CHS-Glu-Cu-EG	I	67,27	112,42	79,20	18,11
	II	223,02	345,79	240,50	38,23
CHS-His-Cu	I	61,36	96,69	71,53	12,77
	II	235,59	306,88	262,10	36,85
CHS-His-Cu-EG	I	82,86	106,52	77,05	16,06
	II	225,82	347,09	242,40	41,04
CHS-Tau-Cu	I	77,46	106,99	73,26	16,40
	II	231,48	313,46	263,70	40,62
CHS-Tau-Cu-EG	I	98,83	105,98	74,53	15,24
	II	223,91	343,78	245,70	37,03

7.2.4. Estudios de Calorimetría Diferencial de Barrido de las membranas de CHS

La Figuras 7.14, 7.15, 7.16 y 7.17 muestran los termogramas de DSC de las membranas de CHS funcionalizadas con aminoácidos y cobre. Las curvas obtenidas por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) fueron consistentes con los resultados obtenidos por TG.

En las Figuras 7.14-7.17 se observa un pico endotérmico cercano a 100°C que puede ser atribuido a la pérdida de agua (Pawlak and Mucha 2003).

De acuerdo a bibliografía previa (Sakurai et al. 2000), la degradación térmica del chitosán comienza a una temperatura de 250°C. El segundo evento térmico, es decir, los picos exotérmicos que se encuentran en un rango de 221-269°C podrían estar asociados a la descomposición de grupos amino del chitosán.

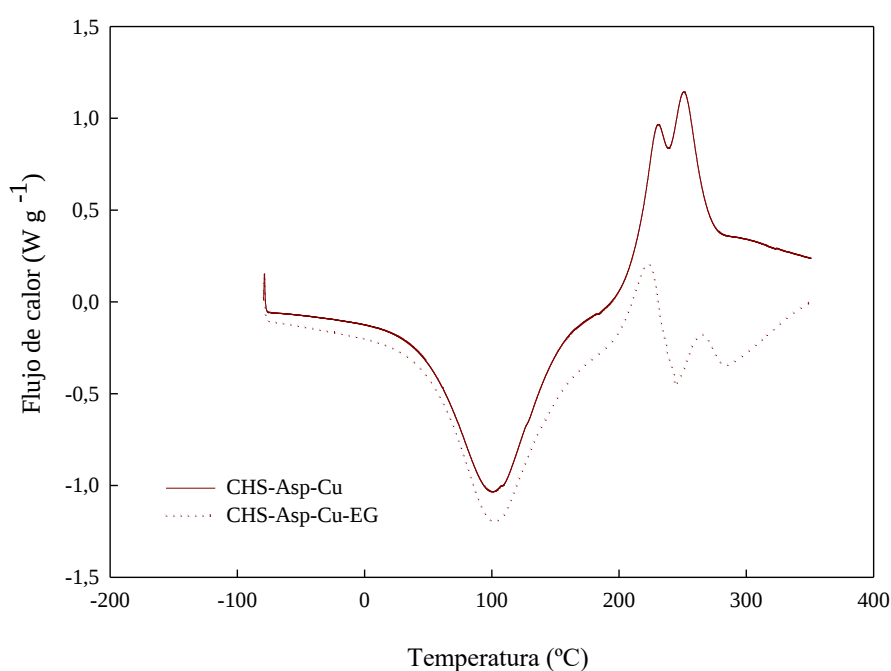


Figura 7.14: Termogramas obtenidos por DSC de la membrana de CHS-Asp-Cu y CHS-Asp-Cu-EG

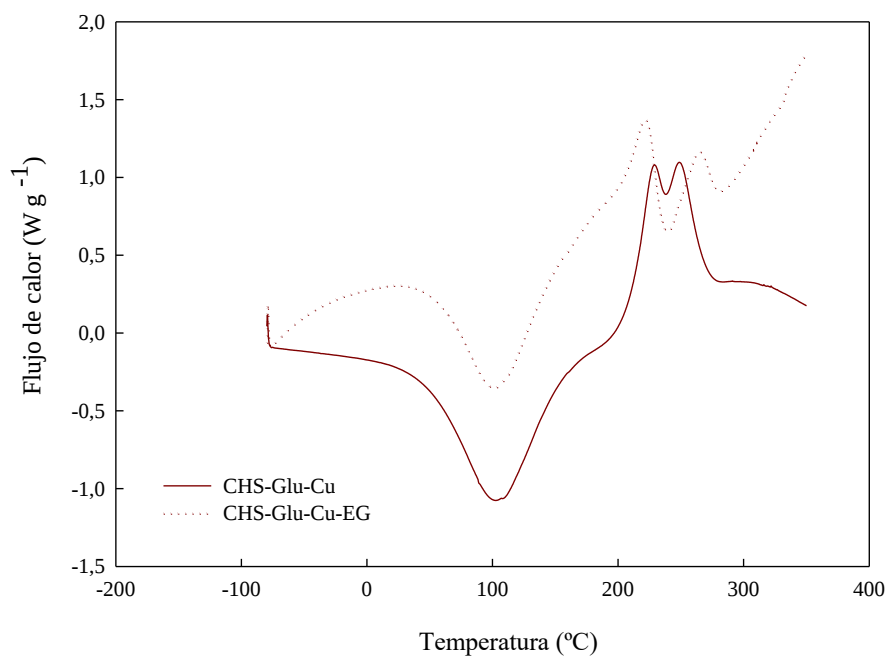


Figura 7.15: Termogramas obtenidos por DSC de la membrana de CHS-Glu-Cu y CHS-Glu-Cu-EG

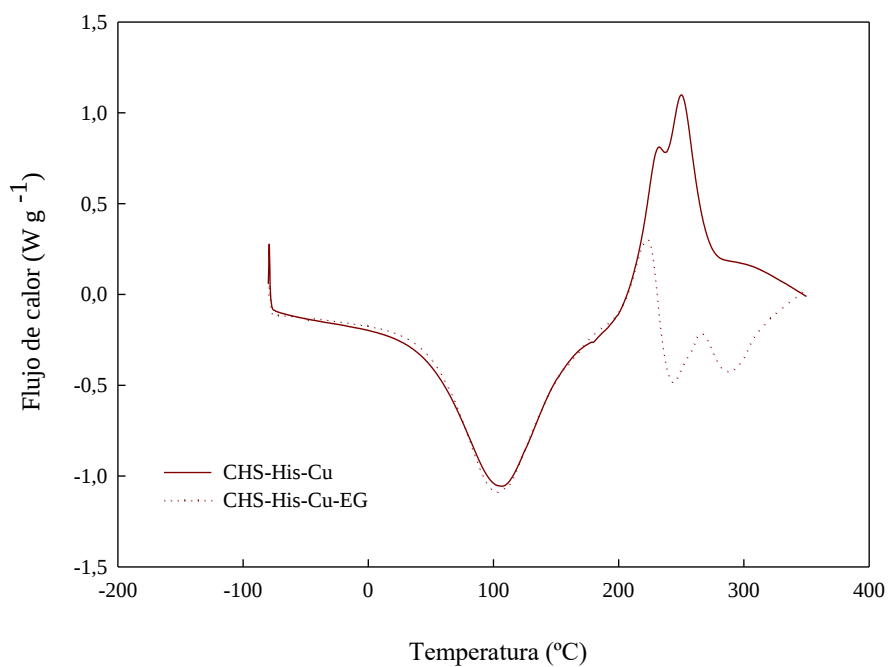


Figura 7.16: Termogramas obtenidos por DSC de la membrana de CHS-His-Cu y CHS-His-Cu-EG

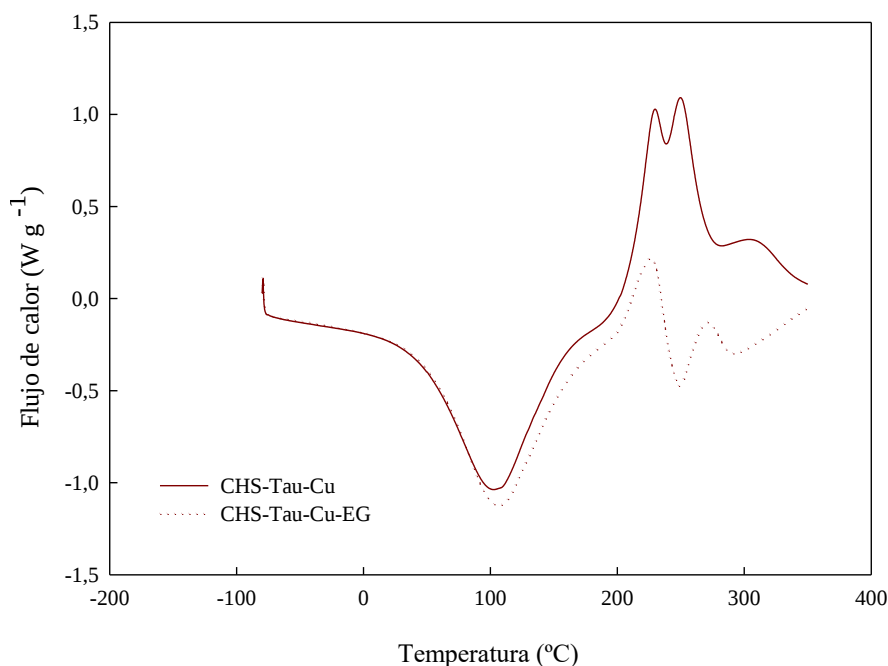


Figura 7.17: Termogramas obtenidos por DSC de la membrana de CHS-Tau-Cu y CHS-Tau-Cu-EG

La Tabla 7.II. muestra los picos endotérmicos y exotérmicos y las entalpías relacionadas a cada pico para las membranas de CHS funcionalizadas con aminoácidos y cobre con y sin endoglucanasa adsorbida. Todas las membranas presentaron un pico endotérmico debido a la pérdida de agua asociada a los grupos hidrofílicos, mientras que el pico exotérmico corresponde a la descomposición del chitosán (dos Santos et al. 2005).

Además, cuando la T_{onset} en el segundo evento térmico, de cada membrana funcionalizada de chitosán unida a endoglucanasa fue comparada con la T_{onset} obtenida de las membranas sin la enzima adsorbida, se observó que las primeras presentaron una menor temperatura probablemente debido a la presencia de endoglucanasa (Tabla 7.II). Estos resultados fueron también observados en los análisis de TG.

Los resultados de los análisis de SEM, FTIR-ATR, DSC y TG obtenidos en este estudio corroboran la existencia de una diferencia de composición química que determina un

cambio estructural entre las membranas antes y después de la adsorción de endoglucanasa, confirmando la adsorción de la enzima.

Tabla 7.II: Temperaturas de los picos y cambios entálpicos en los termogramas de DSC de las membranas de chitosán funcionalizadas

Membranas	Temperatura(°C)			ΔH (J/g)
	T onset	T end set	T peak	
CHS-Asp-Cu	45,28	154,66	100,17	-400,76
	221,71	271,02	250,11	244,06
			230,23	
CHS-Asp-Cu-EG	49,15	157,78	101,12	-417,72
	195,50	243,63	223,22	100,13
	246,98	280,57	263,78	28,46
CHS-Glu-Cu	66,01	106,39	102,15	-333,25
	209,35	256,30	228,93	240,18
			248,95	
CHS-Glu-Cu-EG	53,65	150,37	102,60	-278,76
	198,32	234,08	221,69	95,85
	242,44	277,96	263,66	45,90
CHS-His-Cu	49,59	158,24	106,79	-319,73
	217,65	271,48	249,81	270,57
			232,22	
CHS-His-Cu-EG	54,05	151,00	101,64	-276,58
	191,52	237,32	222,74	152,60
	252,95	282,18	265,44	30,32
CHS-Tau-Cu	47,68	157,43	102,98	-349,02
	220,18	270,04	229,43	256,20
			249,62	
CHS-Tau-Cu-EG	49,53	170,04	106,11	-422,88
	201,15	243,00	227,23	88,32
	251,72	288,21	269,63	36,27

Capítulo 8. Resultados *y Discusión*

Capítulo 8. Resultados y Discusión: Adsorción de endoglucanasa sobre matrices poliméricas

8.1. Adsorción de endoglucanasa de *Aspergillus niger* sobre matriz de CHS 3% P/V triturada en buffer fosfato 50 mM pH 7,00 y pH 6,00

A continuación de la síntesis de la matriz de CHS 3% P/V triturada, se estudió la adsorción de endoglucanasa de *A. niger* de una solución de liofilizado comercial (LCC) sobre la misma. Para ello se estudiaron diferentes variables que podrían llegar a afectar el proceso de adsorción.

Para el estudio de la capacidad de adsorción de la matriz, se procedió a determinar el efecto del pH y la fuerza iónica del medio de trabajo sobre la adsorción de la endoglucanasa sobre la matriz de CHS 3% P/V triturada. Se eligió variar dichos parámetros ya que es conocido que afectan notablemente al proceso de adsorción (Kyriacou et al. 1988; Reinikainen et al. 1995).

8.1.1. Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS 3% P/V triturado en buffer fosfato 50 mM pH 7,00

La Figura 8.1 muestra la variación en la concentración de proteínas totales y actividad endoglucanasa durante el proceso de adsorción. Como puede observarse, la actividad enzimática en el sobrenadante permanece constante durante los primeros 10 min pero luego disminuye con el tiempo a medida que la enzima se adsorbe sobre la matriz alcanzando el mínimo a los 90 min. La adsorción de proteínas sobre la matriz también se evidencia por la disminución de su concentración a través del tiempo durante el proceso de adsorción alcanzándose aproximadamente un 65% de adsorción de las

mismas con respecto a la concentración inicial, coincidente con el porcentaje de endoglucanasa adsorbida.

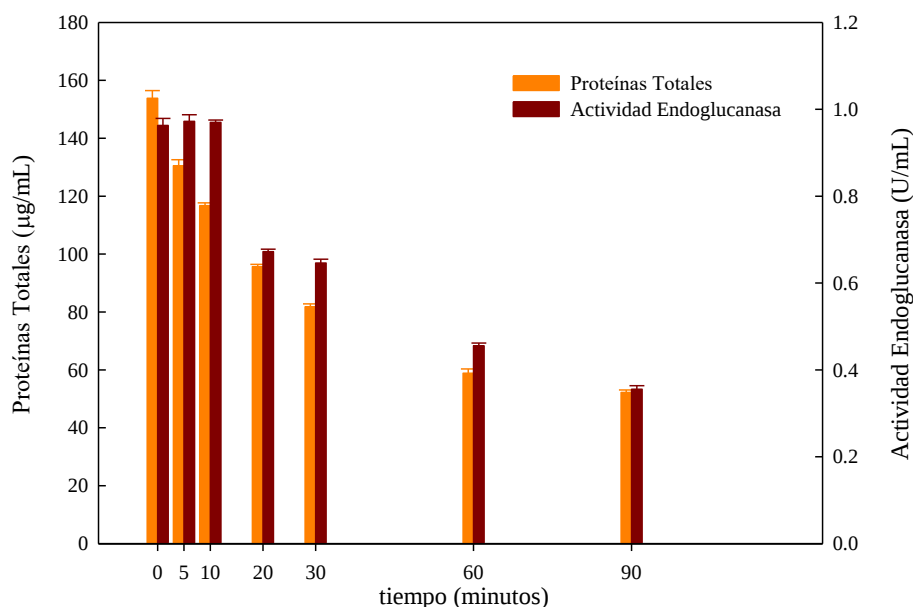


Figura 8.1: Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS 3% P/V triturado en buffer fosfato 50 mM pH 7,00. Temperatura 25°C.

Cuando se desea optimizar un protocolo de adsorción de proteínas con el objetivo de purificarlas, la desorción de la enzima del adsorbente es casi tan importante como su adsorción ya que la misma permite recuperar la proteína nuevamente en solución.

Se realizó la desorción utilizando distintas fuerzas iónicas. Las Figuras 8.2 y 8.3 muestran la cinética de desorción de endoglucanasa y proteínas totales de la matriz de CHS 3% P/V triturada, respectivamente. Se observa un aumento en la actividad enzimática y proteínas totales a medida que progresa el proceso de desorción. Por otra parte al aumentar la fuerza iónica del medio aumenta la cantidad de enzima y proteínas desorbidas. Se determinó el tiempo necesario para alcanzar la máxima cantidad de enzima desorbida.

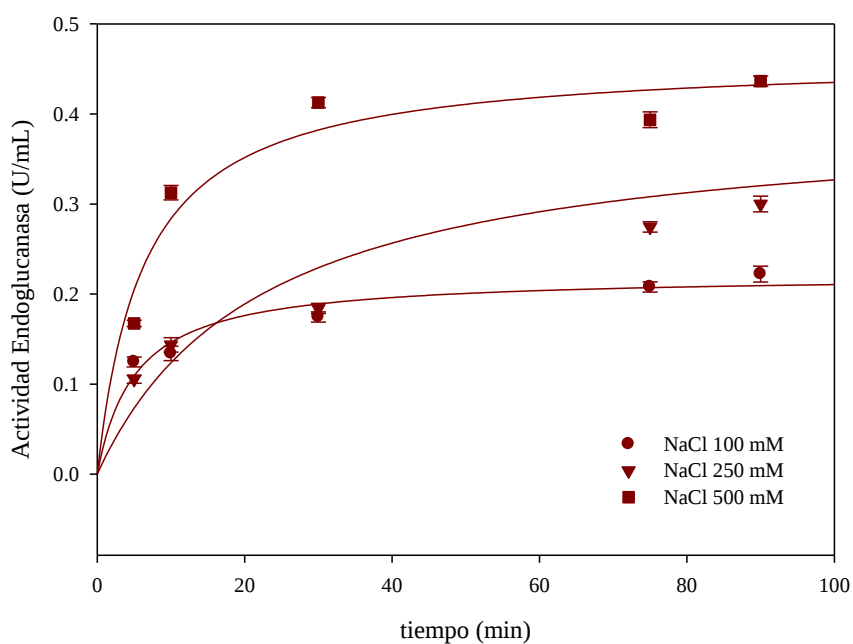


Figura 8.2: Cinética de desorción de endoglucanasa de *A. niger* de la matriz de CHS 3% P/V triturado a distinta fuerza iónica en buffer fosfato 50 mM pH 7,00. Temperatura 25°C.

