

## INMOVILIZACION DE LACTASA EN SÍLICAS CON POROSIDAD CONTROLADA

### Immobilization of lactase in silica with controlled porosity

#### RESUMEN

El uso de enzimas a nivel industrial es económicamente viable si éstos son estables bajo las condiciones del proceso y pueden ser reutilizados, lo cual puede lograrse mediante inmovilización en un soporte apropiado. Materiales inorgánicos porosos como las sílicas son buenos candidatos como soporte ya que presentan alta resistencia mecánica y térmica, facilitan el flujo y son biodegradables.

Se muestra la eficiencia de sílica con porosidad controlada como soporte para inmovilización de lactasa. Este material es sintetizado partiendo de fuente de sílica barata, en presencia de surfactante catiónico y acetato de etilo que permiten modular el tamaño de poro.

**PALABRAS CLAVES:** Inmovilización, lactasa, sílica mesoporosa

#### ABSTRACT

*The industrial use of enzymes is feasible only when these are stable under the process conditions and they can be used several times. The immobilization in an appropriate support can help to achieve those goals. Inorganic porous materials such as silica are good candidates as support since they present high mechanical and thermal resistance; high flow rates and they are biodegradable. We use silica with controlled mesoporosity for a efficient immobilization of lactase. This material is synthesized by using sodium silicate as a source of silica and cationic surfactant and ethyl acetate for modulating the pore size.*

**KEYWORDS:** Immobilization, lactase, mesoporous silica.

#### CLAUDIA BERNAL

Química  
Universidad de Antioquia  
Instituto de Química  
Grupo Ciencia de los Materiales  
claberz@gmail.com

#### BETTY L. LOPEZ

Ph. D Químicas  
Docente  
Universidad de Antioquia  
Instituto de Química  
Grupo Ciencia de los Materiales  
bettylope@gmail.com

#### MÓNICA MESA

Ph. D Ciencias Químicas  
Docente  
Universidad de Antioquia  
Instituto de Química  
Grupo Ciencia de los Materiales  
mmesacad@gmail.com

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso de enzimas muestra ventajas con respecto a la catálisis convencional debido a su alta especificidad, pero para su implementación a nivel industrial deben ser estables en un rango amplio de pH y temperatura y permitir su utilización durante varios ciclos o en procesos en continuo, condiciones que pueden cumplirse mediante su inmovilización en un soporte apropiado [1]. La lactasa es un enzima  $\beta$ -galactosidasa, proveniente de una gran variedad de fuentes animales, vegetales y microbianas, capaz de hidrolizar la lactosa o azúcar de la leche a glucosa y galactosa, azúcares con un mayor potencial de fermentación. Es interesante a nivel industrial especialmente para la preparación de leche y derivados deslactosados y para la bioconversión de la lactosa del suero lácteo hacia productos menos contaminantes, cuando estos residuos son vertidos al agua o hacia productos de interés para la nutrición animal y humana, materias primas y excipientes para la industria farmacéutica y en agricultura. Industrialmente la lactosa puede ser utilizada directamente (en su forma soluble) o inmovilizada. El uso del enzima libre es bastante costoso, pero cuando es inmovilizada en un soporte adecuado el biocatalizador resultante puede ser utilizado varias veces,

disminuyendo por lo tanto los costos y se puede simplificar el diseño de reactores.

Las  $\beta$ -galactosidasas se han inmovilizado mediante atrapamiento [2], adsorción en soportes porosos [3], interacción iónica [4], afinidad [5], formación de complejos con metales [6] o formación de enlaces covalentes [7], pero hasta que no se logre la obtención de un catalizador que muestre simultáneamente alta actividad, alta estabilidad o resistencia a la degradación, propiedades mecánicas óptimas (forma, tamaño, densidad y resistencia a la fricción, alta velocidad de flujo) la investigación en el diseño de soportes para este enzima seguirá abierta.

