



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
TÍTULO: BIOCATÁLISIS PARA EL
DESARROLLO DE LECHE SIN LACTOSA

Autor: María Caballero Sánchez

Fecha: Convocatoria Julio

Tutor: María Pilar Hoyos Vidal

ÍNDICE

1. RESUMEN Y ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1. Ventajas de las biotransformaciones.....	5
2.2. Inmovilización de enzimas	6
2.3. Química Sostenible	8
2.3.1. Principios de la Química Verde	8
3. OBJETIVOS	10
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
5.1. Leche deslactosada	10
5.1.1. Mecanismo de acción de la beta galactosidasa	11
5.1.2. Inmovilización en <i>Kluyveromyces spp</i>	13
5.1.3. Inmovilización en <i>Thermus sp.</i> – <i>Escherichia coli</i> ⁽⁴¹⁾	15
5.1.4. Técnica sin necesidad de inmovilización de la enzima ⁽⁴²⁾	16
6. CONCLUSIÓN	16
7. BIBLIOGRAFÍA	17

1. RESUMEN Y ABSTRACT

Resumen

La biocatálisis es considerada dentro de un sector relativamente nuevo con un gran capital en el campo de la Biotecnología debido al uso de un número muy variado de enzimas o células en una amplia gama de industrias, desde la farmacéutica, pasando por la alimentaria, hasta la producción de biocombustibles⁽¹⁾.

Se define biocatálisis como el proceso que aumenta la velocidad de una reacción debido al uso de enzimas. Este proceso dará lugar a diferentes tipos de compuestos, como son los enantiómeros puros, que se emplearán en la fabricación de medicamentos⁽²⁾⁽³⁾.

Es interesante desde el punto de vista económico y desde el punto de vista ecológico, pues además de efectuar una gran apuesta por lo que se denomina "Química Sostenible o Química Verde" tiene consecuencias en los costes de manufactura de los productos a los que afecta. La "Química Sostenible" contribuye por tanto al desarrollo de una forma ecológica de los fármacos, sin perjudicar los ecosistemas y, en consecuencia, a la fauna y flora que habitan en el planeta⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾.

En la búsqueda bibliográfica, se recurrieron a palabras clave como: "biocatálisis", "Química Verde", "Ecología", "económico", "medio ambiente", "beta-galactosidasa", "*Kluyveromuceslactis*" "*Thermus*"

Abstract

Biocatalysis is considered within a relatively new sector with great capital in the field of Biotechnology due to the use of a very varied number of enzymes or cells in a wide range of industries, from pharmaceuticals, going through foodstuffs, to biofuel production (1).

Biocatalysis is defined as the process that increases the speed of a reaction due to the use of enzymes. This process will give rise different types of compounds-for exemple enantiomeric compounds- that will later be used in medicine manufacturing (2) (3).

It is interesting from the economic point of view and from the ecological point of view, because apart from making a great commitment to what is called "Sustainable Chemistry or Green Chemistry" it has consequences on the manufacturing costs of the products it affects. Therefore, "Sustainable Chemistry" contributes to the development of an ecological form of drugs, without harming ecosystems and, consequently, the fauna and flora that inhabit the planet (4) (5) (6).

In the bibliographic search, key words such as: "biocatalysis", "Green Chemistry", "Ecology", "economic", "environment", "beta-galactosidase", "*Kluyveromuceslactis*" "*Thermus*" were used.

2. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia el ser humano ha utilizado microorganismos para la obtención de compuestos mediante la utilización de células enteras o de sus enzimas aisladas⁽⁷⁾.

La utilización de células o enzimas ha demostrado tener un gran potencial a la hora de la síntesis de productos procedentes de la industria farmacéutica o alimentaria, entre otras (Tabla 1) ⁽¹⁾⁽⁷⁾. Esto se debe a que la utilización de dichas enzimas va a promover una producción más eficiente y respetuosa con el medio ambiente que la producida por la química sintética tradicional. Se considera más ecológica porque las condiciones de reacción se producen en medios que son menos tóxicos con el medio ambiente- es lo que promueve el nuevo término de Química Verde- y bajo condiciones de temperatura y pH suaves, haciendo a su vez que estas reacciones sean más regio y estereoselectivas y con menor coste económico. Si se hiciesen en condiciones extremas, se podrían producir isomerizaciones, racemizaciones o transposiciones ⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾.

SECTOR SANITARIO-FARMACÉUTICO <ul style="list-style-type: none"> • Enzimas para diagnóstico • Enzimas de uso terapéutico • Síntesis de intermedios y compuestos químicos de interés farmacéutico 	SECTOR AGROALIMENTARIO <ul style="list-style-type: none"> • Aromas, edulcorantes y aditivos alimentarios • Aminoácidos y otras moléculas nutritivas • Enzimas para queserías y productos lácteos dietéticos (sin lactosa) • Insecticidas y herbicidas
SECTOR MEDIOAMBIENTAL <ul style="list-style-type: none"> • Biorremediación • Obtención de plásticos biodegradables • Biocombustibles 	PROCESOS INDUSTRIALES <ul style="list-style-type: none"> • Detergentes • Industria textil y peletera • Síntesis de compuestos químicos

Tabla 1. Aplicaciones de la Biotransformación en distintos sectores productivos⁽¹⁾⁽⁷⁾

La instauración de un proceso biocatalítico a nivel industrial va a conllevar una mejora en diversas etapas:(1) selección de la enzima más adecuada en función de la finalidad que se pretenda, (2) su producción y purificación, (3) caracterización, para ver a qué condiciones son las idóneas para llevar a cabo el **ciclo biocatalítico**, y (4) inmovilización de la enzima que conlleva una disminución del coste del proceso. Estas etapas se ven reflejadas en la Figura 1 ⁽¹⁾⁽⁷⁾.