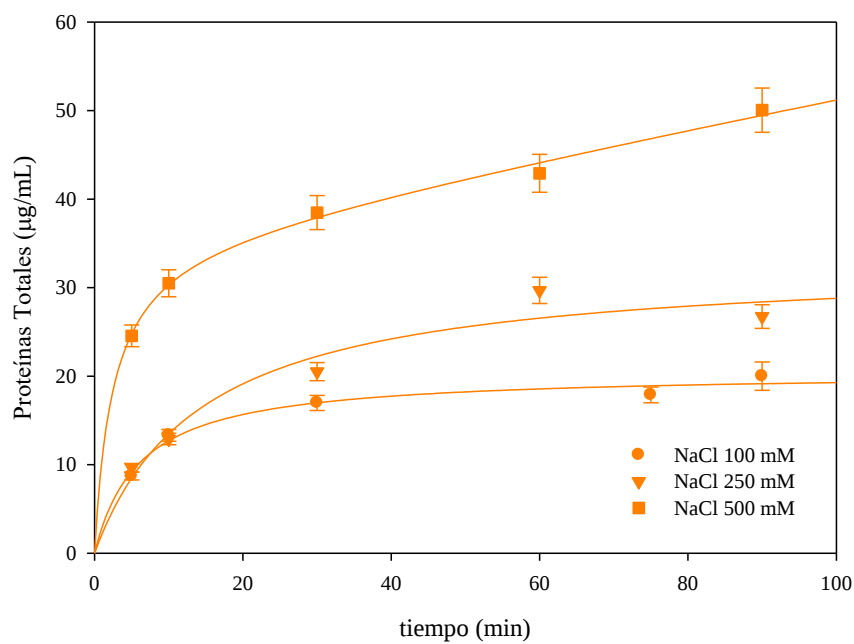


Figura 8.3: Cinética de desorción de proteínas de la matriz de CHS 3% P/V triturado a distinta fuerza iónica en buffer fosfato 50 mM pH 7,00. Temperatura 25°C.

8.1.2. Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS 3% P/V triturado en buffer fosfato 50 mM pH 6,00

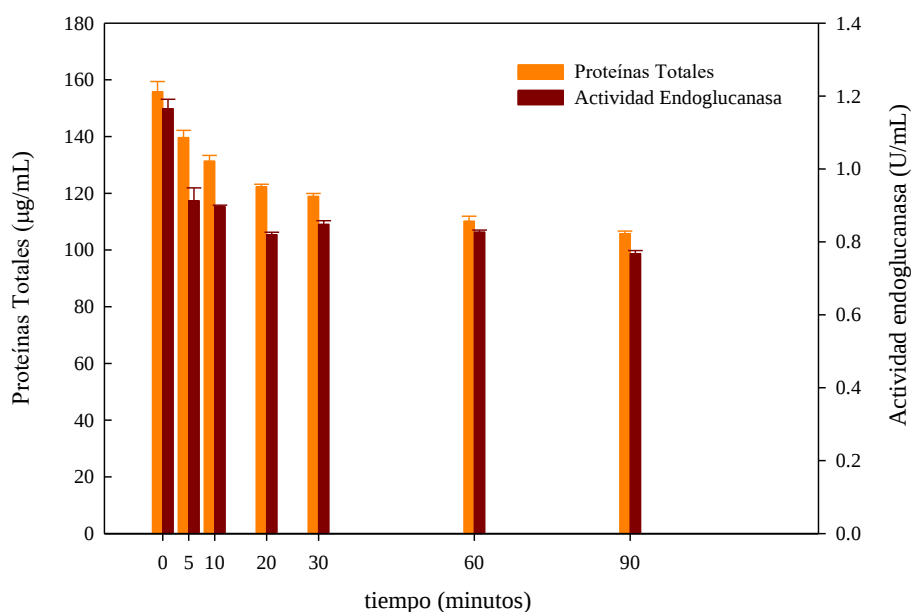


Figura 8.4: Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS 3% P/V triturado en buffer fosfato 50 mM pH 6,00. Temperatura 25°C.

La Figura 8.4 muestra la adsorción de endoglucanasa y proteínas sobre la matriz de CHS 3% P/V triturada a través del tiempo. Se observa una disminución a través del tiempo de las proteínas totales y actividad endoglucanasa del sobrenadante pero en este caso la adsorción de endoglucanasa y proteínas es sólo del 34% y 32% respectivamente, la mitad de la obtenida a pH 7,00.

Las Figuras 8.5 y 8.6 muestran la cinética de desorción de endoglucanasa y proteínas de la matriz de CHS 3% P/V triturada, respectivamente.

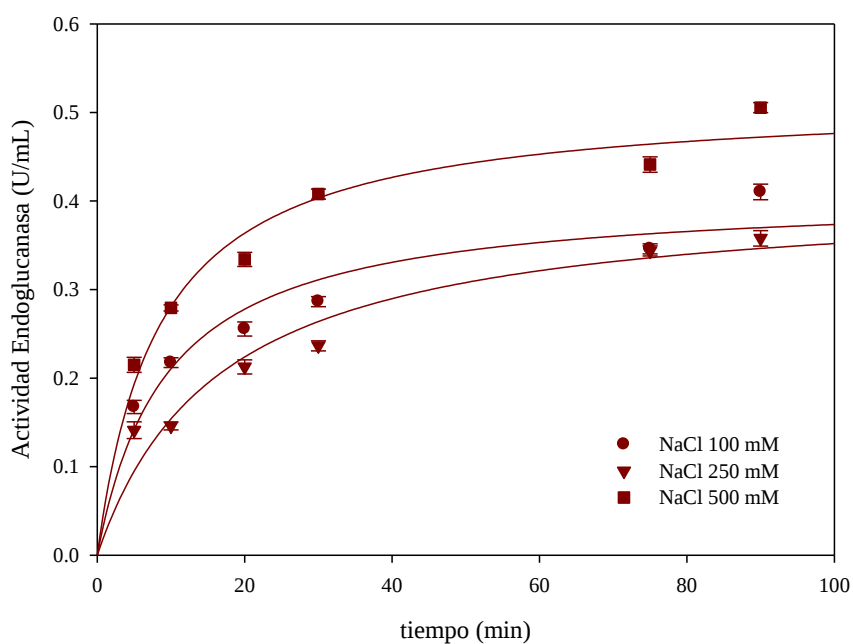


Figura 8.5: Cinética de desorción de endoglucanasa de *A. niger* de la matriz de CHS 3% P/V triturado a distinta fuerza iónica en buffer fosfato 50 mM pH 6,00. Temperatura 25°C.

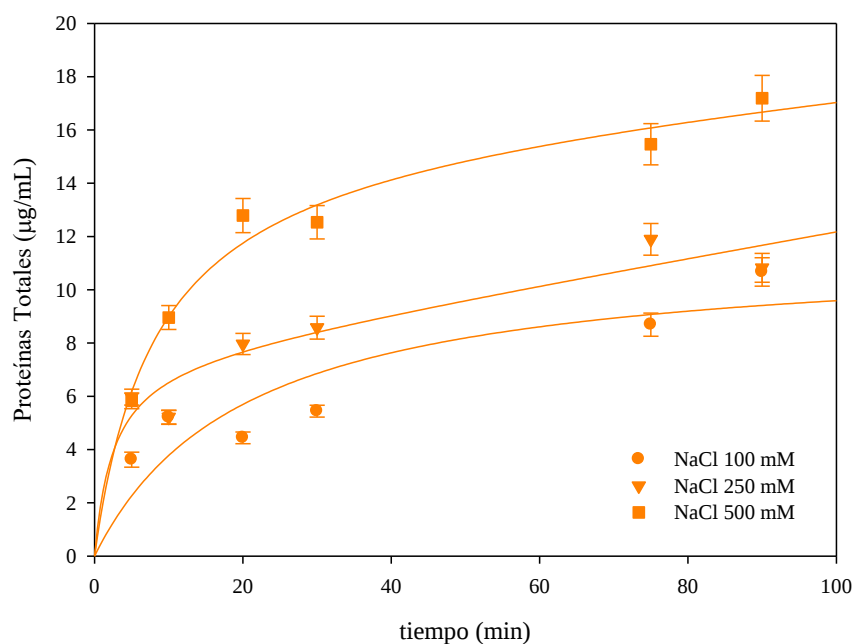


Figura 8.6: Cinética de desorción de proteínas de la matriz de CHS 3% P/V triturado a distinta fuerza iónica en buffer fosfato 50 mM pH 6,00. Temperatura 25°C.

8.1.3. Comparación de la adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS 3% P/V triturada en buffer fosfato 50 mM entre pH 7,00 y pH 6,00

La Tablas 8.I y 8.II muestran las relaciones de masas de proteínas y actividad endoglucanasa por gramo de adsorbente húmedo, respectivamente, en cada etapa del proceso de adsorción.

Tabla 8.I. Proteínas Totales (mg) / masa de matriz húmeda (g) en cada etapa de la adsorción sobre CHS triturado buffer Pi 50 mM a pH 7,00 y 6,00. Temperatura 25°C.

Etapas	Fracción	Proteínas Totales/ masa de matriz húmeda (mg/g)	
		pH 7,00	pH 6,00
Inicial	sobrenadante	1,69 ± 0,03	1,71 ± 0,04
Adsorción	sobrenadante	0,521 ± 0,009	1,057 ± 0,009
	adsorbida	1,07 ± 0,02	0,515 ± 0,009
Lavado	sobrenadante	0,093 ± 0,002	0,136 ± 0,001
Desorción (NaCl 100 mM)	sobrenadante	0,279 ± 0,005	0,094 ± 0,002
Desorción (NaCl 250 mM)	sobrenadante	0,247 ± 0,005	0,100 ± 0,002
Desorción (NaCl 500 mM)	sobrenadante	0,489 ± 0,009	0,156 ± 0,003

En Tabla 8.I se observa que la capacidad de adsorción en buffer Pi 50 mM pH 7,00 duplica a la obtenida a pH 6,00 utilizando matriz de CHS 3% P/V triturada como adsorbente. A pH 7,00, el porcentaje de proteína adsorbida con respecto a la cantidad de proteína inicial alcanza un valor cercano al 60%.

Por otra parte, cuando se realiza la adsorción de endoglucanasa a pH 6,00, se pierde un mayor porcentaje de proteínas en la etapa de lavado, indicando que la interacción entre las proteínas y la matriz es más débil que cuando se trabaja a pH 7,00.

Por último, cuando se emplea buffer Pi 50 mM pH 7,00 + NaCl 500 mM se alcanza una desorción de proteínas del 46% con respecto a las proteínas adsorbidas.

Tabla 8.II Actividad endoglucanasa (U/g de matriz húmeda) en cada etapa de la adsorción sobre CHS triturado buffer Pi 50 mM a pH 7,00 y 6,00. Temperatura 25°C.

Etapas	Fracción	Actividad Endoglucanasa/ masa de matriz húmeda (U/g)	
		pH 7,00	pH 6,00
Inicial	sobrenadante	10,6 ± 0,2	12,8 ± 0,3
Adsorción	sobrenadante	3,6 ± 0,1	7,7 ± 0,1
	adsorbida	7,0 ± 0,1	5,1 ± 0,1
Lavado	sobrenadante	2,60 ± 0,04	4,7 ± 0,1
Desorción, t = 5 min (NaCl 100 mM)	sobrenadante	1,24 ± 0,05	1,67 ± 0,07
Desorción, t = 90 min (NaCl 100 mM)	sobrenadante	1,78 ± 0,07	3,12 ± 0,07
Desorción, t = 5 min (NaCl 250 mM)	sobrenadante	1,05 ± 0,05	1,41 ± 0,09
Desorción, t = 90 min (NaCl 250 mM)	sobrenadante	2,96 ± 0,07	2,72 ± 0,07
Desorción, t = 5 min (NaCl 500 mM)	sobrenadante	1,67 ± 0,03	2,15 ± 0,08
Desorción, t = 90 min (NaCl 500 mM)	sobrenadante	4,36 ± 0,06	3,84 ± 0,04

De acuerdo a la Tabla 8.II, existe un mayor porcentaje de pérdida de actividad en la etapa de lavado cuando se trabaja a pH 6,00. Además a pH 7,00, la actividad endoglucanasa adsorbida fue aproximadamente del 66% con respecto a la actividad inicial. Este hecho puede deberse a que el CHS presenta un efecto estabilizante de la enzima, como se discutió en el Capítulo 6, por lo tanto las actividades enzimáticas determinadas podrían estar aumentadas por la presencia de este polímero.

A pH 6,00 la actividad endoglucanasa adsorbida fue del 40%. A pH 7,00, se alcanzó un porcentaje de desorción cercano al 60% con respecto a la enzima adsorbida, a los 90 min, utilizando buffer Pi 50 mM + NaCl 500 mM.

Se calcularon los parámetros del proceso de purificación, factor de purificación (FP) y rendimiento (%R) para evaluar ambos procesos (Tabla 8.III).

Tabla 8.III: Parámetros del proceso de purificación de la adsorción sobre CHS triturado en buffer Pi 50 mM a pH 7,00 y pH 6,00.

Fuerza iónica del Buffer Pi 50 mM	Tiempo de desorción (min)	FP		%R	
		pH 7,00	pH 6,00	pH 7,00	pH 6,00
NaCl 100 mM	5	2,3 ± 0,2	4,0 ± 0,3	13 ± 1	14 ± 1
	10	1,6 ± 0,2	5,6 ± 0,3	14 ± 1	19 ± 1
	30	1,6 ± 0,1	7,7 ± 0,5	18 ± 1	25 ± 1
	75	1,9 ± 0,1	5,3 ± 0,3	22 ± 1	30 ± 1
	90	1,1 ± 0,1	5,1 ± 0,4	23 ± 1	35 ± 1
NaCl 250 mM	5	1,7 ± 0,2	3,2 ± 0,4	11 ± 1	12 ± 1
	10	1,8 ± 0,2	3,7 ± 0,3	15 ± 1	13 ± 1
	30	1,4 ± 0,1	3,7 ± 0,3	19 ± 1	20 ± 1
	75	1,5 ± 0,1	3,9 ± 0,2	28 ± 1	29 ± 1
	90	2,2 ± 0,2	4,4 ± 0,3	38 ± 2	31 ± 1
NaCl 500 mM	5	1,1 ± 0,1	4,9 ± 0,4	17 ± 1	18 ± 1
	10	1,6 ± 0,1	4,2 ± 0,3	32 ± 1	24 ± 1
	30	1,7 ± 0,1	4,3 ± 0,3	43 ± 1	35 ± 1
	75	1,5 ± 0,1	3,8 ± 0,3	41 ± 2	38 ± 2
	90	1,4 ± 0,1	3,9 ± 0,2	45 ± 1	43 ± 1

De acuerdo a la Tabla 8.III, la purificación de endoglucanasa se encuentra favorecida a pH 6,00 alcanzándose un FP de 7,7 aunque con bajos rendimientos.

8.2. Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS 2,5% P/V en buffer fosfato 50 mM pH 7,00 y buffer citrato 50 mM pH 5,30

Se sintetizaron matrices esféricas de CHS 2,5% P/V (sin triturar) y se realizaron los estudios que en la sección 8.1, se estudió la adsorción de endoglucanasa de *A. niger* de una solución de LCC sobre la matriz sintetizada. Sin embargo, se decidió realizar la adsorción a pH 7,00 y pH 5,30.

8.2.1. Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS 2,5% P/V en buffer fosfato 50 mM pH 7,00

La Figura 8.7 muestra una disminución gradual a través del tiempo en los valores de proteínas totales y actividad endoglucanasa obteniéndose un porcentaje de adsorción del 50% para las proteínas y del 57% para endoglucanasa.

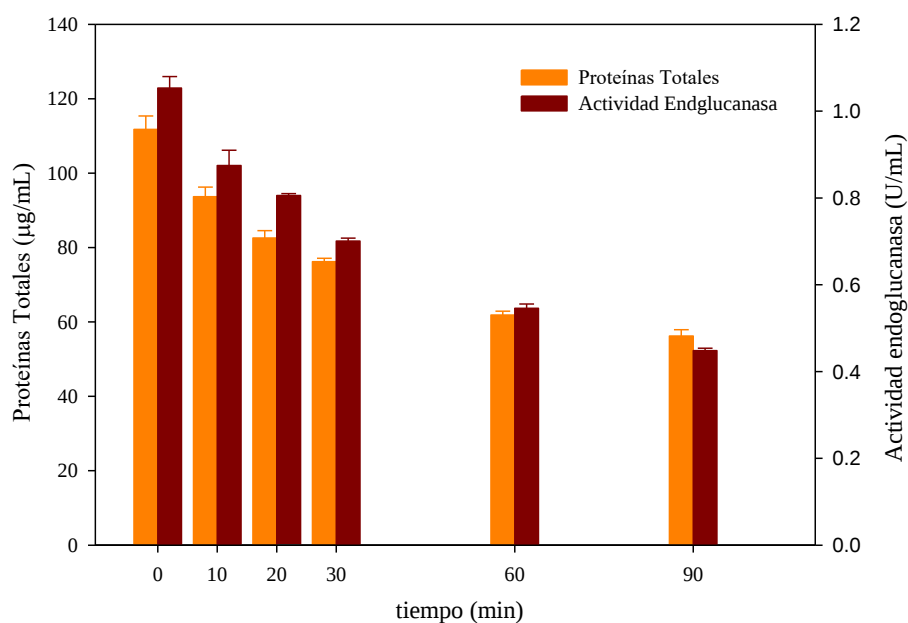


Figura 8.7: Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS 2,5% P/V en buffer fosfato 50 mM pH 7,00. Temperatura 25°C.

La Figuras 8.8 y 8.9 muestra un aumento en la actividad endoglucanasa al aumentar la fuerza iónica y el tiempo de desorción.

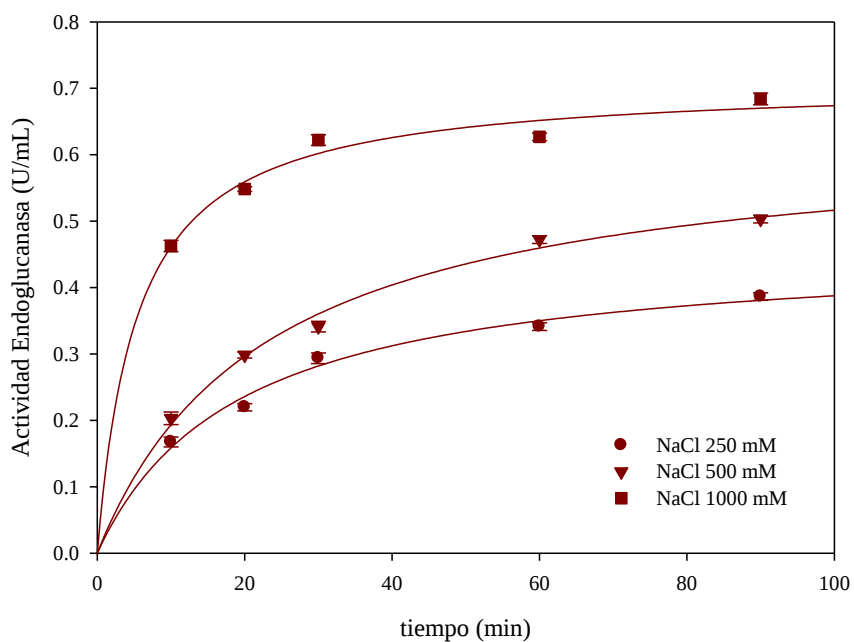


Figura 8.8: Cinética de desorción de endoglucanasa de *A. niger* de la matriz de CHS 2,5% P/V a distintas fuerzas iónicas en buffer fosfato 50 mM pH 7,00. Temperatura 25°C.