Soportes de bajo costo combinado con una alta capacidad de retener el enzima y conferirle estabilidad a largo plazo, son parámetros que definen la viabilidad del proceso de inmovilización en términos de costo y eficiencia. En este trabajo se muestra que sílicas con mesoporosidad controlada en el rango de tamaños de poros similar al diámetro promedio de la lactasa (~17,63nm x ~13,85nm) y alta área superficial, preparada a partir de una fuente de sílica que no es costosa, presentan mayor capacidad de retención que

otros soportes reportados en la literatura, dando lugar a catalizadores mas eficientes.

## 2. CONTENIDO

**1) Parte experimental.** La síntesis de los materiales se lleva a cabo mediante procedimiento reportado en la literatura [8] a 90°C durante 48 h con la siguiente composición molar

Muestra SSC (con silicato de sodio grado comercial)

$\text{Na}_2\text{SiO}_3$  : 0.28CTABr : 417  $\text{H}_2\text{O}$  : 5.5 acetato de etilo

Muestra SSR (con silicato de sodio grado reactivo 27% $\text{SiO}_2$  y 8%  $\text{Na}_2\text{O}$ )

$\text{Na}_2\text{SiO}_3$  : 1.7CTABr : 417  $\text{H}_2\text{O}$  : 5.5 acetato de etilo

Los materiales se calcinan a 550 °C para extraer el surfactante cetiltrimetilamonio CTABr durante 3h, con una rata de calentamiento igual a 1,5 °C/min desde 25 °C hasta la temperatura final.

### Proceso de Inmovilización

Se dispersan 0.5g de sílica calcinada en una buffer de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1M de pH 7.0. Se adicionan 3 ml de lactasa comercial (3000 U, Novozymes) y se somete a agitación orbital a 150 rpm durante 6 horas. Luego de este tiempo el material es filtrado y secado a temperatura ambiente por 24 horas.

El biocatalizador resultante es caracterizado mediante infrarrojo FTIR (Perkin Elmer) y termogravimetría TGA (TA Instrument Q500). La actividad enzimática se mide mediante análisis ultravioleta (UV carybio) tanto para el sobrenadante como para el biocatalizador preparado (luego de ser resuspendido en solución buffer). La unidad de actividad enzima se expresa como mM de glucosa/minuto de reacción/ g de biocatalizador)

## 2) Resultados y discusión

**Síntesis de los materiales.** El método de síntesis utilizado en este trabajo se seleccionó teniendo en cuenta que permitiera la obtención de sílica con las características de porosidad apropiadas para ser utilizada como soporte para la inmovilización del enzima lactasa en términos del diámetro de poro y área superficial. Tal como se observa en la figura 1, los materiales presentan porosidad estructural organizada y porosidad textural. La mesoestructura organizada, con tamaño de poro ~ 2 nm, es generada por presencia del surfactante catiónico que actúa como molde durante la policondensación de la sílica [9], mientras que los poros de mayor tamaño, se originan debido a la unión de poros estructurales mas pequeños, ya que la presencia de acetato de etilo conduce a la formación de dominios con paredes muy débiles o inestables [8]. El material SSC preparado con el silicato de sodio comercial muestra un tamaño promedio de poro mayor y una distribución de tamaños de poro texturales mas amplio comparado con el material SSR preparado con la fuente de sílica grado reactivo. Probablemente el

menor el menor porcentaje de  $\text{SiO}_2$  y el mayor grado de impurezas en el silicato de sodio comercial conduce a un menor grado de policondensación de las paredes de sílica facilitando su rompimiento en presencia del acetato de etilo. Ambos materiales pueden ser útiles para la inmovilización de lactasa ya que el tamaño de los poros mas grandes es mayor que el diámetro promedio de la lactasa.