Figura 1. Etapas en el escalado industrial de un proceso biocatalizado por enzimas.⁽¹⁾

Lo más importante del uso de estas enzimas es la síntesis de enantiómeros por las enzimas (Figura 2) ⁽¹⁰⁾. Esto va a presentar gran importancia toda vez que, al unirse solamente a un receptor de forma selectiva, impedirá que se una a otros y, en consecuencia, provocando una menor cantidad de reacciones adversas.

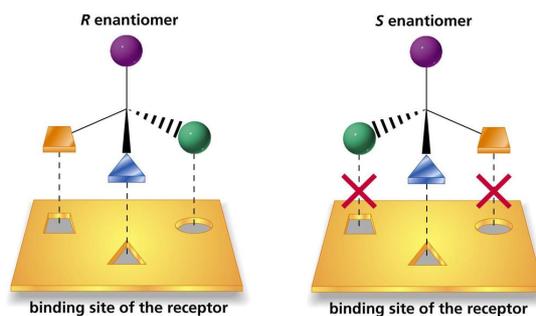


Figura 2. Unión de los diferentes enantiómeros al receptor ⁽¹¹⁾

La posibilidad de obtener enzimas que presenten elevada especificidad se puede llevar a cabo gracias a la biocatálisis, que va a dar lugar a compuestos enantiopuros – *se va a formar en mayor proporción uno de los dos enantiómeros*-. Estos compuestos se van a poder producir por distintos métodos, ya sean químicos, biocatalíticos o pudiendo ser llevados a cabo por microorganismos. Gracias a los avances en ingeniería genética se ha podido modificar el genoma de dichos microorganismos facilitando así la producción de una mayor cantidad de enzima disponible para poder aplicarlo en una gran variedad de industrias ⁽⁹⁾.

2.1. Ventajas de las biotransformaciones

Dentro de los procesos de biotransformación y por lo que a sus ventajas se refiere, han de destacarse ⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾:

- Las enzimas son catalizadores muy eficientes, que van a hacer que la velocidad de la reacción se vea incrementada. Se van a usar a concentraciones muy bajas. Dichas enzimas suelen proceder de microorganismos, como son las bacterias, levaduras u hongos.
- Dichas enzimas no van a producir contaminación medioambiental. Las enzimas son proteínas, es decir, unidades estructurales que pueden ser biodegradadas. Por ello, se denominan catalizadores biodegradables. Además, hay que tener en cuenta que dado que las condiciones de trabajo son suaves, éstas van a implicar un menor consumo energético y por tanto una menor emisión de gases contaminantes.
- Las enzimas trabajan en condiciones suaves de pH, temperatura y presión. Generalmente, las enzimas funcionan a temperatura ambiente, presión atmosférica y pH neutro o cercano a éste.

También presentan actividad en medio acuoso por lo que en muchas ocasiones se escogerá el agua como disolvente (recomendable puesto que es barato y no contaminante).

De la misma manera, se han podido llevar a cabo reacciones con disolventes orgánicos, predominando en tales casos, algunas transformaciones.

- Las enzimas, como se ha justificado anteriormente, son específicas, lo que va a hacer que no se produzcan reacciones secundarias.

- La biocatálisis se va a encargar de dar lugar a un único enantiómero, lo que supone una gran ventaja porque los compuestos así obtenidos presentan una mayor pureza.
- En las reacciones químicas, por lo general, han de aportarse grupos de activación, protección o desprotección para que la reacción se vea favorecida. La ventaja en este caso, observable en la introducción de dichos grupos, va a ser la reducción de los pasos necesarios para la síntesis –debido a la elevada selectividad-, lo que va a conllevar un menor número de subproductos y menor cantidad de reacciones adversas.

No obstante, a pesar de tener las tres ventajas antedichas, ha de ponerse de manifiesto que estos compuestos no se utilizan en todas las reacciones porque presentan a su vez limitaciones de gran importancia, a saber ⁽⁷⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾:

- Reducida estabilidad, debido a que son proteínas y éstas se pueden desnaturalizar al aumentar la temperatura y con ello, perder toda la actividad enzimática que, en cada caso, les es propia.
- La dificultad que conlleva la separación de dichas enzimas de los sustratos que presentan lo cual impide la reutilización de las enzimas.

2.2. **Inmovilización de enzimas**

Para poder elaborar a nivel industrial un proceso enzimático ha de tenerse en cuenta, en particular, una de las limitaciones citadas y que no es otra que su alto grado de inestabilidad. Para ello se producirán diversas reacciones con el fin de minorar dicho inconveniente, dotándole de una mayor estabilidad, facilitando así el paso de la fabricación a pequeña escala a una fabricación industrial.

Para poder llevar a cabo este proceso es necesario que se realice de una forma sencilla, eficaz y sobre todo lo más económica posible, pudiendo destacar en este aspecto la producción de una enzima extracelular a partir de un medio de cultivo.