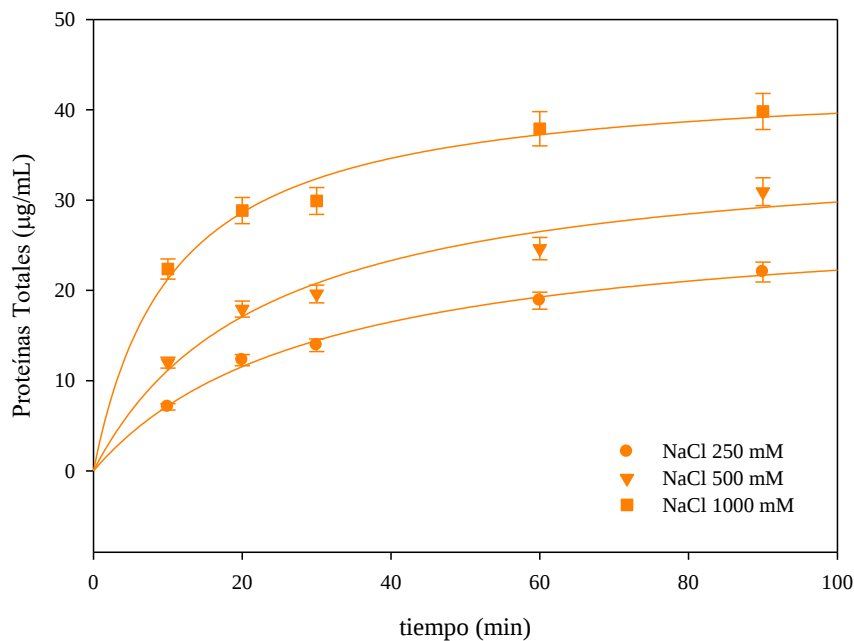


Figura 8.9: Cinética de desorción de proteínas de la matriz de CHS 2,5% P/V a distintas fuerzas iónicas en buffer fosfato 50 mM pH 7,00. Temperatura 25°C

8.2.2. Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS 2,5 % P/V en buffer citrato 50 mM pH 5,30

La Figura 8.10 muestra la adsorción de endoglucanasa y proteínas a través del tiempo sobre matriz de CHS 2,5% P/V en buffer citrato 50 mM pH 5,30. Se alcanzó un 16% de adsorción de endoglucanasa y un 20% de proteínas.

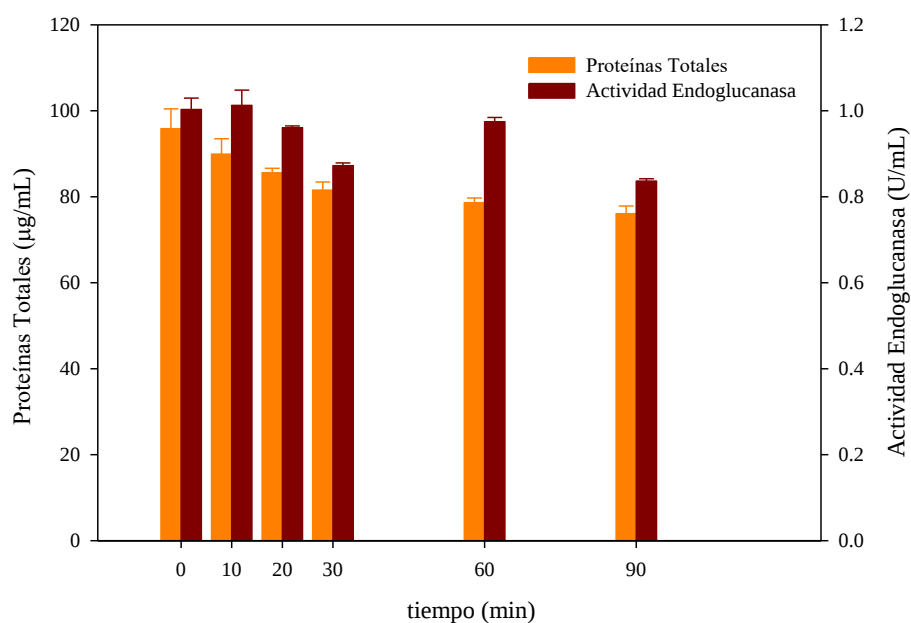


Figura 8.10: Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS 2,5% P/V en buffer citrato 50 mM pH 5,30. Temperatura 25°C.

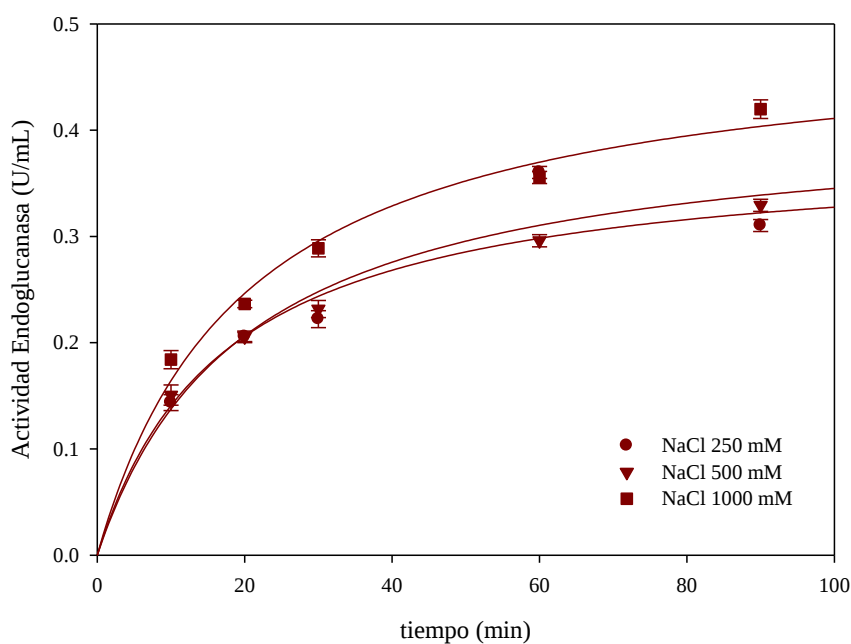


Figura 8.11: Cinética de desorción de endoglucanasa de *A. niger* de la matriz de CHS 2,5% P/V a distinta fuerza iónica en buffer citrato 50 mM pH 5,30. Temperatura 25°C.

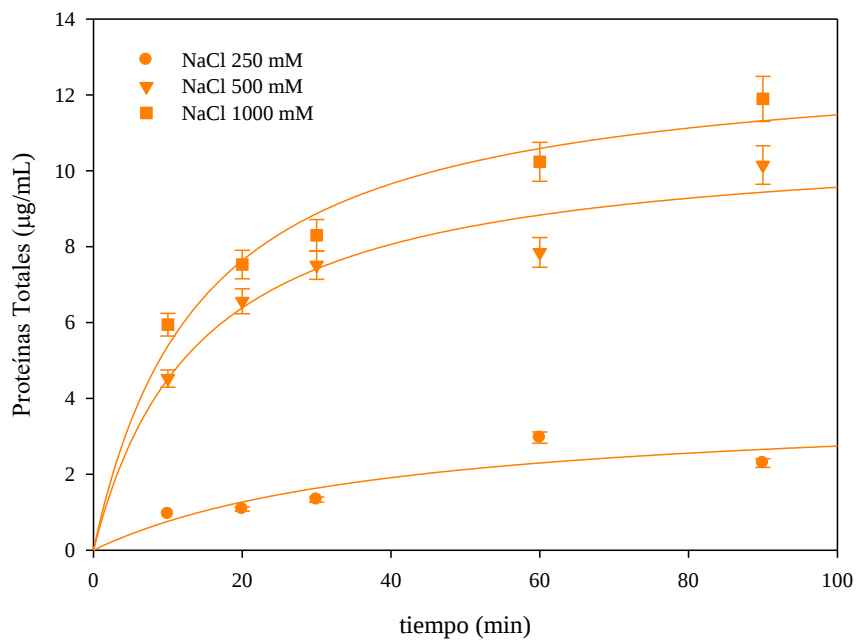


Figura 8.12: Cinética de desorción de endoglucanasa de *A. niger* de la matriz de CHS 2,5% P/V a distinta fuerza iónica en buffer citrato 50 mM pH 5,30. Temperatura 25°C.

La Figura 8.11 muestra un aumento en la actividad endoglucanasa al aumentar la fuerza iónica y el tiempo de desorción.

8.2.3. Comparación de la adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS 2,5% P/V en buffer fosfato 50 mM pH 7,00 y buffer citrato 50 mM pH 5,30

Las Tablas 8.IV y 8.V muestran las relaciones de masas de proteínas y actividad endoglucanasa por gramo de adsorbente húmedo, respectivamente, en cada etapa del proceso de adsorción.

De acuerdo a la Tabla 8.IV, la capacidad de adsorción en buffer Pi 50 mM pH 7,00 utilizando matriz de CHS 2,5% P/V como adsorbente es del 48%. A pH 5,30, el porcentaje de proteína adsorbida con respecto a la cantidad de proteína inicial alcanza un valor cercano al 20%. Es decir se adsorbe más del doble de la proteína inicial a pH 7,00. Sin embargo, a pH 5,30 en la etapa de lavado se pierde un mayor porcentaje de proteínas con respecto a su concentración inicial. Por otra parte, cuando se emplea mayor fuerza iónica el porcentaje de proteínas desorbidas es mayor.

Tabla 8.IV: Proteínas Totales (mg) / masa de matriz húmeda (g) en cada etapa de la adsorción sobre CHS 2,5% P/V en buffer Pi 50 mM pH 7,00 y buffer citrato 50 mM pH 5,30. Temperatura 25°C.

Etapas	Fracción	Proteínas Totales/ masa de matriz húmeda (mg/g)	
		pH 7,00	pH 5,30
Inicial	sobrenadante	1,23 ± 0,04	1,05 ± 0,05
Adsorción	sobrenadante	0,57 ± 0,01	0,78 ± 0,01
	adsorbida	0,59 ± 0,01	0,209 ± 0,004
Lavado	sobrenadante	0,099 ± 0,002	0,140 ± 0,002
Desorción (NaCl 250 mM)	sobrenadante	0,209 ± 0,003	0,039 ± 0,001
Desorción (NaCl 500 mM)	sobrenadante	0,294 ± 0,005	0,036 ± 0,001
Desorción (NaCl 1000 mM)	sobrenadante	0,391 ± 0,007	0,115 ± 0,002

De acuerdo a la Tabla 8.V, si bien se adsorbe más endoglucanasa en buffer Pi 50 mM pH 7,00, se desorbe más del 100% de la endoglucanasa adsorbida a pH 5,30. Este hecho puede deberse a que el CHS presenta un efecto estabilizante de la enzima, como se discutió en el Capítulo 6, por lo tanto las actividades enzimáticas determinadas podrían estar aumentadas por la presencia del chitosán.

Tabla 8.V: Actividad endoglucanasa (U/g de matriz húmeda) en cada etapa de la adsorción sobre CHS 2,5% P/V en buffer Pi 50 mM pH 7,00 y buffer citrato 50 mM pH 5,30. Temperatura 25°C.

Etapas	Fracción	Actividad Endoglucanasa/ masa de matriz húmeda (U/g)	
		Buffer Pi 50 mM pH 7,00	Buffer Citrato 50 mM pH 5,30
Inicial	sobrenadante	11,6 ± 0,3	11,0 ± 0,3
Adsorción	sobrenadante	4,50 ± 0,05	8,53 ± 0,06
	adsorbida	7,1 ± 0,3	2,5 ± 0,4
Lavado	sobrenadante	1,15 ± 0,02	3,13 ± 0,05
Desorción, t = 10 min (NaCl 250 mM)	sobrenadante	1,67 ± 0,07	1,44 ± 0,07
Desorción, t = 90 min (NaCl 250 mM)	sobrenadante	3,09 ± ,04	2,48 ± 0,04
Desorción, t = 10 min (NaCl 500 mM)	sobrenadante	2,03 ± 0,09	1,51 ± 0,09
Desorción, t = 90 min (NaCl 500 mM)	sobrenadante	4,02 ± 0,05	2,63 ± 0,05
Desorción, t = 10 min (NaCl 1000 mM)	sobrenadante	4,63 ± 0,08	1,84 ± 0,08
Desorción, t = 90 min (NaCl 1000 mM)	sobrenadante	5,47 ± 0,07	3,36 ± 0,07

Se calcularon los parámetros del proceso de purificación, factor de purificación (FP) y rendimiento (%R) para evaluar ambos procesos (Tabla 8.VI).

Según la Tabla 8.VI se obtienen muy altos FP empleando buffer citrato 50 mM pH 5,30 + NaCl 250 mM para desorber. Sin embargo los rendimientos son bajos. Utilizando una mayor fuerza iónica en buffer citrato 50 mM pH 5,30, los FP son menores pero los %R son mayores.

Tabla 8.VI: Parámetros del proceso de purificación de la adsorción sobre CHS 2,5% P/V en buffer Pi 50 mM a pH 7,00 y buffer citrato 50 mM pH 5,30

Fuerza iónica del Buffer Pi	Tiempo de desorción (min)	FP		%R	
		pH 7,00	pH 5,30	pH 7,00	pH 5,30
50 mM pH 7,00	10	2,5 ± 0,2	14 ± 1	16 ± 1	14 ± 1
	20	1,9 ± 0,1	18 ± 1	21 ± 1	20 ± 1
	30	2,2 ± 0,2	16 ± 1	28 ± 1	22 ± 1
	60	1,9 ± 0,1	12 ± 1	32 ± 1	36 ± 1
	90	1,9 ± 0,1	13 ± 1	37 ± 1	31 ± 1
NaCl 250 mM	10	1,8 ± 0,2	3,2 ± 0,4	19 ± 1	15 ± 1
	20	1,8 ± 0,1	3,0 ± 0,2	28 ± 1	20 ± 1
	30	1,8 ± 0,1	2,9 ± 0,2	32 ± 2	23 ± 1
	60	2,0 ± 0,1	3,6 ± 0,2	45 ± 2	29 ± 1
	90	1,7 ± 0,1	3,1 ± 0,2	48 ± 2	33 ± 1
NaCl 500 mM	10	2,2 ± 0,1	3,0 ± 0,3	44 ± 2	18 ± 1
	20	2,0 ± 0,1	3,0 ± 0,2	52 ± 2	24 ± 1
	30	2,2 ± 0,1	3,3 ± 0,3	59 ± 2	29 ± 1
	60	1,7 ± 0,1	3,3 ± 0,3	60 ± 2	35 ± 1
	90	1,8 ± 0,1	3,4 ± 0,2	65 ± 2	42 ± 2
NaCl 1000 mM	10	2,2 ± 0,1	3,0 ± 0,3	44 ± 2	18 ± 1
	20	2,0 ± 0,1	3,0 ± 0,2	52 ± 2	24 ± 1
	30	2,2 ± 0,1	3,3 ± 0,3	59 ± 2	29 ± 1
	60	1,7 ± 0,1	3,3 ± 0,3	60 ± 2	35 ± 1
	90	1,8 ± 0,1	3,4 ± 0,2	65 ± 2	42 ± 2

8.3. Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS entrecruzada con epiclorhidrina en buffer fosfato 50 mM pH 7,00 y buffer citrato 50 mM pH 5,30

Se sintetizaron matrices esféricas de CHS entrecruzadas con epiclorhidrina (ECH) y se realizaron los mismos estudios que en la sección 8.2., se estudió la adsorción de endoglucanasa de *A. niger* de una solución de LCC sobre esta matriz sintetizada.

8.3.1. Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS entrecruzada con epiclorhidrina en buffer fosfato 50 mM pH 7,00

La Figura 8.13 muestra una disminución en la concentración de proteínas totales y en actividad endoglucanasa a medida que aumenta el tiempo de adsorción, alcanzado el mínimo y permaneciendo prácticamente constante a los 60 y 90 min. Se alcanzó una adsorción del 48% de las proteínas iniciales y del 44% de endoglucanasa.

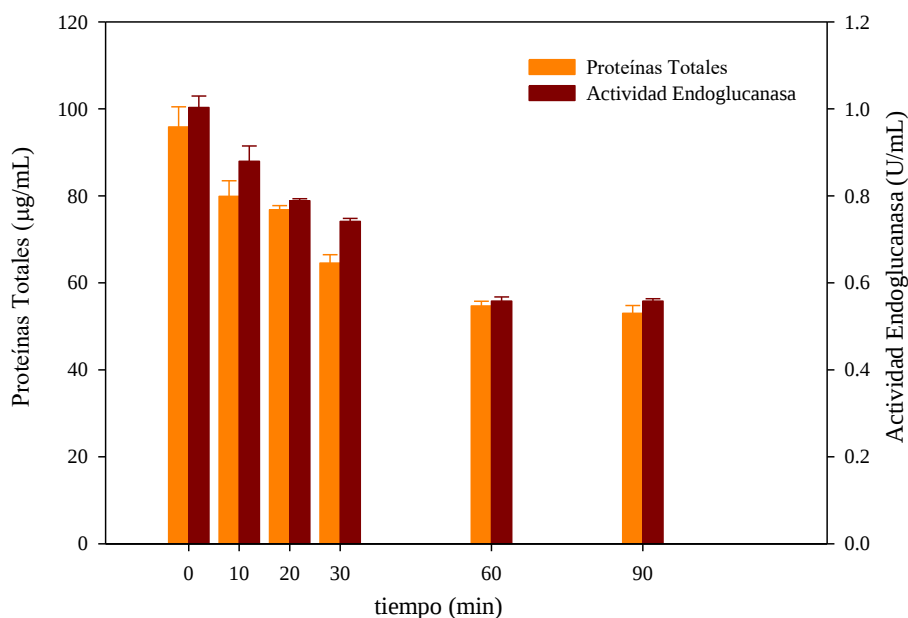


Figura 8.13: Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS-ECH en buffer fosfato 50 mM pH 7,00. Temperatura 25°C.

Las Figuras 8.14 y 8.15 muestran la cinética de desorción de endoglucanasa y proteínas totales de la matriz de CHS-ECH en buffer Pi 50 mM pH 7,00, respectivamente.

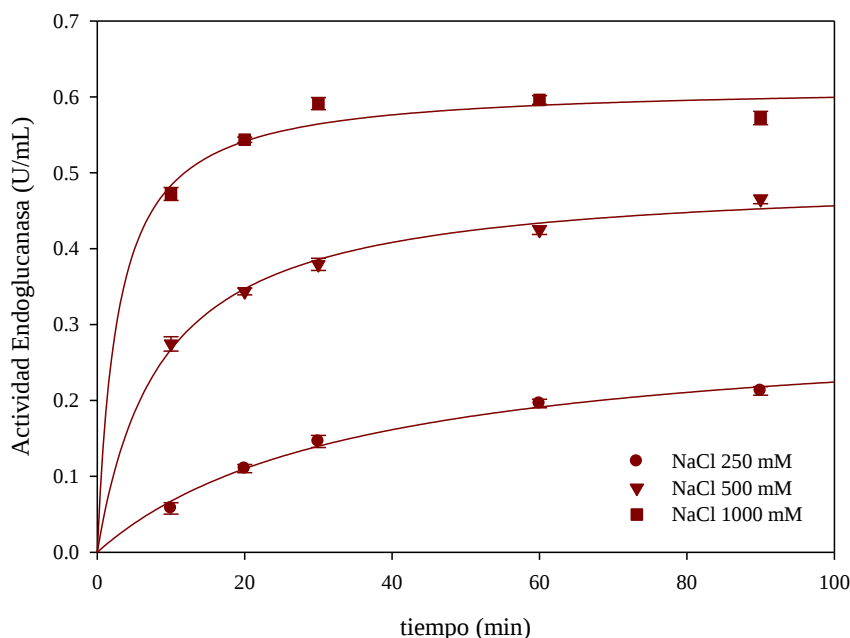


Figura 8.14: Cinética de desorción de endoglucanasa de la matriz de CHS-ECH a distinta fuerza iónica en buffer fosfato 50 mM pH 7,00. Temperatura 25°C.