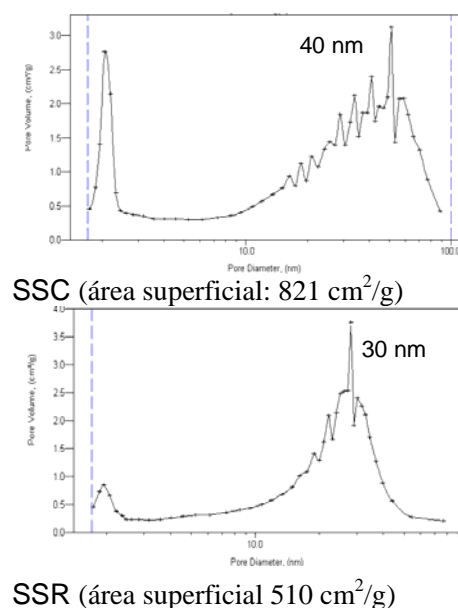


Figura 1. Distribución de tamaño de poro BJH para las muestras sintetizadas

### Efectividad del proceso de inmovilización

La capacidad del soporte para la inmovilización de lactasa se define en términos de la presencia y cantidad de material orgánico en la sílica y en función de la disminución de la actividad enzimática en el sobrenadante luego de 6 h del proceso de inmovilización.

En los espectros FTIR de los biocatalizadores sólidos secos (figura 2) se observan tres bandas que no aparecen en los espectros de la sílica antes del proceso de inmovilización: 2958  $\text{cm}^{-1}$  y 1456  $\text{cm}^{-1}$  (Extensiones C-H de grupos alifáticos) y 1541  $\text{cm}^{-1}$  (Extensión del grupo C-N de aminas de la proteína), lo cual indica presencia de material orgánico.

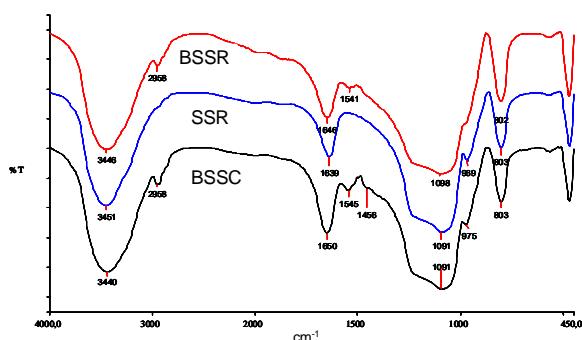


Figura 2. Espectros FTIR de la sílica antes (SSR) y después del proceso de inmovilización (BSSR y BSSC).

Debido a la intensidad y a la amplitud de las bandas características de las sílicas no es posible hacer más determinaciones por esta técnica.

La termogravimetría puede ser utilizada para cuantificar la cantidad de material orgánico inmovilizado ya que la lactasa es una proteína que se descompone alrededor de 152 °C y 272 °C, temperaturas en las cuales la sílica no presenta ningún cambio. En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos mediante TGA y de cinética enzimática del sobrenadante

Sílica	% total de material orgánico retenido	Actividad enzimática (mM/minuto/)
BSSC	24.843	0.158
BSSR	16.267	0.150

Tabla 1. Comparación de los resultados obtenidos a partir de TGA y cinética enzimática del sobrenadante para los biocatalizadores

La sílica SSC presenta una mayor capacidad de inmovilización que la sílica SSR, debido a su mayor área superficial. Sin embargo, debido a que la diferencia en actividad enzimática en el sobrenadante de cada una de estas muestras no es significativa, es muy probable que este ocurriendo una mayor desnaturalización del enzima inmovilizado en el soporte SSC, cuyos tamaños de poros son más grandes ofreciendo por lo tanto una menor protección contra agentes externos y facilitando la lixiviación. Aunque no es posible determinar cuantitativamente, con las técnicas utilizadas en este trabajo, la proporción de enzima desnaturalizada en función de las características de las sílicas mesoporosas utilizadas, con estos resultados preliminares y teniendo en cuenta la similitud del tamaño de poro del soporte con el diámetro del enzima se considera el material SSR como un mejor soporte que el SSC.