Para poder realizar la estabilización de enzimas en las condiciones en que se efectúan los procesos a nivel industrial es necesario utilizar **la inmovilización de las enzimas**, otorgando así un aumento de la estabilidad de nuestra enzima. Es el proceso de mayor relevancia ⁽¹⁶⁾.

Por otro lado, otra de las técnicas que se llevan a cabo es la **ingeniería molecular** que, gracias a mutaciones, las enzimas sean más resistentes a los medios de reacción ⁽¹⁶⁾.

Por tanto, puede decirse que la inmovilización de enzimas no sólo ha conseguido disminuir considerablemente los inconvenientes descritos anteriormente, sino que ha permitido que muchos de los procesos industriales biocatalizados que antes suponían un gran desembolso de dinero, sean rentables económicamente para la industria farmacéutica y alimentaria, entre otras ⁽¹⁶⁾.

Entre los métodos de inmovilización destaca, por un lado, la **retención física**, dentro de la cual se encuentra el atrapamiento de enzimas y la inclusión de membranas (figura 3) ⁽⁶⁾⁽¹⁵⁾, y por otro, la **unión química** que abarca tanto la unión de enzimas a soportes como el reticulado (figura 4) ⁽⁶⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁷⁾.

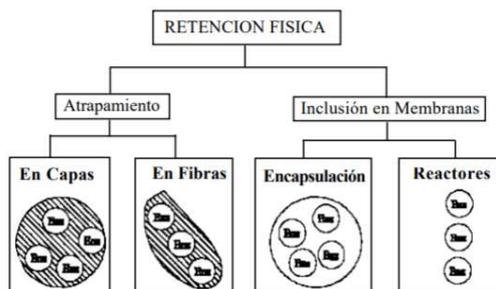


Figura 3. Métodos de inmovilización mediante retención física ⁽¹⁵⁾

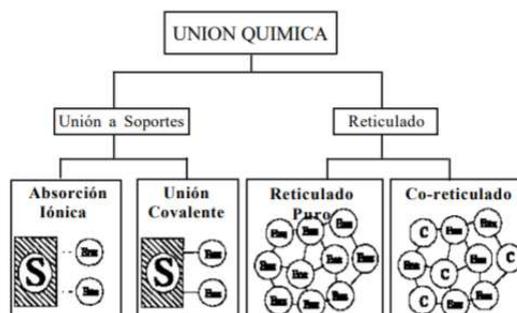


Figura 4. Métodos de inmovilización mediante unión química ⁽¹⁵⁾.

De todas las formas de inmovilización existentes, se va a profundizar en las dos categorías principales ⁽¹⁵⁾⁽¹⁷⁾:

- **Unión a soporte.** Es el método más utilizado dentro de la retención química. Este proceso se puede llevar a cabo industrialmente siempre y cuando su coste no sea muy elevado. Los enlaces más fuertes son los covalentes que, por un lado, presentarán la ventaja de estabilidad pero, por otro, presenta la desventaja que, al tener una unión tan estable, en el supuesto de que la enzima sea inactivada, el proceso requerirá de un aporte energético mayor y, en consecuencia, de un incremento del coste económico en el mismo sentido. En esta categoría la enzima queda retenida –adsorbida- en la superficie del soporte.
- **Atrapamiento del enzima.** Es un método de retención física. El atrapamiento de la enzima consiste en la retención de ésta en el interior de la matriz compuesta por poros. Esta matriz se va a formar una vez se ha producido el contacto con la enzima, haciendo que ésta se quede en el interior de dicha matriz y no en la superficie. Dicho atrapamiento se realiza en una red polimérica, pudiendo ser orgánica o inorgánica. El proceso es relativamente sencillo y requiere una pequeña cantidad de enzima lo que contribuye a que el proceso sea más económico. La enzima utilizada mantiene durante todo el proceso su estructura tridimensional (no se llevan a cabo condiciones que den lugar a un proceso de desnaturalización de la enzima) pudiendo citarse, como ejemplos de matriz, la de alginato o la de colágeno.

Si se siguiesen utilizando los métodos convencionales de síntesis, no solo habría un aumento en el gasto sino también de los problemas que los residuos de las industrias generan en el medio ambiente.

Se pueden recoger en la tabla siguiente las ventajas e inconvenientes que presenta la inmovilización de enzimas:

Ventajas	Desventajas
Reutilización del catalizador	Pérdida o reducción de actividad
Mayor facilidad de operación del reactor	Limitación difusional
Mayor facilidad para separar el producto	Costo adicional
Elección más amplia del reactor	

Tabla 2. Ventajas e inconvenientes de los sistemas de enzimas inmovilizadas ⁽¹⁸⁾.

2.3. Química Sostenible

Las consecuencias medioambientales derivadas de la utilización de métodos convencionales en la industria farmacéutica, la industria alimentaria y otras industrias, dio lugar al nacimiento, en los años noventa, de un nuevo concepto – Química Verde o Química Sostenible- que fue definido por la EPA (*Environmental Protection Agency*) de EEUU.

Así, la Química Sostenible es una vertiente de la ciencia que presenta elevado potencial en todos los ámbitos de la química, que permite reducir el número de etapas del proceso químico y como consecuencia disminuir la contaminación ambiental. Se define la Química Sostenible como una herramienta de vital importancia para la protección del medio ambiente que surge como consecuencia de la contaminación producida por la industria química, siendo expresada por medio de 12 principios descritos por Paul Anastas y John Warner en 1998 ^{(19) (20)}.