En la Figura 8.14 se observa un aumento de actividad endoglucanasa a medida que aumenta la fuerza iónica y el tiempo de desorción permaneciendo constante a partir de los 30 min en buffer fosfato 50 mM pH 7,00 + NaCl 1000 mM y a partir de los 60 min en buffer fosfato 50 mM pH 7,00 + NaCl 250 mM. Similares resultados se obtuvieron en la cinética de desorción de proteínas (Figura 8.15).

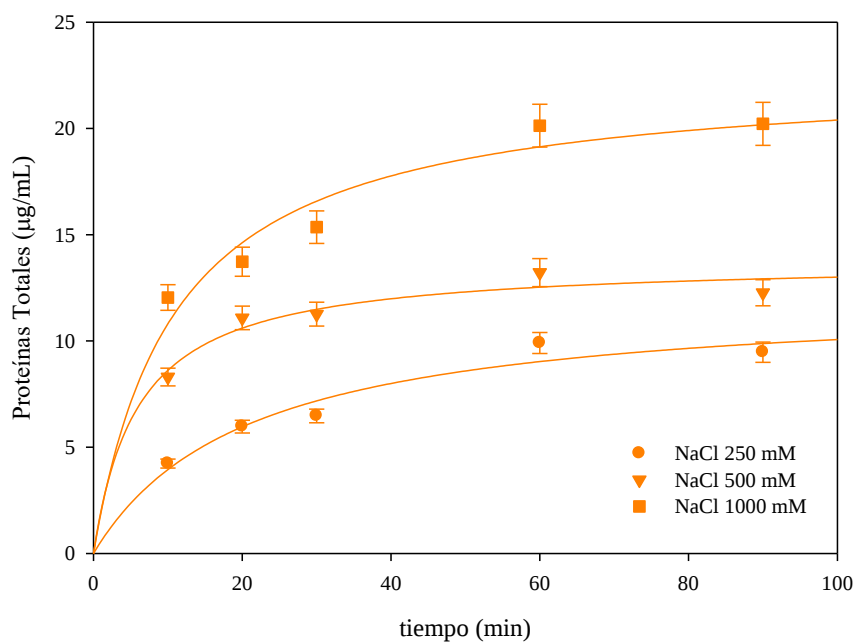


Figura 8.15: Cinética de desorción de proteínas de la matriz de CHS-ECH a distinta fuerza iónica en buffer fosfato 50 mM pH 7,00. Temperatura 25°C.

8.3.2. Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS entrecruzada con epiclorhidrina en buffer citrato 50 mM pH 5,30

La Figura 8.16 muestra la adsorción de proteínas y endoglucanasa a través del tiempo sobre la matriz de CHS-ECH en buffer citrato 50 mM pH 5,30. Se alcanzó un 28% de adsorción de proteínas y un 30% de endoglucanasa.

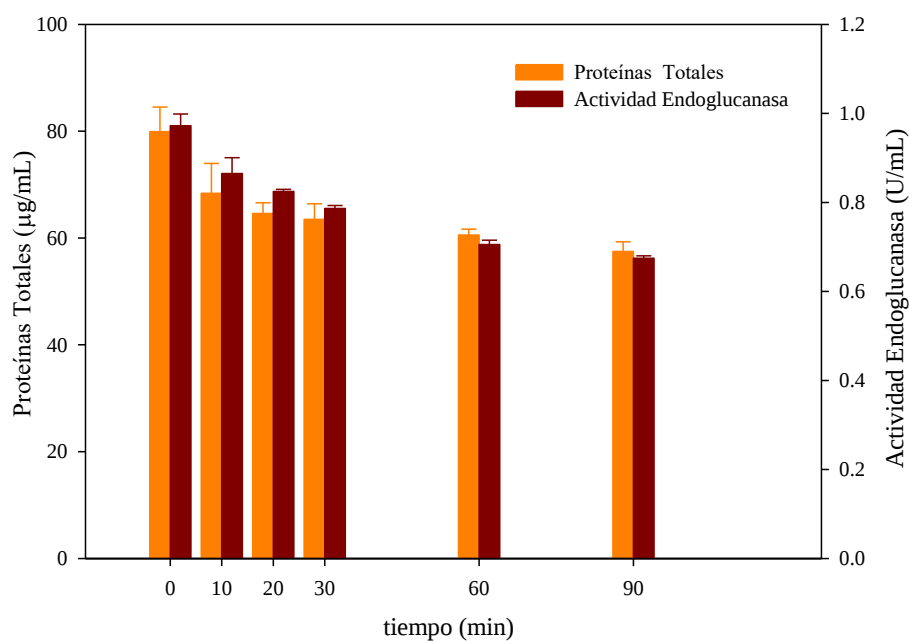


Figura 8.16: Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS-ECH en buffer citrato 50 mM pH 5,30. Temperatura 25°C.

Las Figuras 8.17 y 8.18 muestran la cinética de desorción de endoglucanasa y proteínas de la matriz de CHS-ECH en buffer citrato 50 mM pH 5,30, respectivamente.

De acuerdo a la Figura 8.17, la desorción de endoglucanasa con NaCl 100 mM y NaCl 250 mM tuvieron un comportamiento similar.

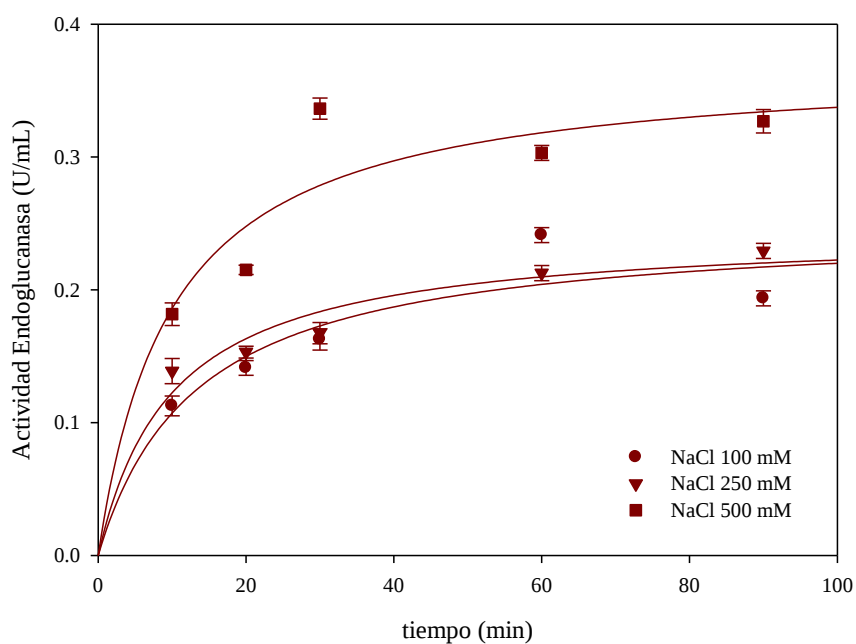


Figura 8.17: Cinética de desorción de endoglucanasa de la matriz de CHS-ECH a distinta fuerza iónica en buffer fosfato 50 mM pH 7,00. Temperatura 25°C.

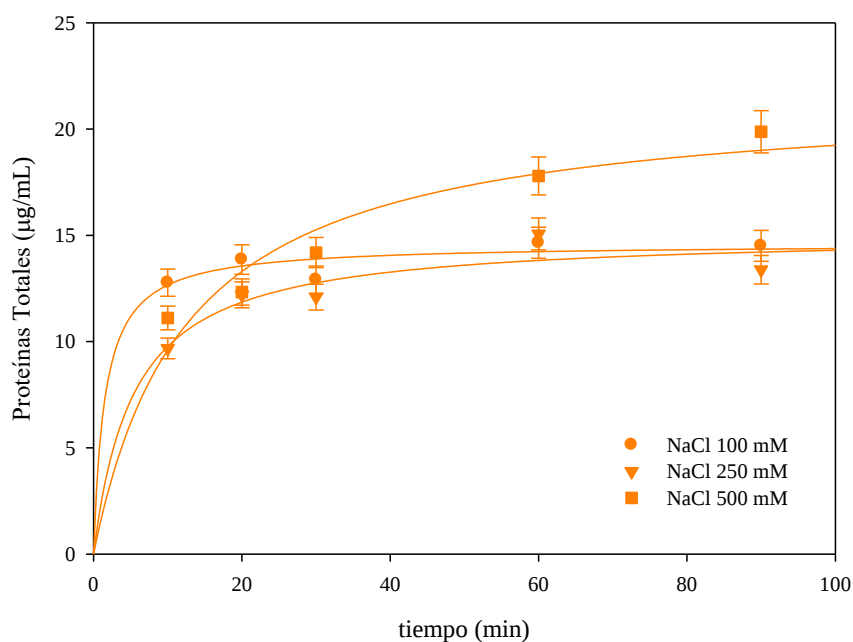


Figura 8.18: Cinética de desorción de proteínas de la matriz de CHS-ECH a distinta fuerza iónica en buffer fosfato 50 mM pH 7,00. Temperatura 25°C.

En la Figura 8.18 se observa que la desorción de proteínas en buffer citrato 50 mM pH 5,30 + NaCl 100 mM se completa a los 10 min. En buffer citrato 50 mM pH 5,30 + 250 mM NaCl se completa a los 20 min. Por otra parte en buffer citrato 50 mM pH 5,30 + 1000 mM NaCl no se completa durante el tiempo estudiado.

8.3.3. Comparación de la adsorción de endoglucanasa de A. niger sobre matriz de CHS-ECH en buffer fosfato 50 mM pH 7,00 y buffer citrato 50 mM pH 5,30

La Tablas 8.VII y 8.VIII muestran las relaciones de masas de proteínas y actividad endoglucanasa por gramo de adsorbente húmedo, respectivamente, en cada etapa del proceso de adsorción.

Según se observa en la Tabla 8.VII el porcentaje de proteínas adsorbidas fue superior en buffer Pi 50 mM pH 7,00. Sin embargo, a pH 5,30 se alcanzó un porcentaje de desorción de proteínas, con respecto a las adsorbidas, cercano al 80%, mientras que a pH 7,00 el porcentaje máximo de desorción llegó al 43%.

Tabla 8.VII: Proteínas Totales (mg) / masa de matriz húmeda (g) en cada etapa de la adsorción sobre CHS 2,5% P/V en buffer Pi 50 mM pH 7,00 y buffer citrato 50 mM pH 5,30. Temperatura 25°C.

Etapas	Fracción	Proteínas Totales/ masa de matriz húmeda (mg/g)	
		Buffer Pi 50 mM pH 7,00	Buffer Citrato 50 mM pH 5,30
Inicial	sobrenadante	1,05 ± 0,05	0,88 ± 0,01
Adsorción	sobrenadante	0,54 ± 0,02	0,59 ± 0,02
	adsorbida	0,46 ± 0,01	0,24 ± 0,01
Lavado	sobrenadante	0,115 ± 0,002	0,137 ± 0,002
Desorción (NaCl 100 mM)	sobrenadante	-	0,061 ± 0,003
Desorción (NaCl 250 mM)	sobrenadante	0,091 ± 0,005	0,14 ± 0,01
Desorción (NaCl 500 mM)	sobrenadante	0,12 ± 0,01	0,19 ± 0,01
Desorción (NaCl 1000 mM)	sobrenadante	0,20 ± 0,01	-

Tabla 8.VIII: Actividad endoglucanasa (U/g de matriz húmeda) en cada etapa de la adsorción sobre CHS-ECH en buffer Pi 50 mM pH 7,00 y buffer citrato 50 mM pH 5,30. Temperatura 25°C.

Etapas	Fracción	Actividad Endoglucanasa/ masa de matriz húmeda (U/g)	
		Buffer Pi 50 mM pH 7,00	Buffer Citrato 50 mM pH 5,30
Inicial	sobrenadante	11,0 ± 0,3	10,7 ± 0,3
Adsorción	sobrenadante	5,69 ± 0,06	6,88 ± 0,06
	adsorbida	5,3 ± 0,4	3,8 ± 0,4
Lavado	sobrenadante	1,65 ± 0,03	3,91 ± 0,07
Desorción, t = 10 min (NaCl 250 mM)	sobrenadante	0,58 ± 0,04	1,13 ± 0,07
Desorción, t = 90 min (NaCl 250 mM)	sobrenadante	1,70 ± 0,02	1,55 ± 0,04
Desorción, t = 10 min (NaCl 500 mM)	sobrenadante	2,74 ± 0,02	1,39 ± 0,09
Desorción, t = 90 min (NaCl 500 mM)	sobrenadante	3,72 ± 0,02	1,83 ± 0,05
Desorción, t = 10 min (NaCl 1000 mM)	sobrenadante	4,72 ± 0,04	1,82 ± 0,08
Desorción, t = 90 min (NaCl 1000 mM)	sobrenadante	4,58 ± 0,07	2,61 ± 0,07

Tabla 8.IX: Parámetros del proceso de purificación de la adsorción sobre CHS-ECH en buffer Pi

50 mM a pH 7,00

Fuerza iónica del Buffer citrato 50 mM pH 7,00 de desorción	Tiempo de desorción (min)	FP	%R
NaCl 250 mM	10	1,3 ± 0,2	6 ± 1
	20	1,8 ± 0,2	11 ± 1
	30	2,2 ± 0,2	15 ± 1
	60	1,9 ± 0,1	19 ± 1
	90	2,1 ± 0,2	21 ± 1
NaCl 500 mM	10	3,2 ± 0,3	27 ± 2
	20	3,0 ± 0,2	34 ± 1
	30	3,2 ± 0,3	38 ± 2
	60	3,0 ± 0,2	42 ± 2
	90	3,6 ± 0,2	46 ± 2
NaCl 1000 mM	10	3,7 ± 0,2	47 ± 2
	20	3,8 ± 0,2	54 ± 2
	30	3,7 ± 0,2	59 ± 2
	60	2,8 ± 0,2	59 ± 2
	90	2,7 ± 0,2	57 ± 2

Tabla 8.X: Parámetros del proceso de purificación de la adsorción sobre CHS-ECH en buffer citrato 50 mM pH 5,30

Fuerza iónica del Buffer citrato 50 mM pH 5,30 de desorción	Tiempo de desorción (min)	FP	%R
NaCl 100 mM	10	0,7 ± 0,1	12 ± 1
	20	0,8 ± 0,1	14 ± 1
	30	1,0 ± 0,1	17 ± 1
	60	1,3 ± 0,1	25 ± 1
	90	1,1 ± 0,1	20 ± 1
NaCl 250 mM	10	1,2 ± 0,1	14 ± 1
	20	1,0 ± 0,1	16 ± 1
	30	1,1 ± 0,1	17 ± 1
	60	1,2 ± 0,1	22 ± 1
	90	1,4 ± 0,1	24 ± 1
NaCl 500 mM	10	1,3 ± 0,1	19 ± 1
	20	1,4 ± 0,1	22 ± 1
	30	2,0 ± 0,1	35 ± 2
	60	1,4 ± 0,1	31 ± 1
	90	1,4 ± 0,1	34 ± 2

8.4. Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS 2,5% P/V a diferentes relaciones de masas iniciales proteína/adsorbente en buffer citrato 50 mM pH 5,30

Se evaluó la relación entre la masa inicial de proteínas totales y la masa de matriz húmeda empleada en la adsorción de endoglucanasa proveniente de una solución de LCC sobre la matriz de CHS 2,5% P/V.

La Figura 8.19 muestra la cantidad residual relativa en el sobrenadante (concentración de proteínas ó actividad endoglucanasa dividido por la concentración inicial de proteínas ó actividad endoglucanasa inicial) versus tiempo de adsorción para una relación inicial de proteínas por gramo de matriz húmeda de 1,09 (mg/g). Se observa que a los 30 min se llegó a un equilibrio, alcanzando una adsorción de proteínas del 30% y del 20% de endoglucanasa.

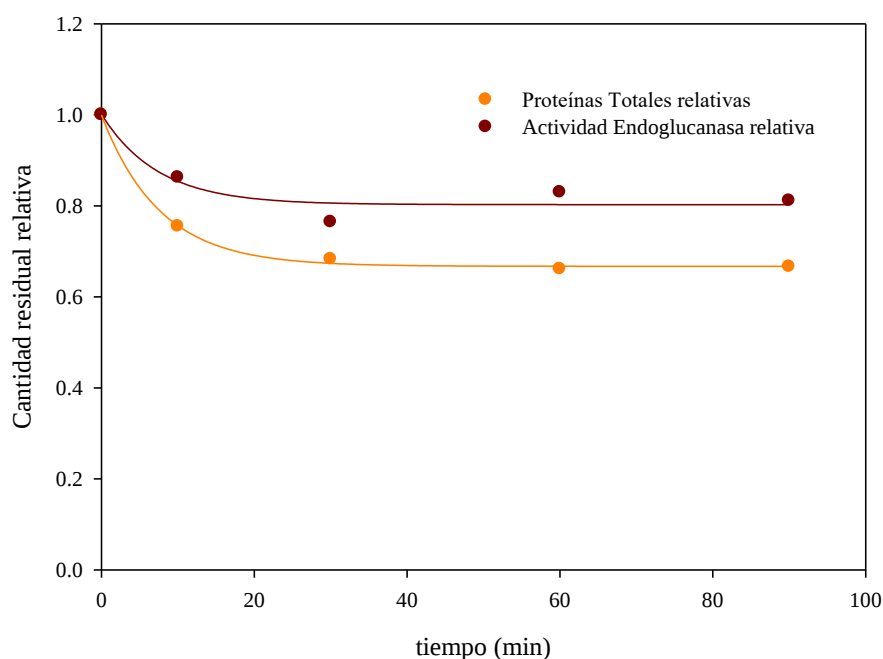


Figura 8.19: Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS 2,5% P/V

en buffer citrato 50 mM pH 5,30 a una relación 1,09 mg proteínas/g matriz húmeda. Temperatura 25°C.

La Figura 8.20 muestra la cantidad residual relativa de proteínas y endoglucanasa en el sobrenadante a través del tiempo para una relación inicial de proteínas por gramo de matriz húmeda de 0,88 (mg/g). En este caso también se llega al equilibrio a los 30 min pero el porcentaje de adsorción de proteínas y endoglucanasa es coincidente (40%).