#### Cinética enzimática de los biocatalizador BSSC

Este biocatalizador retiene el  $42,0500 \pm 0,0378\%$  de la actividad del enzima libre. Esta disminución, que ya ha sido reportada para otras enzimas inmovilizadas [8],

puede deberse a desnaturalización del enzima durante el proceso de inmovilización o a las restricciones que puede ofrecer el soporte para la conformación del enzima o para la difusión de sustratos y/o productos hacia o desde el sitio activo durante la utilización del biocatalizador. Sin embargo es de resaltar que esta actividad es 10 veces mayor que la reportada para lactasa inmovilizada en otros materiales inorgánicos que poseen menor área superficial y una porosidad no controlada [10]

Luego de 5 ciclos de reutilización del biocatalizador BSSR, conserva un 47% de su actividad inicial, disminución que es explicada como resultado de la lixiviación del enzima a partir del soporte cuando es utilizada en forma repetida. Estos datos son corroborados por medio de análisis termogravimétricos pues después de cinco ciclos de reacción, la carga de material orgánico disminuye significativamente (15%).

### 3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Es posible obtener sílicas con mesoporosidad controlada, útiles para la inmovilización de lactasa a partir de una fuente barata de sílica como es el silicato de sodio, pero este debe ser grado reactivo ya que las impurezas en el comercial afectan la porosidad del material y pueden interferir en la inmovilización posterior.

El mejor soporte evaluado para la inmovilización de lactasa comercial es la sílica SSR, pues ésta tiene una distribución de tamaño de que se ajusta mejor al tamaño del enzima, facilitando por lo tanto su retención y la conservación de la actividad. Sin embargo es necesario mejorar la interacción sílica - enzima para evitar aún más la lixiviación, por ejemplo mediante modificación química de la superficie del soporte

### N. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Arroyo (1998), "Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39(2), pp. 23-39,
- [2] TG Park, AS Hoffmann (1993), "Thermal cycling effects on the bioreactor performances of immobilized b-galactosidase in temperature-sensitive hydrogel beads," *Enz Microb Technol* 15, pp.476-482.
- [3] K, Nakanishi, R. Matsuno, K. Torii, K. Yamamoto, T. Kamikubo, (1983) "Properties of immobilized b-D-galactosidase from *Bacillus circulans*," *Enz Microb Technol* 5(3), pp.115-20
- [4] MH, Heng, CE. Glatz (1994), "Ion exchange immobilization of charged b-galactosidase fusions for lactose hydrolysis", *Biotech Bioeng* 44, pp. 745-52.
- [5] JM. Sanchez-Puelles, JM. Sanz, JL. Garcia, E. Garcia, (1992). "Immobilization and single step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose," *Eur J Biochem*;203, pp.153-159

- [6] JF. Kennedy, JM. Cabral, MR. Kosseva, M. Peterson. (1997) "Transition metal methods for immobilization of enzymes and cells". In *Methods in Biotechnology*, 1, Immobilization of Enzymes and Cells. Ed: G. Bickerstaff. Humana Press (Totowa, New Jersey). pp. 345–59.
- [7] K. Ovsejivi, B. Brena, F. Batista–Viera, J. Carlsson. (1995) "Immobilization of galactosidase on thioisulfonate-agarose," *Enz Microb Technol* 17, pp.151– 156.
- [8] Y. Wang, F. Caruso, (2005), "Mesoporous Silica Spheres as Supports for Enzyme Immobilization and Encapsulation", *Chem. Mater.*, 17, pp. 953-961.
- [9] J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T. -W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, S. B. McCullen, J. B. Higgins, J. L. Shlenker, (1992), "A New Family of Mesoporous Molecular Sieves Prepared with Liquid Crystal Templates," *J. Am. Chem. Soc.* 114, pp. 10834-10844
- [10] M. Ladero. (2000), *Enzyme Microb Technol* 27, 583