Ahora bien, este nuevo concepto es eficaz con relación al medio ambiente en el supuesto en el que la industria acatara tales principios, circunstancia ésta que ha tenido lugar a tenor de los datos arrojados en diversos estudios relativos a otros tantos países donde han aflorado, no sólo las reflexiones éticas sino, y probablemente ésta sea la razón de su éxito, también un mejor balance económico en la industria.

El pensamiento y la reflexión de estos dos científicos se puede resumir en tres apartados: prevención de la causa de riesgo, metodologías químicas y acción de acuerdo con un diseño ⁽⁴⁾⁽²¹⁾⁽²²⁾⁽²³⁾.

2.3.1. Principios de la Química Verde

La Química Sostenible, como se ha dicho, sigue doce principios fundamentalmente ⁽⁴⁾⁽¹⁹⁾⁽²¹⁾⁽²²⁾⁽²³⁾.

1. Es mejor prevenir la formación de residuos que tratar de eliminarlos tras su formación.
2. **Eficiencia o economía atómica.** Los métodos sintéticos deben ser diseñados para conseguir la máxima incorporación en el producto final de todas las materias usadas en el proceso. Así, con la mejora de la economía

atómica puede suponer un cambio en la clase de reacción, evitando que se generen subproductos.

3. Se deben diseñar métodos y reacciones sintéticas para el uso y la generación de sustancias con una menor toxicidad humana y ambiental.
4. Se deben elaborar productos químicos que presenten baja toxicidad, siendo eficaces a la hora de la realización de su función.
5. En una reacción química, la cantidad de principio o sustancia activa va a ir en menor proporción, siendo el disolvente y las sustancias auxiliares las que van a conllevar un mayor porcentaje. Por eso, se ha de tener claro y estar seguros que todos los compuestos que conforman la mayor parte sean inocuos. Además, al estar en mayor proporción, va a provocar un aumento tanto del gasto económico como del impacto medioambiental que produce.
6. Las necesidades energéticas a la hora de realizar un proceso químico deben ser disminuidas al máximo para evitar que cualquier enzima o proceso sufran reacciones que propicien la desnaturalización y la desactivación. Lo ideal es que los métodos sintéticos se lleven a cabo a una temperatura y una presión ambiental. Esto va a reducir el impacto sobre el medioambiente.
7. Todos los reactivos deben ser renovables y no extinguidos en la medida que sea posible.
8. La formación de derivados o de subproductos debe ser evitada en cuanto sea posible. La selectividad es inversamente proporcional al tiempo que dura la reacción (es decir, a la diferencia entre las energías de activación), porque las diferencias son mayores cuanto más baja son las temperaturas y más suaves son los reactivos.
9. Las cantidades de los reactivos catalíticos deben ser superiores a las de los estequiométricos.
10. Los productos elaborados deben ser biodegradables, es decir, que una vez su función haya terminado, no deben permanecer en el ambiente sino que estos deben fragmentarse en distintas partículas inertes para el medio ambiente.
11. Se deben elaborar métodos analíticos para evitar el impacto nocivo en el medio ambiente. Lo ideal sería la monitorización de la reacción a medida que tiene lugar para observar si se producen los compuestos nocivos o no.
12. Seleccionar aquellas sustancias que sean seguras para poder evitar al máximo en la medida de lo posible la posibilidad de accidentes.

Este trabajo tiene como propósito la obtención de conocimientos acerca de la biocatálisis y la Química Verde, viendo, además las diversas ventajas e inconvenientes que plantea.

Además, cabe recalcar el importante papel que, a día de hoy, está adquiriendo la biocatálisis, especialmente en la Industria Farmacéutica y en la Industria Alimentaria.

De esta forma, se llevará a cabo la síntesis de productos de utilidad terapéutica de una forma más sencilla, repercutiendo así en un ahorro económico para la Industria y, por ende, en los consumidores.

Es por esto que el ahorro puede provenir de diferentes partes de la ruta de síntesis, pero que este ahorro suponga, además, sostenibilidad y respeto por el medio ambiente, es algo que lo hace aún más atractivo. Por tanto, el primer objetivo será demostrar este hecho. La biocatálisis es utilizada para la preparación de una gran diversidad de compuestos, tanto en el ámbito farmacéutico como en el alimentario, desde β -lactámicos, hasta hidrolasas, proteasas o lipasas, así como para la producción de alimentos de elevada importancia para personas con intolerancias.

3. OBJETIVOS

El objetivo de esta revisión bibliográfica es el conocimiento de los rasgos básicos y fundamentales de la biocatálisis para la síntesis de sustancias, acompañada de una simplificación de los procesos para su obtención, de un ahorro económico y de un incremento en la sostenibilidad de dicho proceso.

Este trabajo pretende poner de manifiesto la importancia que presenta el uso de enzimas, en este caso, la enzima beta- galactosidasa en la industria alimentaria y cómo repercute a un sector de la población que presenta un déficit de dicha enzima, así como sus métodos particulares de inmovilización.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda bibliográfica, gracias a la cual se ha adquirido toda la información que se reflejará en el trabajo. Esta información procede de diversos medios a través de internet, como son libros de texto, páginas web o bases de datos científicas como *Pubmed*, *ScienceDirect*, Elsevier, Google Académico, así como artículos científicos, tesis doctorales y en toda la bibliografía expuesta al final de este trabajo.