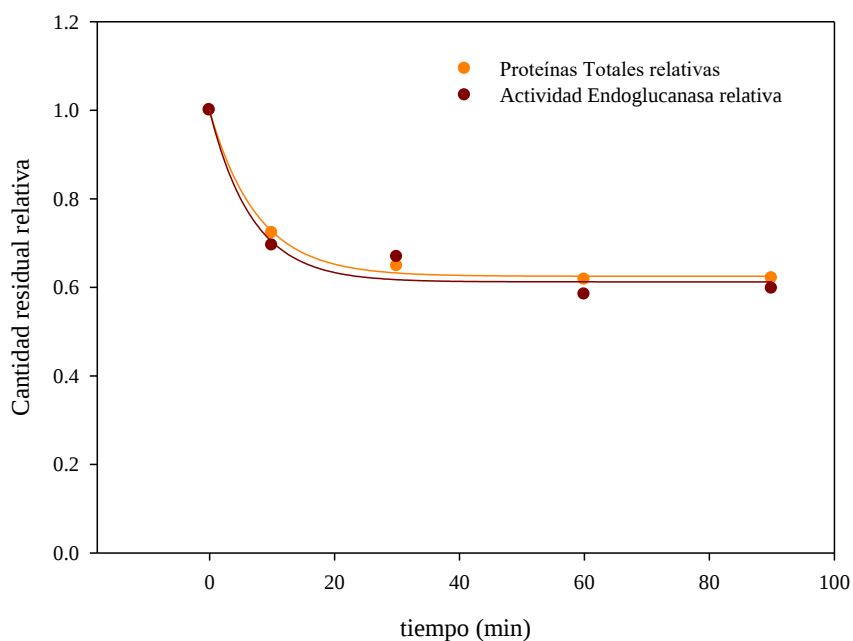


Figura 8.20: Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS 2,5% P/V

en buffer citrato 50 mM pH 5,30 a una relación 0,88 mg proteínas/g matriz húmeda. Temperatura 25°C.

La Figura 8.21 muestra la cantidad residual relativa en el sobrenadante de proteínas y endoglucanasa para una relación de proteínas iniciales por gramo de adsorbente húmedo de 074 (mg/g). Se observa como en las Figuras 8.19 y 8.20 que a los 30 min se llega al equilibrio. Sin embargo se alcanza una adsorción de proteínas del 44% y del 62% de endoglucanasa.

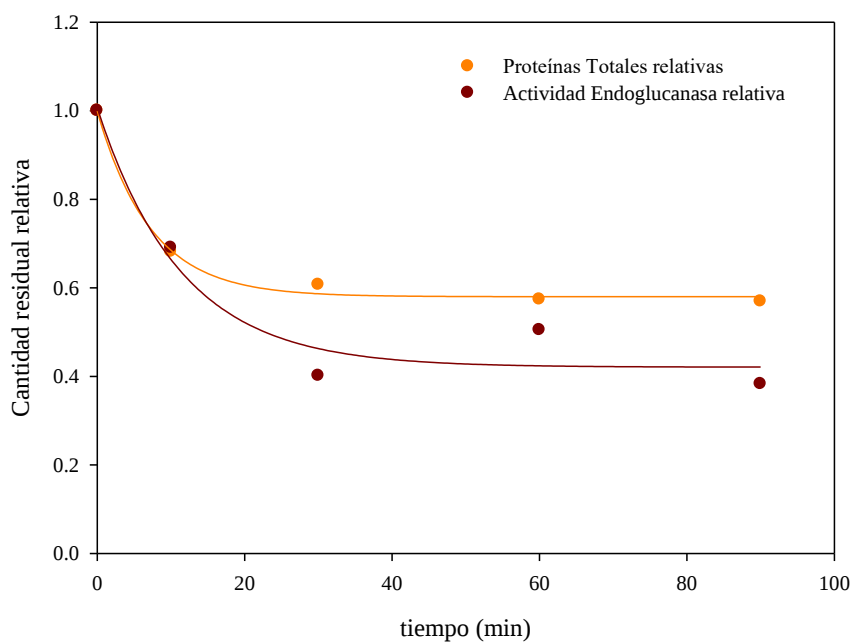


Figura 8.21: Adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS 2.5% P/V

en buffer citrato 50 mM pH 5.3 a una relación 0,74 mg proteínas/g matriz húmeda. Temperatura 25°C.

Los datos de las Figuras 8.19, 8.20 y 8.21 fueron ajustados a una ecuación de decaimiento exponencial simple de tres parámetros (8.1). Los resultados del ajuste se muestran en la Tabla 8.XI.

$$f = y_0 + a \cdot e^{-kt} \quad (8.1)$$

Tabla 8.XI: Parámetros del ajuste de la cinética de decaimiento exponencial simple de 3 parámetros

proteínas/matriz húmeda (mg/g)	Parámetros	Actividad Endoglucanasa relativa	Proteínas Totales relativas
1,09	y₀	0,80 ± 0,02	0,667 ± 0,005
	a	0,20 ± 0,04	0,332 ± 0,009
	k	0,14 ± 0,08	0,13 ± 0,01
	R²	0,9181	0,9985
0,88	y₀	0,61 ± 0,03	0,625 ± 0,008
	a	0,39 ± 0,05	0,37 ± 0,02
	k	0,15 ± 0,06	0,13 ± 0,01
	R²	0,9674	0,9968
0,74	y₀	0,42 ± 0,05	0,58 ± 0,01
	a	0,5861 ± 0,09	0,42 ± 0,02
	k	0,09 ± 0,04	0,14 ± 0,02
	R²	0,9527	0,9956

De acuerdo a los resultados observados en la Tabla 8.XI, se observa que la velocidad de adsorción (k) disminuye a medida que disminuye la relación de masas de proteínas respecto del total de matriz húmeda empleada.

A continuación de la adsorción de las tres relaciones ensayadas de proteínas iniciales por gramo de matriz húmeda, se realizó el lavado para eliminar las uniones inespecíficas y por el último la desorción en buffer citrato 50 mM pH 5,30 + NaCl 250 mM.

Las Figuras 8.22 y 8.23 muestran los FP y %R obtenidos para cada sistema estudiado.

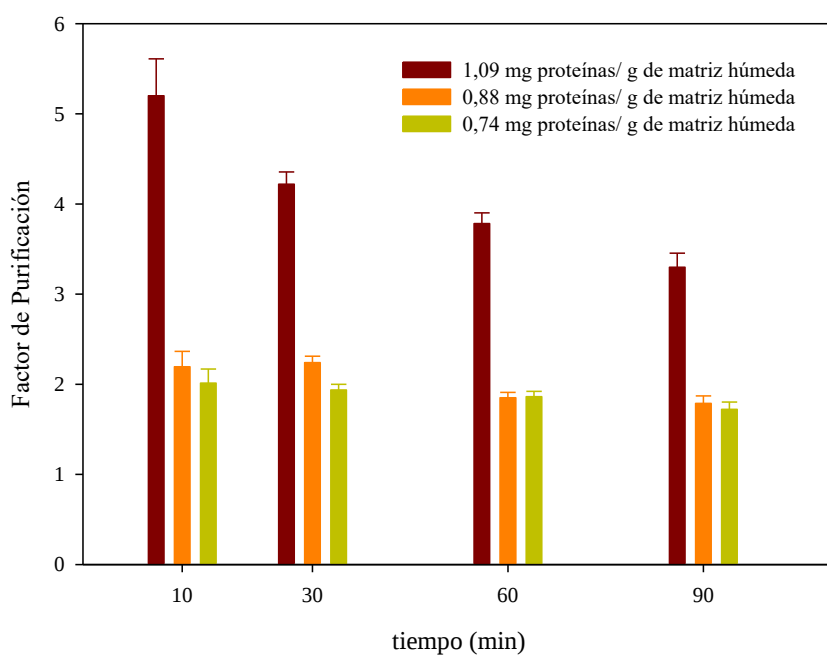


Figura 8.22: FP de la adsorción de endoglucanasa vs tiempo de desorción para las relaciones ensayadas de proteínas iniciales por g de matriz húmeda de CHS 2,5% P/V en buffer citrato 50 mM pH 5,30 utilizando NaCl 250 mM para desorber. Temperatura 25°C.

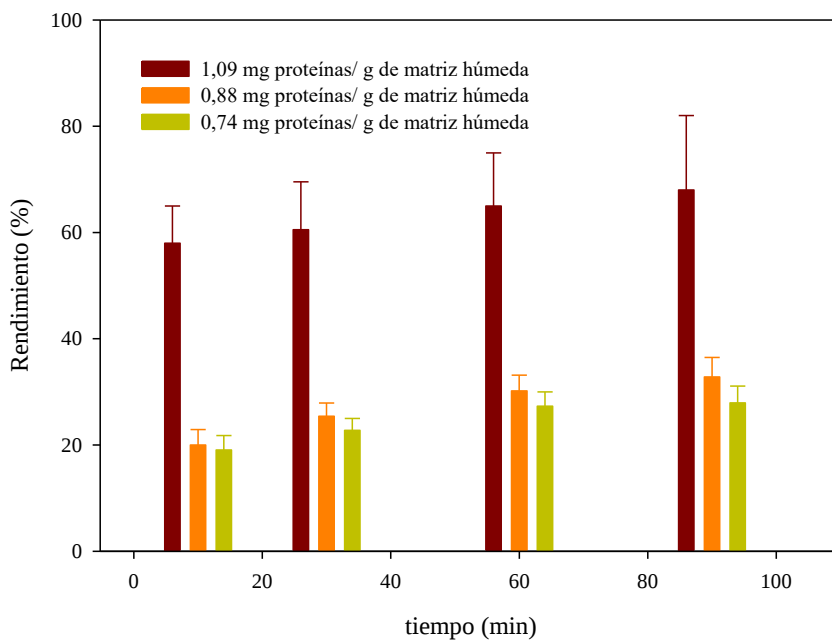


Figura 8.23: %R de la adsorción de endoglucanasa vs. tiempo de desorción para las relaciones ensayadas de proteínas iniciales por g de matriz húmeda de CHS 2,5% P/V en buffer citrato 50 mM pH 5,30 utilizando NaCl 250 mM para desorber. Temperatura 25°C.

Se observan altos FP y altos %R cuando se utiliza una relación de 1,09 g de proteínas iniciales por gramo de matriz de CHS 2,5% P/V.

8.5. Adsorción y desorción de endoglucanasa proveniente de un medio de cultivo fúngico

Se sintetizaron matrices las matrices: CHS 2% P/V, CHS 2% P/V entrecruzada con glutaraldehído durante 30 min de entrecruzamiento (CHS-G30), Chitosán-Eudragit EPO, alginato-goma arábica (ALG-GA) para purificar endoglucanasa proveniente de un medio de cultivo fúngico de residuos de la cosecha de soja descrito en la sección 3.2.11.4 de *Materiales y Métodos*.

En las siguientes adsorciones no se utilizó soluciones buffer dado que los contra-iones interfieren en el proceso de adsorción por la interacción con el soporte adsorbente (Beppu et al. 2004; Çetinus et al. 2009). Los valores de pH se mantuvieron dentro de un rango 5,72-7,30. Estos valores de pH se encuentran dentro del rango de pH óptimo y estabilidad de la enzima endoglucanasa (Hägerdal et al. 1980).

Por último, para las cuatro desorciones se utilizó NaCl 250 mM.

8.5.1. Matriz de CHS 2 % P/V

Las Figuras 8.24 y 8.25 muestran las cantidades residuales relativas de la actividad enzimática y proteínas totales en el sobrenadante a través del tiempo para los procesos de adsorción y desorción, respectivamente, de endoglucanasa proveniente de un extracto de cultivo fúngico sobre la matriz de CHS 2% P/V.

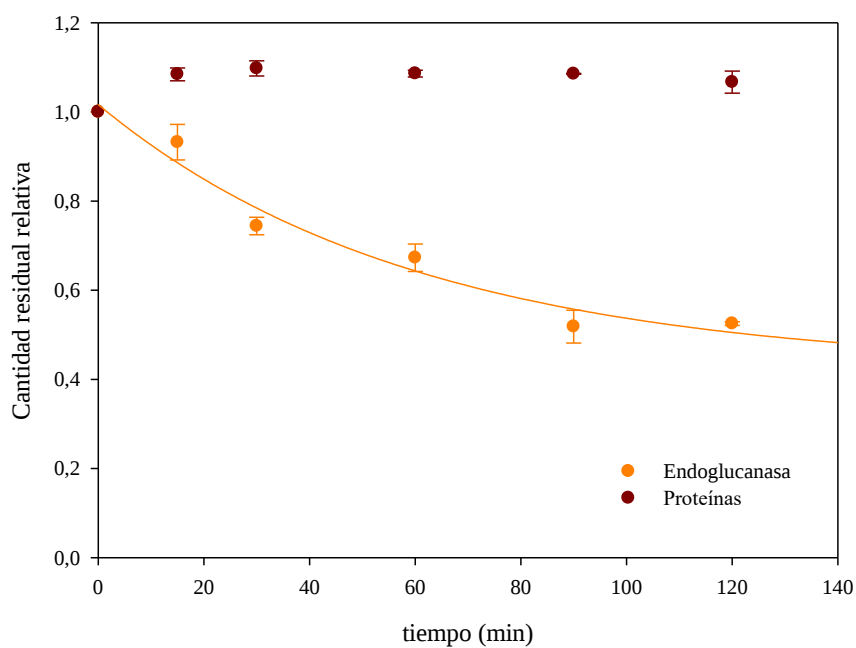


Figura 8.24: Cantidad residual relativa de proteínas y endoglucanasa en el sobrenadante durante el proceso de adsorción de un extracto de cultivo fúngico sobre CHS 2% P/V. Temperatura: 25°C.

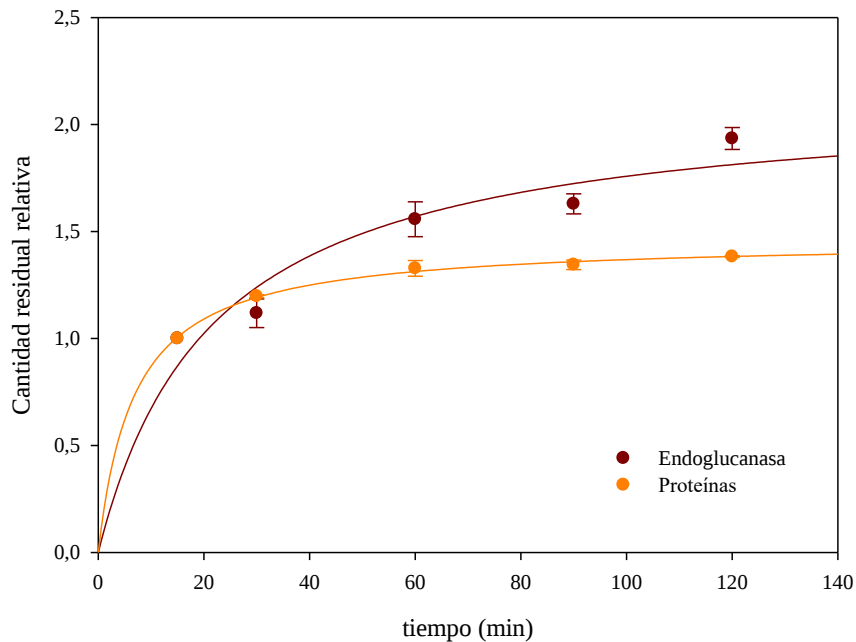


Figura 8.25: Cantidad residual relativa de proteínas y endoglucanasa en el sobrenadante durante el proceso de desorción de la matriz de CHS 2% P/V. Temperatura: 25°C.

En la Figura 8.24 se puede apreciar que los valores correspondientes a la actividad son en todo momento inferiores a 1, alcanzando un 48% de adsorción de la enzima, lo que

confirma que la adsorción se lleva a cabo en estas condiciones, y además, son inferiores respecto de los valores de proteínas totales relativas indicando que la enzima interacciona selectivamente con la matriz. Por otra parte, la cantidad residual relativa de las proteínas totales se mantuvo constante a través del tiempo.

La Figura 8.25 muestra que los valores de la actividad endoglucanasa relativa son superiores a 1 y aumentan a lo largo del tiempo, evidenciando la desorción de la enzima desde la matriz. La cantidad residual relativa de proteínas crecieron levemente durante el proceso de desorción indicando que en el producto de la desorción la proporción de endoglucanasa es mayoritaria.

8.5.2. Adsorción sobre matriz de CHS 2% P/V entrecruzada con Glutaraldehído 0,5 % P/V

En primer lugar se estudió la cinética de adsorción de endoglucanasa de una solución de LCC sobre matrices de CHS entrecruzadas a diferentes tiempos de contacto con Glutaraldehído 0,5% P/V (GLUT), de manera de determinar el tiempo de entrecruzamiento más adecuado para la adsorción de endoglucanasa.

La Tabla 8.XII muestra el porcentaje de endoglucanasa adsorbido a los diferentes tiempos estudiados para las matrices de CHS-GLUT entrecruzadas durante 10 min (CHS-G10), durante 30 min (CHS-G30) y durante 60 min (CHS-G60).

Tabla 8.XII: Porcentaje de endoglucanasa adsorbida sobre matrices de CHS-GLUT: CHS-G10, CHS-G30, CHS-G60

Tiempo de adsorción	% Endoglucanasa adsorbida		
	CHS-G10	CHS-G30	CHS-G60
15	6 ± 1	10 ± 1	19 ± 1
30	6 ± 1	5 ± 1	26 ± 3
60	26 ± 2	23 ± 3	37 ± 4
90	40 ± 1	35 ± 4	19 ± 2
120	42 ± 4	47 ± 4	16 ± 1

Se observa que la matriz CHS-G60 alcanza el máximo porcentaje de adsorción (37%) a tiempos menores que las otras matrices de CHS-GLUT, sin embargo, hay un decaimiento luego de los 60 min. Las matrices CHS-G10 y CHS-G30 alcanzan el máximo porcentaje de adsorción a los 120 min, siendo mayor en el caso de CHS-G30 (47%).

Por otra parte la matriz CHS-G10 presentaba poca rigidez y tenía tendencia a deshacerse, por este motivo fue descartada para estudios posteriores.

La matriz CHS-G60 probablemente presentó una menor adsorción por una mayor disminución de grupos amino disponibles para interaccionar con la enzima.

En base a los resultados obtenidos, se decidió seleccionar a la matriz CHS-G30 para continuar con los estudios de adsorción posteriores.

A partir de ello se realizaron los estudios de cinética de adsorción y desorción de endoglucanasa sobre la matriz de CHS-G30.

La Figura 8.26 muestra la cantidad residual relativa de actividad endoglucanasa y proteínas totales a través del tiempo durante el proceso de adsorción de endoglucanasa de un extracto de cultivo fúngico sobre la matriz de CHS-G30. Se observa una máxima adsorción de la enzima llegando a un 42% a los 90 min.

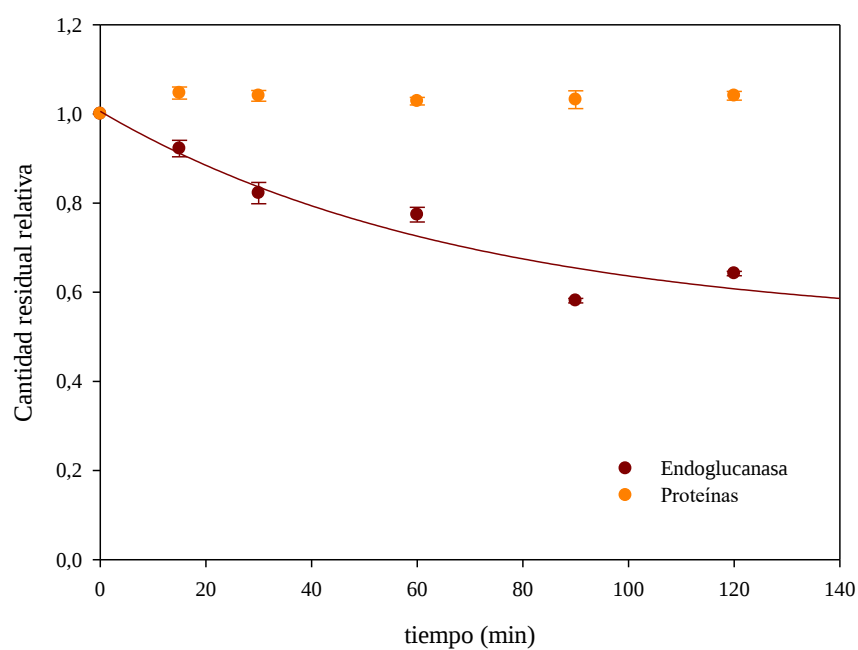


Figura 8.26: Cantidad residual relativa de proteínas y endoglucanasa en el sobrenadante durante el proceso de adsorción sobre CHS-G30. Temperatura: 25°C.

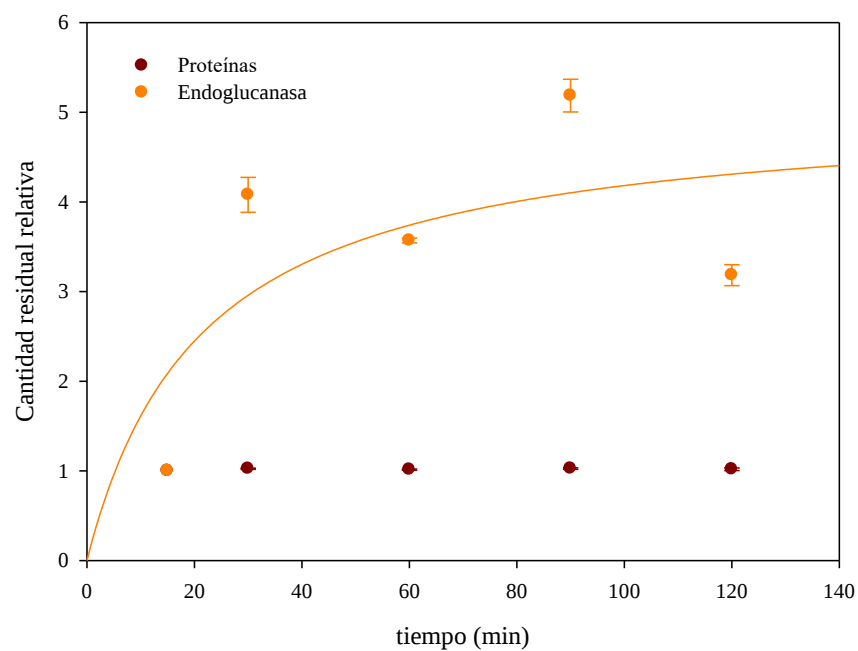


Figura 8.27: Cantidad residual relativa de proteínas y endoglucanasa en el sobrenadante durante el proceso de desorción de la matriz de CHS-G30. Temperatura: 25°C.

La Figura 8.27 muestra la cantidad residual relativa de actividad endoglucanasa y proteínas totales a través del tiempo durante el proceso de desorción de la matriz de CHS-G30. Se observa que la concentración proteica permanece invariable a través del tiempo. En cambio la desorción de la enzima presenta una alta variabilidad alcanzando el máximo a los 90 min.

8.5.3. Adsorción sobre matriz de CHS-EPO

La Figuras 8.28 y 8.29 muestran la adsorción y desorción de endoglucanasa y proteínas de un extracto de cultivo fúngico. Se observa la cantidad residual relativa a través del tiempo en cada caso.

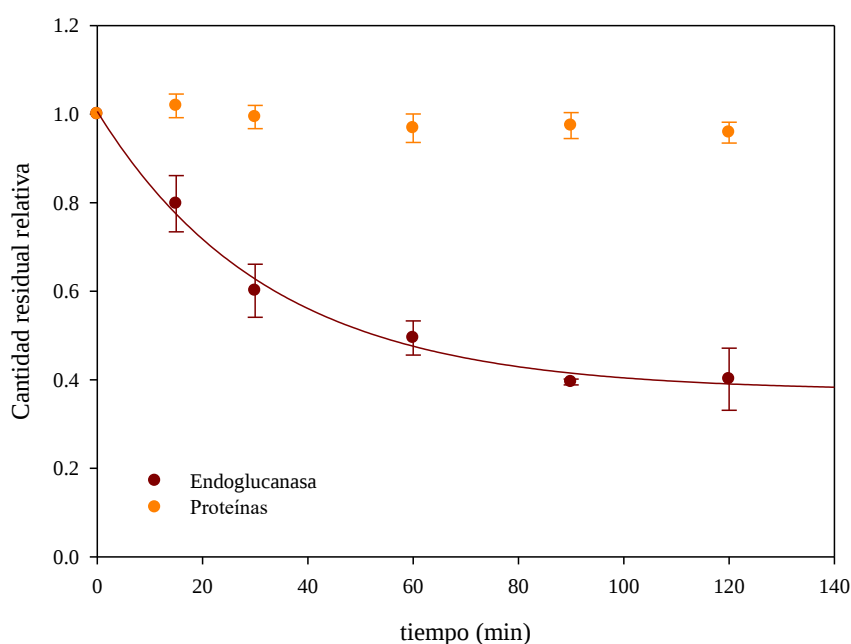


Figura 8.28: Cantidad residual relativa de proteínas y endoglucanasa en el sobrenadante durante el proceso de adsorción sobre CHS-EPO. Temperatura: 25°C.

En la Figura 8.28 se observa la adsorción de la enzima endoglucanasa alcanzando el máximo porcentaje del 60% a los 90 min del proceso. Sin embargo la concentración de

proteínas se mantiene constante a través del tiempo. Los valores de actividad relativa son inferiores a los valores de proteínas totales relativas, y esto indica que la enzima interacciona preferencialmente con la matriz.

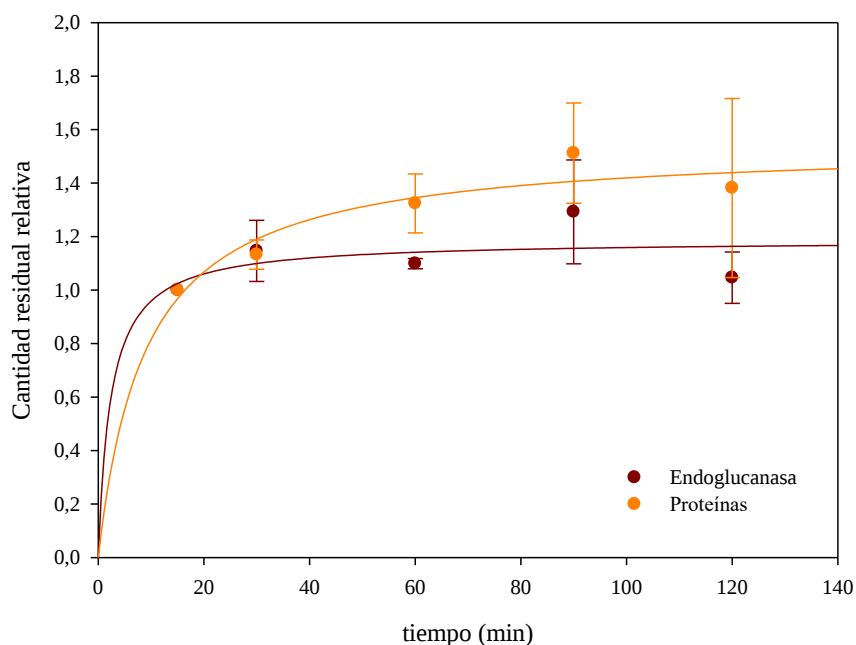


Figura 8.29: Cantidad residual relativa de proteínas y endoglucanasa en el sobrenadante durante el proceso de adsorción sobre CHS-EPO. Temperatura: 25°C.

En la Figura 8.29 se observa un aumento a lo largo del tiempo de las proteínas totales relativas, la actividad relativa presenta valores inferiores a los de proteínas. Esto estaría indicando que la adsorción es adecuada pero no se alcanza con fuerza iónica exclusivamente desorber específicamente la enzima, lo cual explicaría los resultados de baja purificación que se observan posteriormente respecto de esta matriz.

8.5.4. Adsorción sobre matriz de Alginato-Goma Arábica

Las Figuras 8.30 y 8.31 muestran las cantidades residuales relativas de actividad y concentración proteica de los procesos de adsorción y desorción, respectivamente, de endoglucanasa del extracto de cultivo fúngico sobre la matriz de ALG-GA.

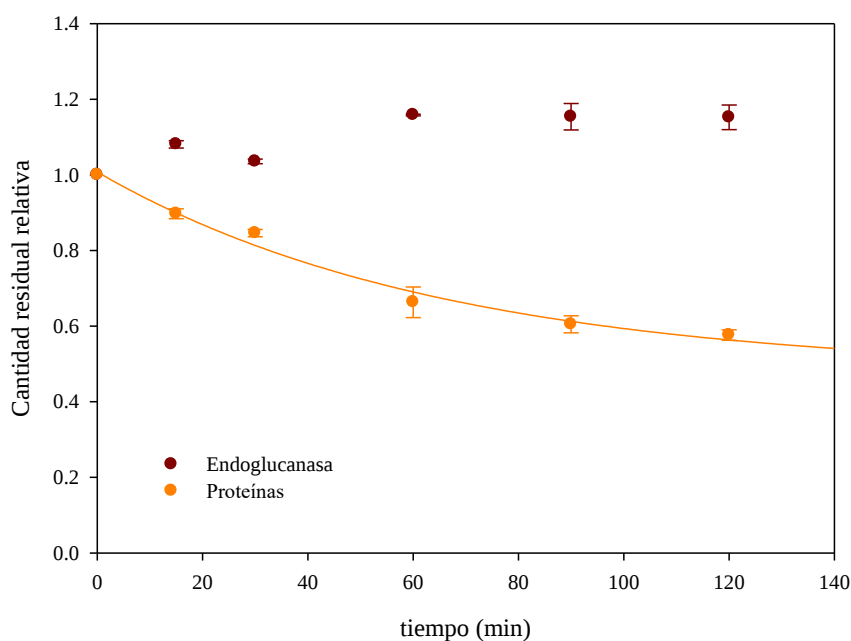


Figura 8.30: Cantidad residual relativa de proteínas y endoglucanasa en el sobrenadante durante el proceso de adsorción sobre ALG-GA. Temperatura: 25°C.

Puede observarse en la Figura 8.30, contrariamente a lo que ocurre con las cantidades residuales relativas de las matrices que contienen CHS analizadas recientemente, los valores de actividad relativa son superiores a 1, lo cual revelaría que no es favorable el proceso de adsorción en estas condiciones. Por el contrario, las cantidades relativas de proteínas disminuyen con el tiempo y son inferiores a 1.

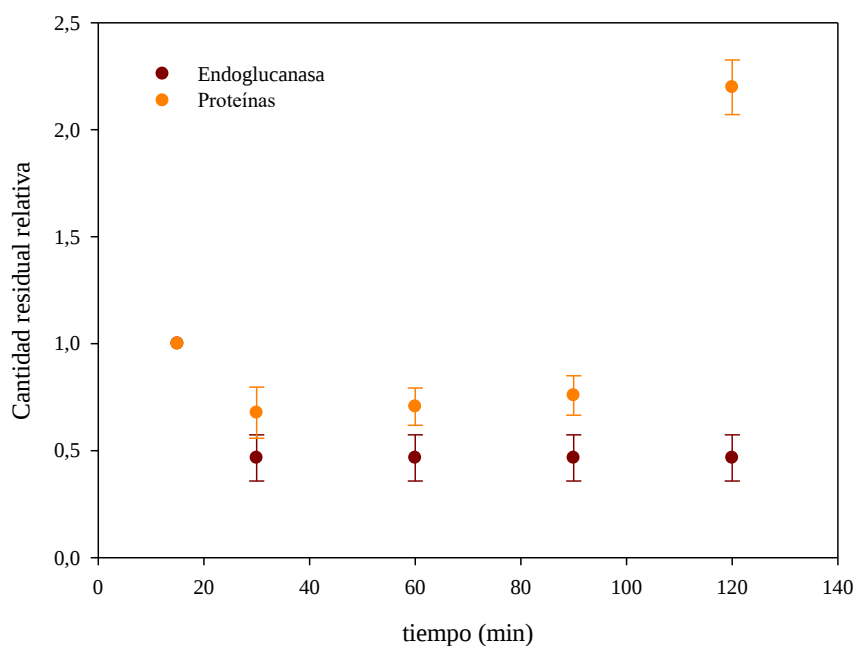


Figura 8.31: Cantidad residual relativa de proteínas y endoglucanasa en el sobrenadante durante el proceso de desorción de la matriz de ALG-GA. Temperatura: 25°C.

En la Figura 8.31 se observa que la actividad relativa permanece constante en el tiempo, y asimismo, los valores son inferiores a 1 y a las proteínas relativas.

Estos resultados indican que la matriz de ALG-GA no será de elección para este tipo de proceso de aislamiento de la endoglucanasa, esto quedará corroborado en las secciones siguientes donde presentaremos los valores comparativos de los parámetros de la purificación.

8.5.5. Eficiencia del Proceso de Purificación de Endoglucanasa proveniente de un cultivo fúngico

Las Tablas 8.XIII y 8.XIV muestran los valores de los FP y %R, respectivamente, de endoglucanasa del extracto de cultivo fúngico empleando la adsorción y desorción de las cuatro matrices: CHS, CHS-G30, CHS-EPO y ALG-GA.

Se puede apreciar que se alcanzó el máximo factor de purificación con la matriz CHS-G30, a los 90 min y con un valor de 8,9. En el caso del rendimiento porcentual, se logró el máximo valor con la matriz CHS-EPO, también a los 90 min y obteniéndose un 59,5%.

Tabla 8.XIII: Factores de Purificación de endoglucanasa proveniente del extracto de cultivo fúngico con matrices poliméricas

Tiempo de desorción	Matrices			
	CHS	CHS-EPO	CHS-G30	ALG-GA
15	0,94 ± 0,05	2,5 ± 0,2	1,62 ± 0,05	0,30 ± 0,04
30	0,88 ± 0,09	2,4 ± 0,1	6,374 ± 0,006	0,28 ± 0,03
60	1,10 ± 0,04	2,1 ± 0,2	5,6 ± 0,2	0,27 ± 0,01
90	1,1 ± 0,2	2,08 ± 0,03	8,9 ± 0,5	0,221 ± 0,002
120	1,3 ± 0,1	1,57 ± 0,01	6,5 ± 0,9	0,073 ± 0,003

Tabla 8.XIV: Porcentaje de Rendimiento de endoglucanasa proveniente de un cultivo fúngico con matrices poliméricas

Tiempo de desorción	Matrices			
	CHS	CHS-EPO	CHS-G30	ALG-GA
15	13,4 ± 0,4	47,4 ± 0,2	5,34 ± 0	5 ± 1
30	15 ± 2	57 ± 2	21,06 ± 0,01	2,84 ± 0,01
60	21 ± 2	51,9 ± 0,9	18,4 ± 0,7	2,84 ± 0,01
90	22 ± 4	59,5 ± 0,9	29 ± 1	2,84 ± 0,01
120	26 ± 1	54,1 ± 0,7	21 ± 3	2,84 ± 0,01

8.5.6. Análisis Estadístico

La Tabla 8.XV representa el análisis ANOVA Bifactorial (matriz, tiempo) para la variable purificación utilizando las cuatro matrices.

Tabla 8.XV: ANOVA Bifactorial para la variable purificación

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	P	
Matriz	3	75,779	252,597	4.641,374	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	***
Tiempo	4	1,111	0,2777	51,035	0,002398	**
Matriz:Tiempo	12	7,850	0,6542	120,200	$4,15 \cdot 10^{-6}$	***
Error	35	1,905	0,0544			

* $p \leq 0,05$

** $p \leq 0,01$

*** $p \leq 0,001$

De acuerdo a la Tabla 8.XV la interacción matriz-tiempo resulta significativa ($p < 0,001$).

La Tabla 8.XVI, construida a partir de las comparaciones de a pares de las medias de purificación entre las matrices para cada tiempo mediante el método de Tuckey, muestra aquellas matrices que pueden considerarse como "grupo homogéneo", en el cual a partir de dichas comparaciones no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$).

Tabla 8.XVI: Tabla de Tuckey para la variable purificación

Matriz	Tiempo de desorción (min)				
	15	30	60	90	120
CHS	x	x	x	x	x
CHS-G30	x	x	x	x	x
CHS-EPO	x	x	x	x	x
ALG-GA	x	x	x	x	x

En base a los datos de la Tabla 8.XVI, a continuación se analizaron las diferencias de purificación promedio entre las matrices para cada tiempo:

-Tiempo 15 min: no hubo diferencia significativa entre las matrices CHS, CHS-G30, CHS-EPO. Por el contrario, la matriz ALG-GA muestra diferencia significativa respecto de las otras matrices.

-Tiempo 30 min: hubo diferencia significativa entre las cuatro matrices.

-Tiempos 60, 90 y 120 min: no hubo diferencia significativa entre las matrices CHS y CHS-EPO. Por otro lado, hubo diferencia significativa entre las matrices CHS-G30 y ALG-GA, y entre éstas y las matrices CHS y CHS-EPO.

La Tabla 8.XVII representa el análisis ANOVA Bifactorial para la variable rendimiento de las cuatro matrices.

Tabla 8.XVII: ANOVA Bifactorial para la variable Rendimiento

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	P	
Matriz	3	21.502,8	7167,6	7.362,055	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	***
Tiempo	4	653,0	163,2	167,666	$9,18 \cdot 10^{-5}$	***
Matriz:Tiempo	12	715,8	59,6	61,265	$1,2210^{-2}$	*
Error	35	340,8	9,7			

* $p \leq 0,05$

** $p \leq 0,01$

*** $p \leq 0,001$

De acuerdo a la Tabla 8.XVII la interacción matriz-tiempo resulta significativa ($p=0,0122$).