Para ello, se comenzó por un estudio acerca de la Química Verde y la Biocatálisis para posteriormente centrarse en la influencia que esto presenta a nivel industrial, ya sea farmacéutica, alimentaria u de otro sector.

Una vez conocido el fundamento y funcionamiento de esta nueva forma para el desarrollo de fármacos o alimentos de gran uso en la sociedad, este trabajo se centra en el uso de la beta-galactosidasa y, en concreto, en la producción de alimentos para personas que presentan intolerancia a la lactosa.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. *Leche deslactosada*

La leche es un alimento que presenta una elevada cantidad y variabilidad de compuestos, caracterizándose por ser un alimento completo. La mayor parte de su composición está formada por lactosa (combinación de D-glucosa y D-galactosa). A pesar de esto, es importante recalcar que el número de microorganismos fermentadores es limitado. Esta hidrólisis puede ser llevada a cabo por un tratamiento ácido o enzimático ⁽²⁴⁾.

En condiciones normales, la lactosa es hidrolizada por la lactasa (es un tipo de beta-galactosidasa) en las vellosidades intestinales del duodeno distal y yeyuno proximal, por lo que esta enzima resulta de gran utilidad para la elaboración de productos sin lactosa. Por otra parte, de la beta-galactosidasa se conoce una gran cantidad de información tanto de su mecanismo como de aspectos esenciales para su cultivo como son temperatura, pH, recuperación de la enzima...⁽²⁵⁾.

El problema de la intolerancia a la lactosa se presenta cuando, tras el periodo de lactancia, se produce una disminución significativa de la enzima lactasa, haciendo que dichas personas presenten lo que se conoce como intolerancia a la lactosa. Tal intolerancia deviene de la falta de dicha enzima, lo cual provoca una malabsorción de lactosa (no está hidrolizada) y que este azúcar llegue al colon donde, debido a las bacterias presentes, se generen síntomas clínicos característicos como gases, hinchazón o diarrea. Consecuencia de lo anterior es la tendencia de esa parte de la población a eliminar este alimento indispensable y completo de su dieta, ahora bien, la lactosa no solo se encuentra en productos lácteos sino que también se puede localizar como aditivo alimentario en la industria, por lo que es conveniente fijarse en la composición de los distintos alimentos en el caso de que se sufra este trastorno^{(25) (26)}.

Las intolerancias a la lactosa se pueden clasificar según su etiología:

- La mayor parte de las personas que presentan este cuadro clínico es debido a una causa genética. Sin embargo, los adultos que lo presentan suelen conservar entre un 10-30% la actividad de la enzima⁽²⁶⁾.
- Por otro lado, se encuentran aquellas personas que presentan déficit de la enzima pero que éste no es debido a una alteración genética sino que se produce por un daño intestinal. Esto quiere decir que este déficit se va a producir de forma temporal y de manera reversible⁽²⁶⁾.

La hidrólisis de dicho disacárido –lactosa- traerá como consecuencia la obtención de dos monosacáridos potencialmente más reactivos, la D-glucosa y la D-galactosa. Al ser más reactivos, esto conllevará que sean más susceptibles al deterioro si lo comparamos con una leche entera⁽²⁷⁾. El aumento de la producción y de la investigación en estos productos es debido a la elevada demanda que conllevan y, a su vez, porque hay personas que aunque no se les haya diagnosticado el trastorno como tal, les facilita una posterior digestión⁽²⁷⁾.

Como se viene diciendo a lo largo del trabajo, la biocatálisis trata de realizar procesos industriales de una forma ecológica y sobre todo económica, por lo que es necesario reutilizar la enzima por medio de su inmovilización – se ha visto los tipos de inmovilización enzimática que se utilizan hoy en día en la industria-.

5.1.1. Mecanismo de acción de la beta galactosidasa

La beta-galactosidasa o lactasa tiene un papel fundamental en esta patología, debido a que cataliza la reacción hidrólisis de la lactosa, transfiriendo la galactosa a un compuesto que presente un grupo hidroxilo (Figura 5).⁽²⁸⁾

La reacción catalizada se desarrolla en dos pasos fundamentales:

1. Se forma un complejo galactósido-enzima, produciéndose la liberación de glucosa sin gasto de energía, es decir, es espontánea.
2. El complejo galactósido enzima es transferido a un aceptor nucleofílico, pudiendo ser éste el agua u otro sacárido. Independientemente del camino que se siga, el fin va a ser tener libre la enzima para que ésta pueda reaccionar con la lactosa (se recuerda que está formado por glucosa y galactosa) y la disocie.