La Tabla 8.XVIII representa la tabla de Tuckey para las cuatro matrices a cada uno de los tiempos. En este caso la variable es el rendimiento.

Tabla 8.XVIII: Tabla de Tuckey para la variable Rendimiento

Matriz	Tiempo de desorción (min)				
	15	30	60	90	120
CHS	x	x	x	x	x
CHS-G30	x	x	x	x	x
CHS-EPO	x	x	x	x	x
ALG-GA	x	x	x	x	x

En base a los datos de la Tabla 8.XVIII, a continuación se analizaron las diferencias de rendimiento promedio entre las matrices para cada tiempo:

-Tiempo 15 min: no hubo diferencia significativa entre las matrices CHS, CHS-G30 y ALG-GA. Por el contrario, hubo diferencia significativa entre la matriz CHS-EPO y las otras matrices.

-Tiempos 30, 60, 90 y 120 min: no hubo diferencia significativa entre las matrices CHS y CHS-G30. Por otro lado, hubo diferencia significativa entre las matrices CHS-EPO y ALG-GA, y entre éstas y las matrices CHS y CHS-G30.

8.6. Adsorción de endoglucanasa sobre las membranas poliméricas

Se sintetizaron membranas de chitosán debido a que pueden presentar mayor capacidad de adsorción que las esferas debido a que la concentración de chitosán es mayor en las membranas que en las esferas dado que la preparación de las membranas requiere que la solución de chitosán se seque hasta que alcance un 50% de su masa inicial (Vieira and Beppu 2006). Las membranas de chitosán fueron modificadas químicamente para aumentar la selectividad por la enzima.

La adsorción de enzimas depende de las interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Además, las interacciones electrostáticas entre moléculas de proteínas y grupos modificados sobre la superficie del chitosán podrían presentar un rol protagónico en el proceso de adsorción (Song and Forciniti 2000).

No se utilizó solución buffer dado que los contra-iones pueden interferir en el proceso de adsorción interaccionando con la matriz adsorbente (Beppu et al. 2004; Çetinus et al. 2009). Los valores de pH de las soluciones fueron controlados y mantenidos dentro del rango 5,40-6,66. Estos valores de pH se encuentran dentro del rango de pH óptimo y de estabilidad de la endoglucanasa (Hägerdal et al. 1980).

La Figura 8.32 muestra el porcentaje de adsorción de endoglucanasa para diferentes membranas de chitosán. Puede notarse que la funcionalización de las membranas de

chitosán mejoraron la adsorción de endoglucanasa. Cuando la membrana de chitosán no modificada se utilizó como adsorbente sólo se alcanzó un 1,1% de adsorción de la enzima. La membrana de CHS-Tau-Cu presentó el máximo porcentaje de adsorción alcanzando el 40% mientras que el resto de las membranas funcionalizadas exhibieron valores cercanos al 30%.

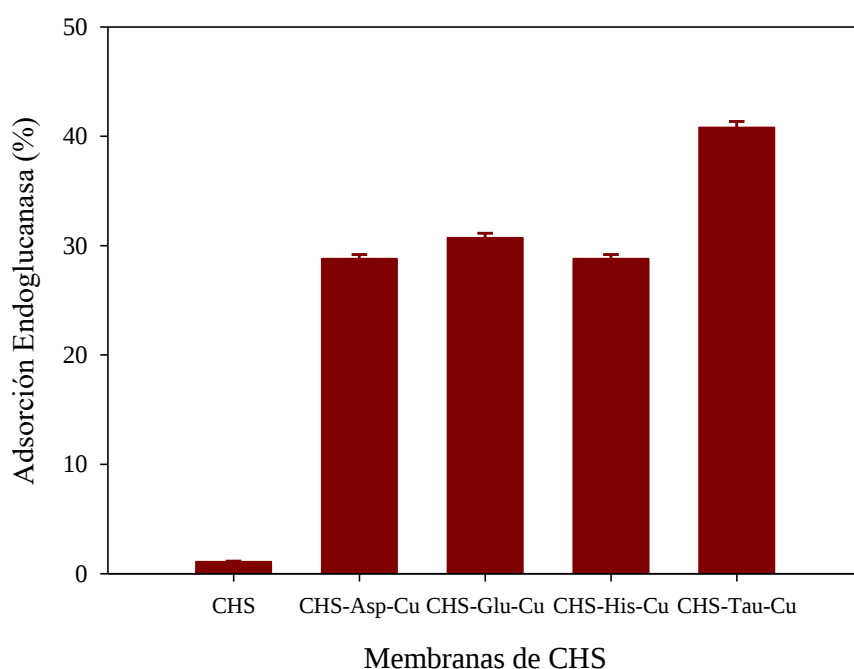


Figura 8.32: Porcentaje de adsorción de endoglucanasa sobre diferentes membranas de chitosán.

Temperatura 25°C.

El aminoácido Taurina posee un grupo sulfónico en su estructura química y puede estar ionizado en las condiciones de pH utilizadas debido a su bajo valor de pKa. La porosidad de la membrana de CHS-Tau-Cu observada en los resultados previos de SEM (Sección 7.2.1) y la ionización del grupo sulfónico podrían favorecer la adsorción de endoglucanasa sobre la membrana.

La sinergia de todos estos factores podrían promover un incremento en la adsorción de la endoglucanasa sobre la membrana de CHS-Tau-Cu.

Además, trabajos previos han informado que los grupos funcionales superficiales de adsorbentes no sólo afectan al comportamiento de sorción, sino que también dominan el mecanismo de sorción. Los adsorbentes con grupos sulfónicos sobre la superficie podrían interaccionar con los adsorbatos a través de intercambio iónico (Niu et al. 2010).

En este trabajo, un novedoso biosorbente de quitosán modificado con aminoácidos y cobre fue preparado y empleado para la adsorción de endoglucanasa. Se ha informado que la Afinidad por Metal Inmovilizado (IMA) es una adecuada técnica de separación para la purificación de proteínas. Utiliza compuestos quelantes unidos covalentemente a soportes sólidos que atrapan iones metálicos, que son usados como ligandos de afinidad para diferentes proteínas. En IMA, la adsorción de proteínas está basada en la coordinación entre un metal inmovilizado y grupos donador de electrones de la superficie de la proteína (Gaberc-Porekar and Menart 2001).

Por lo tanto, en este trabajo, los iones cobre que pueden ser considerados como ácidos de Lewis, estarían interaccionando con grupos donador de electrones presentes sobre la superficie de la endoglucanasa. Además, se ha informado que las glicosil-hidrolasas con actividad endoglucanasa presentan sitios de unión a cobre requeridos para su actividad enzimática (Westereng et al. 2011)

Otros autores han usado técnicas cromatográficas para la purificación de endoglucanasa de diferentes cepas de hongos (Saha 2004; Kaur et al. 2007). Sin embargo, estos métodos son más costosos y requieren más pasos.

Así, estos novedosos soportes podrían ser una poderosa herramienta para la industria para su uso en gran escala para la purificación de endoglucanasa de sistemas biológicos complejos como los extractos de cultivo fúngico, debido a su simplicidad y alta selectividad por la enzima endoglucanasa.



Capítulo 9. *Conclusiones*

Capítulo 9: Conclusiones

En el presente trabajo la enzima endoglucanasa de *Aspergillus niger* presentó un rango de temperatura óptima de actividad de 50-65° C. En el rango de pH estudiado (3,00-6,00) la enzima se mantuvo estable durante tiempos menores a 60 min. La enzima presentó estabilidad en un rango de temperatura entre 30-50°C.

Según los objetivos planteados se logró la producción de celulasas a partir de cultivos fúngicos en medio sólido sobre los soportes marlo de maíz, cáscaras de soja, papel, pellets de cáscaras de soja y residuos de la cosecha de soja.

En la FES sobre marlo de maíz en primer lugar se realizó la evaluación de la velocidad de crecimiento radial de tres cepas productoras de celulasas: *Trichoderma harzianum* T104, *Aspergillus niger* GH1, *Aspergillus niger* NRRL3. La cepa *Aspergillus niger* NRRL3 fue seleccionada para estudios posteriores para llevar a cabo la FES dado que presentó la mayor velocidad de crecimiento radial. Se lograron producir las tres enzimas del complejo celulolítico: endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa. La actividad endoglucanasa no pudo ser cuantificada sobre este soporte. Sin embargo, se realizó la determinación cualitativa y pudo determinarse actividad endoglucanasa.

En papel y cáscaras de soja las actividades endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa pudieron ser cuantificadas resultando máximas en cáscaras de soja a las 96 h de la fermentación. Sobre estos soportes se realizó la caracterización fisicoquímica de los mismos. Ambos soportes ensayados tuvieron valores de CHP por debajo del 40 %, límite aceptado para el crecimiento de *A. niger*. El valor de WAI en cáscaras de soja fue un 37 % mayor al obtenido en papel.

En procesos de FES es importante tener en cuenta aspectos tales como el costo y disponibilidad del soporte, impacto medio ambiental, así como el costo del proceso. De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis fisicoquímico (WAI, CHP, PD) las

cáscaras de soja y papel residual tienen un gran potencial para ser usado como soportes en FES. Sin embargo el uso de cáscaras de soja provee altas productividades volumétricas a cortos tiempos, disminuyendo los costos de producción considerando un escalado del proceso. Además las cáscaras de soja es un abundante residuo agroindustrial. Por otro lado el alto valor de WAI y bajo valor de CHP obtenidos en cáscaras de soja hacen que sea un excelente material para ser utilizado como soporte en FES. El desarrollo de un bioproceso para la producción de celulasa ofrecería ventajas medio ambientales y económicas.

Para diseñar un método de aislamiento y purificación a través de precipitación de endoglucanasa de *Aspergillus niger* se seleccionaron dos polímeros, el polivinil sulfonato de sodio (PVS), aniónico; y el chitosán (CHS), catiónico. Se obtuvieron las condiciones básicas para la formación de los complejos insolubles: endoglucanasa comercial (LCC) 30 mg/mL, PVS 1,00 % P/P, CHS 0,05 % P/V. Los diagramas de solubilidad para ambos complejos fueron poco dependientes de la concentración del polímero, no observándose variación del rango de pH al variar la relación polímero-proteína. Tampoco se observó pérdida de la actividad enzimática durante la precipitación, por lo que concluimos que tanto el PVS como el CHS serían estabilizantes apropiados de la endoglucanasa. Las curvas de precipitación realizadas en medios de distintas fuerzas iónicas demostraron que las interacciones dadas entre la enzima y cualquiera de los dos polímeros son fundamentalmente del tipo electrostáticas, debido a que la presencia de bajas concentraciones salinas en el medio inhibieron completamente la formación de ambos precipitados. En cuanto a la cinética de formación, podemos decir que, para ambos complejos, la misma se ve favorecida a temperaturas menores a los 20° C., siendo más rápida con PVS (10 min) que con CHS (40 min). En un proceso industrial este último detalle podría llegar a ser algo restrictivo

para el uso de CHS pero teniendo en cuenta el costo, la cantidad de polímero por miligramo de liofilizado y los valores de rendimiento y purificación, aún así lograría llegar a ser de elección frente al PVS. En la metodología aplicada sobre el liofilizado comercial de la enzima (LCC), se consiguieron elevados valores de purificación y bajos rendimientos, excepto con CHS donde se consiguieron rendimientos del 60%.

Hasta este momento podemos resaltar que esta metodología bioseparativa por formación de complejos insolubles (PVS-endoglucanasa o CHS-endoglucanasa) ha arrojado resultados promisorios en cuanto a la estabilidad y fundamentalmente a la purificación de la endoglucanasa.

La precipitación con polielectrolitos utilizando PVS practicada sobre un extracto de origen fúngico reveló un comportamiento similar al obtenido con la endoglucanasa comercial, es decir, rendimientos pobres y destacados valores de purificación. Sin embargo, cuando se trabajó con CHS se alcanzaron factores de purificación aún más altos que los logrados con la enzima comercial, pero con rendimientos más bajos. Estos resultados demuestran que la metodología estudiada no sólo permite ser utilizada como paso extractivo de la enzima a partir de una mezcla compleja, sino que incluso se la puede considerar como etapa única de purificación utilizando tanto PVS como CHS.

En este trabajo se expusieron los resultados acerca de la síntesis de las matrices poliméricas así como también los estudios cinéticos del proceso de adsorción de la endoglucanasa.

La producción de matrices esféricas ha sido relativamente exitosa teniendo en cuenta los resultados de las purificaciones del liofilizado comercial de endoglucanasa ya que se obtuvieron altos valores de purificación. Particularmente en la adsorción de endoglucanasa de *A. niger* sobre matriz de CHS 2,5 % P/V en buffer citrato 50 mM pH

5,30 se alcanzó un FP de 18 a los 20 minutos de la desorción de endoglucanasa con buffer citrato 50 mM pH 5,30 250 mM NaCl.

Se prepararon diferentes matrices esféricas para purificar endoglucanasa utilizando el polímero catiónico Chitosán y Chitosán modificado con Eudragit EPO y Glutaraldehído (CHS-EPO y CHS-GLUT), así como también utilizando los polímeros naturales aniónicos Alginato y Goma arábica, con el objetivo de diseñar un método de aislamiento y purificación de la endoglucanasa de un extracto fúngico de *Aspergillus niger*.

En un principio se realizó la caracterización de las matrices mediante diferentes estudios. A partir de titulaciones se determinó que no hay diferencia significativa entre los rangos de pI, los cuales se encuentran entre 6,00-6,70; sin embargo, una interacción matriz-proteína más favorable podría explicarse por la presencia de diferentes grupos químicos expuestos en la superficie de cada matriz. También se comparó la morfología de superficie de las distintas matrices mediante microscopía de barrido electrónico, observándose diferencias significativas entre la superficie de la matriz de CHS, la cual es lisa y no porosa y la superficie de las matrices de CHS modificadas químicamente con Glutaraldehído y con EPO que resultaron estriadas y rugosas. Además se identificaron y verificaron las modificaciones químicas sobre la matriz de CHS luego de la síntesis de CHS-GLUT y CHS-EPO a través de espectrometría infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) utilizando Reflectancia Total Atenuada (ATR).

Se realizaron los cálculos de los factores de purificación y porcentajes de rendimiento para las cuatro matrices (CHS, CHS-GLUT, CHS-EPO Y ALG-GA). Se obtuvo el mayor factor de purificación para la matriz CHS-G30 a los 90 min., alcanzándose un valor de 8,9. En cuanto al rendimiento, se obtuvo el mayor porcentaje con la matriz CHS-EPO, a los 90 min., el cual fue de 59,5 %.

Membranas de chitosán funcionalizadas con aminoácidos y cobre fueron obtenidas y empleadas para mejorar la selectividad de adsorción de la enzima endoglucanasa. Los resultados de SEM indicaron que la funcionalización se produjo, dado que la superficie de la membrana de chitosán fue modificada. Los de resultados de FTIR de las membranas mostraron una efectiva modificación química de las membranas de chitosán funcionalizadas con aminoácidos y cobre dado que se observaron aparición de nuevos picos y la variación de intensidad de otros después de la funcionalización. DSC y TGA fueron utilizadas exitosamente para caracterizar las membranas de chitosán funcionalizadas. Los parámetros característicos de estos métodos termales confirmaron la adsorción de endoglucanasa sobre las membranas funcionalizadas.

La funcionalización de las membranas de chitosán incrementó significativamente el porcentaje de adsorción de endoglucanasa. El mayor porcentaje de adsorción de endoglucanasa alcanzado fue del 40% cuando la membrana CHS-Tau-Cu fue utilizada.

Debido a la relevancia de la celulasa en la industria, es importante diseñar un proceso no contaminante, simple y de bajo costo para poder separar endoglucanasa de sistemas complejos. El proceso de adsorción en batch utilizando membranas de chitosán funcionalizadas con taurina y cobre podría representar un método selectivo para la purificación de endoglucanasa de sistemas complejos, con potencial utilización en procesos de fermentación para la producción de celulasa.

Capítulo 10.
Referencias
Bibliográficas

Capítulo 10: Referencias Bibliográficas

Barrios-González, J., H. González, et al. (1993). *Effect of particle size, packing density and agitation on penicillin production in solid state fermentation*. Biotechnology Advances **11**(3): 539-547.

Bassani, G., B. Farruggia, et al. (2011). *Cationic polyelectrolytes–lipases complexes formation as tool for recovery of these enzymes from their natural sources*. International journal of biological macromolecules **49**(3): 351-355.

Beppu, M., E. Arruda, et al. (2004). *Adsorption of Cu (II) on porous chitosan membranes functionalized with histidine*. Journal of membrane science **240**(1): 227-235.

Beppu, M., R. Vieira, et al. (2007). *Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption*. Journal of membrane science **301**(1): 126-130.

Blix, G. (1948). *The determination of hexosamines according to Elson and Morgan*. Acta chem. scand **2**(Part 1): 467-473.

Botella, C., A. Diaz, et al. (2007). *Xylanase and pectinase production by Aspergillus awamori on grape pomace in solid state fermentation*. Process Biochemistry **42**(1): 98-101.

Bradford, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry **72**(1-2): 248-254.

Buenrostro-Figueroa, J., H. de la Garza-Toledo, et al. (2010). *Juice extraction from mango pulp using an enzymatic complex of Trichoderma sp. produced by solid-state fermentation*. Food Science and Biotechnology **19**(5): 1387-1390.

Burstein, E., N. Vedenkina, et al. (1973). *Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules*. Photochemistry and photobiology **18**(4): 263-279.

Castellan, G. W. and M. E. C. Basín (1987). *Fisicoquímica*. Pearson educación.

Catai, J. R., J. S. Toraño, et al. (2007). *Capillary electrophoresis–mass spectrometry of proteins at medium pH using bilayer-coated capillaries*. Analyst **132**(1): 75-81.

Çetinus, Ş. A., E. Şahin, et al. (2009). *Preparation of Cu (II) adsorbed chitosan beads for catalase immobilization*. Food Chemistry **114**(3): 962-969.

Cooper, C., P. Dubin, et al. (2005). *Polyelectrolyte–protein complexes*. Current opinion in colloid & interface science **10**(1): 52-78.

Corazzari, I., R. Nisticò, et al. (2015). *Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity*. Polymer Degradation and Stability **112**: 1-9.

Chávez-González, M., L. Rodríguez-Durán, et al. (2010). *Packing density and aeration rate effect on tannase production by Aspergillus niger GH1 in solid state fermentation*. Chemistry and Biotechnology of Polyphenols: Fundamentals and Application, CiBET, Kerala, India: 199.

Cheng, Z., X. Liu, et al. (2010). *Adsorption kinetic character of copper ions onto a modified chitosan transparent thin membrane from aqueous solution*. Journal of hazardous materials **182**(1): 408-415.

Damelin, L. H., M. A. Fernandes, et al. (2015). *Alginate microbead-encapsulated silver complexes for selective delivery of broad-spectrum silver-based microbicides*. International journal of antimicrobial agents **46**(4): 394-400.

Desbrieres, J. (2002). *Viscosity of semiflexible chitosan solutions: influence of concentration, temperature, and role of intermolecular interactions*. Biomacromolecules **3**(2): 342-349.