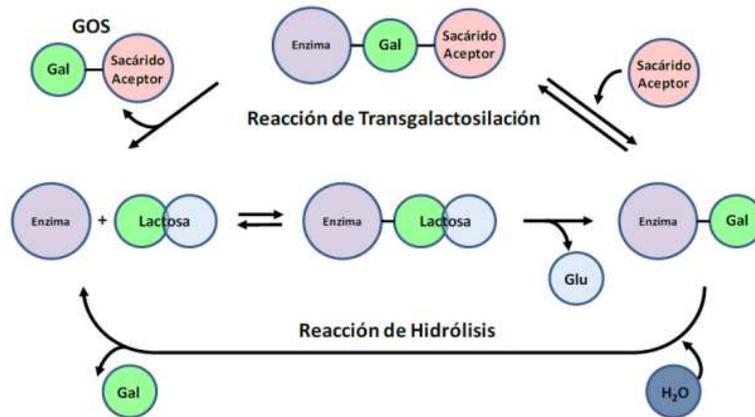


Figura 5. Mecanismo de reacción para la hidrólisis de lactosa por la beta-galactosidasa ^{(28) (29)}

Como se puede observar en la figura 5, uno de los factores influyentes en la reacción va a ser la concentración de lactosa. Cuanto menor es la cantidad de lactosa y más la de agua, predominará entonces la reacción de hidrólisis gracias a la enzima beta-galactosidasa ⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾.

La beta galactosidasa puede obtenerse de diversos seres vivos, ya sean integrantes de la flora como de fauna. Esta enzima se va a encargar de hidrolizar los enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$ glicosídicos que se pueden encontrar en los residuos de lactosa. ⁽³⁰⁾

La reacción química que cataliza la beta-galactosidasa se representa a continuación (Figura 6) ⁽³¹⁾:

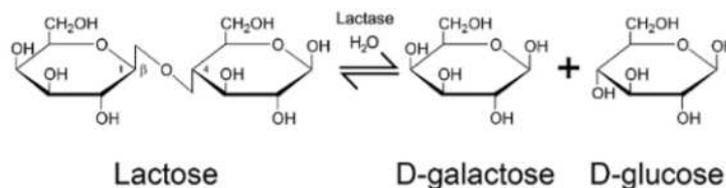


Figura 6. Mecanismo de hidrólisis de la lactosa por la beta galactosidasa ⁽³¹⁾

Esta reacción puede ser catalizada por distintos microorganismos pero la utilización de todos ellos no proporciona seguridad por presentar diferentes efectos adversos. Así, algunos microorganismos muy conocidos que pudieran ser utilizados en la industria alimentaria y que contienen la enzima beta-galactosidasa, tal es el caso de

Escherichia coli, presentan además de un elevado coste, contraindicaciones por su gran toxicidad.

Por ello se suelen utilizar otros microorganismos como *Aspergillus spp.* (hongo) y *Kluyveromyces spp.* (levadura), este último explicado en este trabajo debido a que se ha establecido un uso seguro como fuente de la enzima en cuestión ⁽²⁴⁾ (Tabla 3)⁽²⁸⁾.

Bacterias	Hongos	Levaduras	Plantas	Órganos de animales
<i>Bacillus megaterium</i>				
<i>Clostridium acetobutylicum</i>				
<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus foetidus</i>	<i>Bullera singularis</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Kluyveromyces bulgaricus</i>	Albaricoque	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Almendra	Cerebro
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Auerobasidium pullulans</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Fruto de café	Intestinos
<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Melocotón	Tejido de la piel
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	<i>Penicillium canescens</i>	<i>Saccharomyces ananensis</i>	Semillas de Alfalfa	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Saccharomyces fragilis</i>		
<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Streptomyces violaceus</i>	<i>Saccharomyces lactis</i>		
<i>Streptococcus thermophilus</i>				
<i>Thermus aquaticus</i>				

Tabla 3. Fuentes de beta-galactosidasa [Panesar et al. 2010]⁽²⁸⁾

El elevado precio de la enzima implica la necesidad de su reutilización con el fin de disminuir el coste y con ello, simplificar el proceso de fabricación. Para llevar a cabo este proceso, es necesario inmovilizar la enzima tal y como se ha visto en otros puntos.

5.1.2. Inmovilización en *Kluyveromyces spp*

Como ya se vio, la inmovilización de enzimas se puede definir como la localización de la enzima en una región específica del espacio denominada soporte, evitando su disolución y provocando así un aumento en el rendimiento de la reacción. Este proceso conlleva además un aumento en la estabilidad y por tanto, en su reutilización, pues va a dar lugar a formas insolubles de la enzima que van a retener su actividad catalítica, propiciando su repetida utilización y, en consecuencia, disminuyendo así el coste del proceso ⁽¹⁸⁾⁽³²⁾.

Como es lógico pensar, este mecanismo presenta algún que otro inconveniente pero, puede decirse que los aspectos positivos superan en gran medida a los negativos (pérdida de actividad, alteración de la conformación, heterogeneidad en el sistema soporte-enzima...) ⁽³¹⁾. El soporte y el método de inmovilización son dos aspectos que hay que tener en cuenta porque van a afectar a la función de la enzima. El escoger un método u otro resulta difícil a la hora de valorar qué método será de mayor conveniencia para el estudio ⁽²⁵⁾.

Las beta-galactosidasas se han inmovilizado por distintos procesos dentro de los que se puede destacar el atrapamiento, adsorción en soportes porosos o formación de enlaces covalentes o de complejos con metales ⁽³³⁾.

La forma de inmovilización más estudiada es un soporte mesoporoso a base de materiales de óxido de silicio, en el que se incorpora el compuesto dentro de soporte. La formación de estos materiales mesoporosos puede darse gracias a un proceso de auto-ensamblaje de tipo inorgánico-orgánico en la que el **precursor** – formado por un tensioactivo y un compuesto inorgánico- es hidrolizado para la

generación de una plantilla autoensamblada. Una vez terminada la reacción, debe someterse a un proceso hidrotérmico para que se defina el diámetro de poro. El tensioactivo se elimina por calcinación, dando lugar a un material mesoporoso.