Deutscher, M. P. (1990). *Guide to protein purification*. Gulf Professional Publishing.

Diós, P., S. Nagy, et al. (2015). *Preformulation studies and optimization of sodium alginate based floating drug delivery system for eradication of Helicobacter pylori*. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics **96**: 196-206.

Dissing, U. and B. Mattiasson (1996). *Polyelectrolyte complexes as vehicles for affinity precipitation of proteins*. Journal of biotechnology **52**(1): 1-10.

Dos Santos, J. E., E. Dockal, et al. (2005). *Thermal behavior of Schiff bases from chitosan*. Journal of thermal analysis and calorimetry **79**(2): 243-248.

Emik, S. (2014). *Preparation and characterization of an IPN type chelating resin containing amino and carboxyl groups for removal of Cu (II) from aqueous solutions*. *Reactive and Functional Polymers* **75**: 63-74.

Fabian, C., L. Huynh, et al. (2010). *Precipitation of rice bran protein using carrageenan and alginate*. *LWT-food Science and Technology* **43**(2): 375-379.

Farinas, C., L. Scarpelini, et al. (2011). *Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger**. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **28**(1): 17-26.

Fasman, G. D. and N. C. Price (1996). *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. *Protein Science* **5**(10): 2134-2135.

Gaberc-Porekar, V. and V. Menart (2001). *Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography*. *Journal of biochemical and biophysical methods* **49**(1): 335-360.

Geng, F., Q. Huang, et al. (2012). *Co-purification of chicken egg white proteins using polyethylene glycol precipitation and anion-exchange chromatography*. *Separation and purification technology* **96**: 75-80.

Gole, A., S. Vyas, et al. (2002). *Studies on the formation of bioconjugates of Endoglucanase with colloidal gold*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **25**(2): 129-138.

Gombotz, W. R. and S. F. Wee (2012). *Protein release from alginate matrices*. *Advanced drug delivery reviews* **64**: 194-205.

Greenfield, N. J. (2006). *Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure*. *Nature protocols* **1**(6): 2876-2890.

Gu, B., Y. Li, et al. (2007). *Polymer monoliths with low hydrophobicity for strong cation-exchange capillary liquid chromatography of peptides and proteins*. *Analytical chemistry* **79**(15): 5848-5855.

Gupta, V., S. Nath, et al. (2002). *Role of water structure on phase separation in polyelectrolyte–polyethyleneglycol based aqueous two-phase systems*. *Polymer* **43**(11): 3387-3390.

Hägerdal, B., J. D. Ferchak, et al. (1980). *Saccharification of cellululose by the cellulolytic enzyme system of *Thermonospora* sp. I. Stability of cellulolytic activities with respect to time, temperature, and pH*. *Biotechnology and Bioengineering* **22**(8): 1515-1526.

Harnsilawat, T., R. Pongsawatmanit, et al. (2006). *Characterization of β -lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: a calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study*. *Food Hydrocolloids* **20**(5): 577-585.

Harris, W. T. (1969). *Water temperature and accuracy of alginate impressions*. The Journal of prosthetic dentistry **21**(6): 613-617.

Henrissat, B., H. Driguez, et al. (1985). *Synergism of cellulases from Trichoderma reesei in the degradation of cellulose*. Nature Biotechnology **3**(8): 722-726.

Hölker, U. and J. Lenz (2005). *Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages?* Current Opinion in Microbiology **8**(3): 301-306.

Hondrum, S. O. and R. Fernandez (1997). *Effects of long-term storage on properties of an alginate impression material*. The Journal of prosthetic dentistry **77**(6): 601-606.

Izumrudov, V. A., I. Y. Galaev, et al. (1998). *Polycomplexes—potential for bioseparation*. Bioseparation **7**(4-5): 207-220.

Jeganathan, B. and V. Prakya (2015). *Interpolyelectrolyte complexes of Eudragit® EPO with hypromellose acetate succinate and Eudragit® EPO with hypromellose phthalate as potential carriers for oral controlled drug delivery*. AAPS PharmSciTech **16**(4): 878-888.

Kamari, A., W. W. Ngah, et al. (2009). *Sorption of acid dyes onto GLA and H₂SO₄ cross-linked chitosan beads*. Desalination **249**(3): 1180-1189.

Kaur, J., B. S. Chadha, et al. (2007). *Purification and characterization of two endoglucanases from Melanocarpus sp. MTCC 3922*. Bioresource Technology **98**(1): 74-81.

Kay M., W. J. (2014). "ARTool: Aligned Rank Transform for Nonparametric Factorial ANOVAS R package (version 0.9.3)." from <https://github.com/mjskay/ARtool>.

Khademi, S., D. Zhang, et al. (2002). *Determination of the structure of an endoglucanase from Aspergillus niger and its mode of inhibition by palladium chloride*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography **58**(4): 660-667.

Khandeparkar, R. and N. Bhosle (2006). *Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by Arthrobacter sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation*. Enzyme and Microbial Technology **39**(4): 732-742.

Khrapunov, S. (2009). *Circular dichroism spectroscopy has intrinsic limitations for protein secondary structure analysis*. Analytical biochemistry **389**(2): 174-176.

Kim, W.-S., I. Hirasawa, et al. (2001). *Effects of experimental conditions on the mechanism of particle aggregation in protein precipitation by polyelectrolytes with a high molecular weight*. Chemical Engineering Science **56**(23): 6525-6534.

Kulkarni, A. R., K. S. Soppimath, et al. (2000). *Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application*. Journal of Controlled Release **63**(1): 97-105.

Kyriacou, A., R. J. Neufeld, et al. (1988). *Effect of physical parameters on the adsorption characteristics of fractionated Trichoderma reesei cellulase components*. Enzyme and Microbial Technology **10**(11): 675-681.

Laemmli, U. K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. nature **227**: 680-685.

Lakowicz, J. S. (1983). *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York, Plenum press.

Lali, A., N. Aruna, et al. (2000). *Reversible precipitation of proteins on carboxymethyl cellulose*. Process Biochemistry **35**(8): 777-785.

Larumbe, R. M. (1992). *Purificación y caracterización de endoglucanasa III de Trichoderma reesei QM9414*, Universidad Complutense de Madrid.

Lee, K. Y. and D. J. Mooney (2012). *Alginate: properties and biomedical applications*. Progress in polymer science **37**(1): 106-126.

LeHoux, J.-G. and G. Dupuis (2007). *Recovery of chitosan from aqueous acidic solutions by salting-out: Part 1. Use of inorganic salts*. Carbohydrate polymers **68**(2): 295-304.

Lenth R.V., H. M. (2015). "lsmeans: Least-Squares Means. R package (version 2.17)." from <http://CRAN.R-project.org/package=lsmeans>.

Li, C.-H., H.-R. Wang, et al. (2012). *Cloning, purification, and characterization of a heat-and alkaline-stable endoglucanase B from Aspergillus niger BCRC31494*. Molecules **17**(8): 9774-9789.

Lima, N. and M. Mota (2003). *Biotecnologia dos ambientes aéreos e confinados*. Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações: 321-338.

Liu, D., R. Zhang, et al. (2011). *Thermostable cellulase production of Aspergillus fumigatus Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes*. International Biodeterioration & Biodegradation **65**(5): 717-725.

Liu, W., S. Sun, et al. (2005). *An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes*. Biomaterials **26**(15): 2705-2711.

Low, D., R. O'Leary, et al. (2007). *Future of antibody purification*. Journal of Chromatography B **848**(1): 48-63.

Lynd, L. R., P. J. Weimer, et al. (2002). *Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology*. Microbiology and molecular biology reviews **66**(3): 506-577.

Machado, E. M., R. M. Rodriguez-Jasso, et al. (2012). *Growth of fungal strains on coffee industry residues with removal of polyphenolic compounds*. Biochemical Engineering Journal **60**: 87-90.

Manpreet, S., S. Sawraj, et al. (2005). *Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation*. Mal J Microbiol **1**(2): 1-9.

Manzur, A., D. Spelzini, et al. (2007). *Polyethyleneimine phosphate and citrate systems act like pseudo polyampholytes as a starting method to isolate pepsin*. Journal of Chromatography B **860**(1): 63-68.

- Marquardt, D. W. (1963). *An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters*. Journal of the society for Industrial and Applied Mathematics **11**(2): 431-441.
- Martins, S., S. I. Mussatto, et al. (2011). *Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review*. Biotechnology Advances **29**(3): 365-373.
- Mattison, K. W., P. L. Dubin, et al. (1998). *Complex formation between bovine serum albumin and strong polyelectrolytes: effect of polymer charge density*. The Journal of Physical Chemistry B **102**(19): 3830-3836.
- McCabe, W., J. Smith, et al. (2007). *Operaciones Unitarias en Ingeniería Química*. 7^a Edición. Editorial Mc Graw Hill, México.
- Medve, J., D. Lee, et al. (1998). *Ion-exchange chromatographic purification and quantitative analysis of Trichoderma reesei cellulases cellobiohydrolase I, II and endoglucanase II by fast protein liquid chromatography*. Journal of Chromatography A **808**(1): 153-165.
- Menkhaus, T. J., S. U. Eriksson, et al. (2002). *Host selection as a downstream strategy: Polyelectrolyte precipitation of β -glucuronidase from plant extracts*. Biotechnology and Bioengineering **77**(2): 148-154.
- Miller, G. L. (1959). *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Analytical chemistry **31**(3): 426-428.

Moad, G., E. Rizzardo, et al. (2008). *Radical addition–fragmentation chemistry in polymer synthesis*. Polymer **49**(5): 1079-1131.

Mohan, P., D. Schols, et al. (1992). *Sulfonic acid polymers as a new class of human immunodeficiency virus inhibitors*. Antiviral research **18**(2): 139-150.

Montoya Barreto, S. *Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto grifola frondosa*, Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales.

Moo-Young, M., A. Moreira, et al. (1983). *Principles of solid-substrate fermentation*. The filamentous fungi **4**: 117-144.

Mussatto, S. I., C. N. Aguilar, et al. (2009a). *Colonization of Aspergillus japonicus on synthetic materials and application to the production of fructooligosaccharides*. Carbohydrate research **344**(6): 795-800.

Mussatto, S. I., C. N. Aguilar, et al. (2009b). *Fructooligosaccharides and β -fructofuranosidase production by Aspergillus japonicus immobilized on lignocellulosic materials*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **59**(1): 76-81.

Nath, S., C. S. Patrickios, et al. (1995). *Turbidimetric titration study of the interaction of proteins with acrylic polyampholytes*. Biotechnology progress **11**(1): 99-103.

Ngah, W. W., M. Hanafiah, et al. (2008). *Adsorption of humic acid from aqueous solutions on crosslinked chitosan–epichlorohydrin beads: kinetics and isotherm studies*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **65**(1): 18-24.

Nidetzky, B., W. Steiner, et al. (1994). *Cellulose hydrolysis by the cellulases from Trichoderma reesei: a new model for synergistic interaction*. Biochemical Journal **298**(3): 705-710.

Niu, L., S. Deng, et al. (2010). *Efficient removal of Cu (II), Pb (II), Cr (VI) and As (V) from aqueous solution using an aminated resin prepared by surface-initiated atom transfer radical polymerization*. Chemical engineering journal **165**(3): 751-757.

Orzua, M. C., S. I. Mussatto, et al. (2009). *Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation*. Industrial Crops and Products **30**(1): 24-27.

Pandey, A. (2003). *Solid-state fermentation*. Biochemical Engineering Journal **13**(2): 81-84.

Patrickios, C. S., L. R. Sharma, et al. (1999). *Precipitation of a Water-Soluble ABC Triblock Methacrylic Polyampholyte: Effects of time, pH, polymer concentration, salt type and concentration, and presence of a protein*. Langmuir **15**(5): 1613-1620.

Pawlak, A. and M. Mucha (2003). *Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends*. Thermochimica acta **396**(1): 153-166.

Pessoa Junior, A. and B. V. Kilikian (2005). *Purificação de produtos biotecnológicos*, Manole.

Plate, K., S. Beutel, et al. (2006). *Isolation of bovine lactoferrin, lactoperoxidase and enzymatically prepared lactoferricin from proteolytic digestion of bovine lactoferrin using adsorptive membrane chromatography*. Journal of Chromatography A **1117**(1): 81-86.

Ponce, T. and O. Pérez (2002). *Celulasas y xilanasas en la industria*. XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería **21**: 273.

Porfiri, M. C., B. M. Farruggia, et al. (2012). *Bioseparation of alpha-amylase by forming insoluble complexes with polyacrylate from a culture of Aspergillus oryzae grown in agricultural wastes*. Separation and purification technology **92**: 11-16.

Reinikainen, T., O. Teleman, et al. (1995). *Effects of pH and high ionic strength on the adsorption and activity of native and mutated cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **22**(4): 392-403.

Robledo, A., A. Aguilera-Carbó, et al. (2008). *Ellagic acid production by Aspergillus niger in solid state fermentation of pomegranate residues*. Journal of industrial microbiology & biotechnology **35**(6): 507-513.

Rodrigues, E. C., B. T. Bezerra, et al. (2013). *Adsorption of Cellulase Isolated from Aspergillus niger on Chitosan/Alginate Particles Functionalized with Epichlorohydrin*. Adsorption Science & Technology **31**(1): 17-34.

- Romanini, D., M. Braia, et al. (2007). *Interaction of lysozyme with negatively charged flexible chain polymers*. Journal of Chromatography B **857**(1): 25-31.
- Rouvinen, J., T. Bergfors, et al. (1990). *Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from Trichoderma reesei*. Science **249**(4967): 380-387.
- Rusu, A. G., M. I. Popa, et al. (2015). *Thermal behavior of hydrophobically modified hydrogels using TGA/FTIR/MS analysis technique*. Thermochimica acta **613**: 28-40.
- Saha, B. C. (2004). *Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of Mucor circinelloides*. Process Biochemistry **39**(12): 1871-1876.
- Sakurai, K., T. Maegawa, et al. (2000). *Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly (N-vinyl pyrrolidone) blends*. Polymer **41**(19): 7051-7056.
- Sankalia, M. G., R. C. Mashru, et al. (2007). *Reversed chitosan–alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: optimization and physicochemical characterization*. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics **65**(2): 215-232.
- Sano, T. and I. Murase (1980). *Cellulosic ion exchange fibers and method for preparing same*, Us Patents 4 200 735.
- Santomaso, A., P. Lazzaro, et al. (2003). *Powder flowability and density ratios: the impact of granules packing*. Chemical Engineering Science **58**(13): 2857-2874.

Sharma, R., Y. Chisti, et al. (2001). *Production, purification, characterization, and applications of lipases*. Biotechnology Advances **19**(8): 627-662.

Shi, C., Y. Zhu, et al. (2006). *Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine*. Journal of Surgical research **133**(2): 185-192.

Singhania, R. R., A. K. Patel, et al. (2009). *Recent advances in solid-state fermentation*. Biochemical Engineering Journal **44**(1): 13-18.

Sohail, M., R. Siddiqi, et al. (2009). *Cellulase production from Aspergillus niger MS82: effect of temperature and pH*. New Biotechnology **25**(6): 437-441.

Song, D. and D. Forciniti (2000). *Effects of cosolvents and pH on protein adsorption on polystyrene latex: a dynamic light scattering study*. Journal of colloid and interface science **221**(1): 25-37.

Sookkasem, A., S. Chatpun, et al. (2015). *Alginate beads for colon specific delivery of self-emulsifying curcumin*. Journal of Drug Delivery Science and Technology **29**: 159-166.

Spelzini, D., B. Farruggia, et al. (2005). *Features of the acid protease partition in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol–phosphate: chymosin and pepsin*. Journal of Chromatography B **821**(1): 60-66.

Spelzini, D., B. Farruggia, et al. (2011). *Purification of chymotrypsin from pancreas homogenate by adsorption onto non-soluble alginate beads*. *Process Biochemistry* **46**(3): 801-805.

Sreerama, N., S. Y. Venyaminov, et al. (2000). *Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis*. *Analytical biochemistry* **287**(2): 243-251.

Sreerama, N. and R. W. Woody (2000). *Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set*. *Analytical biochemistry* **287**(2): 252-260.

Steinbüchel, A. and S. K. Rhee (2005). *Polysaccharides and polyamides in the food industry: properties, production, and patents*. Wiley-VCH Verlag GmbH & CO. KGaA.

Sun, J. and L. Wu (2014). *Adsorption of protein onto double layer mixed matrix membranes*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **123**: 33-38.

Sun, X., Z. Liu, et al. (2008). *The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions*. *Enzyme and Microbial Technology* **42**(7): 560-567.

Team, R. C. (2015). *Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013. R: A language and environment for statistical computing*.

Teotia, S., S. Khare, et al. (2001). *An efficient purification process for sweet potato beta-amylase by affinity precipitation with alginate*. Enzyme and Microbial Technology **28**(9): 792-795.

Tirkistani, F. A. (1998). *Thermal analysis of some chitosan Schiff bases*. Polymer Degradation and Stability **60**(1): 67-70.

Tiss, A., F. Carrière, et al. (2001). *Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity*. Analytical biochemistry **294**(1): 36-43.

Torrez, G. P., O. Cárdenas, et al. (2010). *Biostoning of textiles by celullolitic enzyme produced by a fungal strain IB-105*. BIOFARBO **18**: 1.

Tsuboi, A., T. Izumi, et al. (1996). *Complexation of proteins with a strong polyanion in an aqueous salt-free system*. Langmuir **12**(26): 6295-6303.

Vandenberghe, L. P., C. R. Soccol, et al. (2000). *Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by Aspergillus niger*. Bioresource Technology **74**(2): 175-178.

Vieira, R. S. and M. M. Beppu (2006). *Dynamic and static adsorption and desorption of Hg (II) ions on chitosan membranes and spheres*. Water research **40**(8): 1726-1734.

Walker, L. and D. Wilson (1991). *Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview*. Bioresource Technology **36**(1): 3-14.

Wang, N., P. Zheng, et al. (2016). *The modification of carbon materials with carbon disulfide for the removal of Pb 2+*. Powder Technology **301**: 1-9.

Wang, Y. f., J. Y. Gao, et al. (1996). *Protein separation via polyelectrolyte coacervation: Selectivity and efficiency*. Biotechnology progress **12**(3): 356-362.

Weinbreck, F., R. De Vries, et al. (2003). *Complex coacervation of whey proteins and gum arabic*. Biomacromolecules **4**(2): 293-303.

Westereng, B., T. Ishida, et al. (2011). *The putative endoglucanase PcGH61D from Phanerochaete chrysosporium is a metal-dependent oxidative enzyme that cleaves cellulose*. PloS one **6**(11): e27807.

Wobbrock, J. O., L. Findlater, et al. (2011). *The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only anova procedures*. Proceedings of the SIGCHI Conference on Human Factors in Computing Systems, ACM.

Zaslavsky, B. Y. (1994). *Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications*. CRC Press.

Zhou, J., Y.-H. Wang, et al. (2008). *Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of Trichoderma viride T 100-14*. Bioresource Technology **99**(15): 6826-6833.