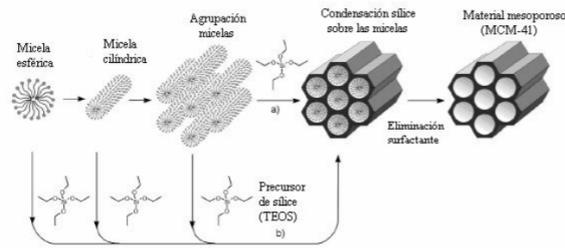


Figura 7. Formación de materiales mesoporosos ⁽³⁴⁾

El óxido de silicio es un material muy útil debido a que presenta una gran área superficial con poros de diversos tamaños, estructura y volumen. Presentan elevada resistencia mecánica y térmica, así como una gran utilidad como soportes. La enzima inmovilizada pueden tener distintos orígenes pero fundamentalmente se obtienen de *Aspergillus spp.* y *Kluveromyces spp.* (Tabla 3) ⁽³³⁾ ⁽³⁴⁾.

El uso de enzimas como catalizadores ha hecho que a pesar de todos los aspectos positivos que presentan, su uso se haya visto disminuido debido a su elevada solubilidad en agua. Todos los factores que afecten directa o indirectamente a la enzima van a ser de vital importancia a la hora de ver si es útil o no la inmovilización. Un ejemplo de esto puede ser debido a que el soporte presente un tamaño de poro muy elevado, que conlleva a que muchas enzimas puedan agruparse y con ello perder actividad ⁽³⁴⁾.

Una serie de experimentos han determinado que el pH óptimo para que se produzca la inmovilización es de cinco. En este caso, el soporte silíceo se encontrará ionizado negativamente debido a que su punto isoeléctrico es alrededor de dos, mientras que la enzima escogida, al presentar un punto isoeléctrico más elevado, se encuentra con carga positiva. El hecho de que presenten cargas opuestas va a facilitar la interacción entre el soporte y la enzima. ⁽³⁴⁾

Evaluación del proceso de inmovilización en soporte mesoporoso

Una vez se ha utilizado el soporte mesoporoso y se ha llevado a cabo el proceso de inmovilización, es necesario comprobar su eficacia. Por tanto, después de la inmovilización se va a llevar a cabo un análisis en el sentido de comprobar la cantidad de enzima unida al soporte y aquella que, por contra, va a continuar libre.

Así, la cantidad unida al soporte supondrá un cambio conformacional o ruptura de las cadenas polipeptídicas, dando lugar a una disminución de la actividad enzimática (esto es uno de los inconvenientes que se ha comentado anteriormente), aunque ésta disminución de la actividad se va a ver compensada por la reutilización de dicha enzima.

Todos estos cambios pueden venir por las condiciones de la reacción, por el bloqueo de los sitios activos por parte de los inhibidores o formación de agregados, etc ⁽³⁵⁾.

Igualmente, se lleva a cabo una caracterización fisicoquímica, donde, dentro de esta diferenciación se distingue entre el análisis Termogravimétrico (TGA) ⁽³⁶⁾, la Difracción de Rayos X (DRX) ⁽³⁷⁾, el Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) ⁽³⁸⁾ y la Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) ^{(39) (40)}.

Con todo esto se hace posible la inmovilización de la enzima y la evaluación del proceso. Es importante ver el balance tanto energético como económico de la reacción, así como la repercusión que ésta puede tener en el medio ambiente. Este mecanismo está en pleno auge y es por ello que es necesario que todos los métodos utilizados estén en constante evolución, para proporcionar una mejor calidad a los consumidores y un menor impacto medioambiental.

5.1.3. Inmovilización en *Thermus sp.* – *Escherichia coli* ⁽⁴¹⁾

En esta técnica de inmovilización se intentó producir la beta-galactosidasa de *Thermus sp.* (Cepa 2) para posteriormente purificarla e inmovilizarla en un soporte denominado IMAC (“*Ion metal affinity chromatography*”). Una fuente interesante de esta enzima está presente en los organismos termofílicos.

Es por ello, que esta cepa, por sus características microbiológicas se puede encontrar dentro de los microorganismos extremófilos, exigentes nutricionalmente y de crecimiento lento, por lo que es necesario que se cultive a unas temperaturas muy altas (alrededor de los 70°C) y en unos medios de cultivo selectivos.

Por todos los impedimentos que presenta, se decidió utilizar otro microorganismo siendo éste *Escherichia coli*, siendo capaz de eliminar los inconvenientes que impedían el uso del género *Thermus*.

Se pueden realizar dos tipos de inmovilización: covalentes, que se llevan a cabo sobre resinas epoxiacrílicas o reversibles que se realizan sobre soportes activados con polietilenimina, que también dan lugar a una inmovilización fuerte de la enzima.

En cuanto a la **inmovilización irreversible**, destacan los soportes IMAC de los que se ha hablado al principio, y que presentan numerosos grupos quelato. Se va a llevar a cabo una adición de colas de poli-histidina a la enzima, haciendo que se produzca una adsorción selectiva de las proteínas diana. Esta adsorción selectiva de proteínas diana se va a originar haciendo una modificación en dicho soporte – pues las proteínas naturales tienen que establecer numerosas interacciones entre la histidina y los quelatos, aspecto que en el caso de las proteínas diana sólo necesitan una interacción-.

Por otro lado, la mayor adsorción de la beta galactosidasa se produce utilizando el Cu como metal (es una interacción muy selectiva), pero, a pesar de ser tan selectiva, el soporte provocaba una inactivación de la enzima. Por ello, se cambia a un metal que evitase esta desventaja, como el níquel (Ni) o el cobalto (Co). La unión de la cola de histidina a uno de los dos metales va a dar lugar a la unión de la enzima a un soporte de forma irreversible.

La **inmovilización reversible** se basa en la unión -a través de la adsorción de la enzima a un soporte- muy fuerte, pero, esta unión no va a influir en la estabilidad que la enzima presenta. Una vez la enzima se ha inactivado, ésta se puede desorberse del soporte, quedando libre.

5.1.4. Técnica sin necesidad de inmovilización de la enzima ⁽⁴²⁾

A pesar de que la inmovilización enzimática presenta una gran cantidad de ventajas, la tecnología más utilizada actualmente es la inclusión de la enzima soluble justo en el momento anterior al empaquetamiento de dicha leche para que durante el tiempo que se encuentre dentro del envase, sea capaz de realizar su función.

6. CONCLUSIÓN

La biocatálisis es una de las herramientas que más se está desarrollando en los últimos años. Es un proceso de gran interés industrial, tanto a nivel farmacológico como alimentario. Ofrece las herramientas necesarias para la producción de alimentos o fármacos de una forma más sostenible y eficiente. De esta manera, se va a incrementar el rendimiento de las enzimas utilizadas.

La biocatálisis surge como una innovación de la síntesis química convencional, la cual no tenía principios que tuviesen en cuenta la repercusión de dicho proceso. Además, emerge en los años noventa por medio de la EPA, la Química Verde como mecanismo para combatir la contaminación ambiental, promovida por los doce principios descritos por Paul Anastas y John Warner.

Gracias a la elevada especificidad y selectividad de las enzimas y al actuar sobre un único receptor se generan menos efectos adversos en el paciente y, con ello, una disminución en la liberación de productos tóxicos al medio ambiente.

Asimismo, este proceso biocatalítico va a hacer que la reacción se desarrolle en condiciones que sean menos perjudiciales para el medio ambiente y que el coste del proceso sea inferior debido a la reutilización de las enzimas (son enzimas que tienen elevado precio). Debido a lo expuesto anteriormente se ve a la biocatálisis como un proceso de gran rentabilidad industrial, a todos los niveles.

La intolerancia a la lactosa es un trastorno que padece una parte importante de la población y es debido a un déficit en la enzima beta-galactosidasa. Sus causas pueden radicarse bien en circunstancias de tipo genético, bien como consecuencia de un trastorno puntual.

El uso de la biocatálisis para el desarrollo de alimentos deslactosados es una iniciativa que se encuentra en pleno auge debido a la gran demanda de estos productos. Así, cada vez son más los consumidores que recurren a este tipo de alimentos porque además de presentar la misma composición nutricional al no tener lactosa dentro de sus componentes (sino que contienen una combinación de glucosa y galactosa) se facilita su digestión.

Para reutilizar la enzima es necesario inmovilizarla, permitiendo su reutilización porque va a dar lugar a una enzima que no sea soluble en agua. Asimismo se va a aumentar la estabilidad de ésta. Al utilizar varias veces la enzima, el coste total del trabajo va a ser más bajo y, como consecuencia, va a haber una mayor accesibilidad por parte de la población.

Al ser una minoría las personas que han de consumir obligatoriamente estos alimentos, éstos producen a menor escala a nivel industrial y por tanto, con elevados costes y precio. En este sentido, y concluyendo con lo que se ha expuesto, puede decirse que este tipo de catálisis es un proyecto de futuro que va a hacer más accesible a la población este tipo de productos al disminuir su precio.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Arroyo M, Acebal C, Mata I. Biocatálisis y biotecnología [Internet]. Arbor.revistas.csic.es. 2020 [cited 9 April 2020]. Available from: <http://arbor.revistas.csic.es/index.php/arbor/article/view/1958/2290>
2. Sinisterra D, Alcántara D. Universidad Complutense de Madrid [Internet]. Webs.ucm.es. 2020 [cited 6 April 2020]. Available from: <https://webs.ucm.es/info/btg/personales/jvsgago/fundamentals%20de%20biocat%20alis.pdf>
3. Biocatálisis » EIB [Internet]. Eib.cl. 2020 [cited 4 April 2020]. Disponible en: <http://eib.cl/biocatalisis/>
4. Mestres R. Química Sostenible: Naturaleza, fines y ámbito [Internet]. ScienceDirect. 2020 [cited 9 April 2020]. Available from: 1. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0187893X13725035>
5. Koenig SG, Bee C, Borovika A, Briddell C, Colberg J, Humphrey GR, et al. A Green Chemistry Continuum for a Robust and Sustainable Active Pharmaceutical Ingredient Supply Chain. ACS Sustain Chem Eng. 2019;7(20):16937–51.
6. Sheldon RA, Woodley JM. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. Chem Rev. 2018;118(2):801–38.
7. Arroyo M, Acebal C, de la Mata I. Biocatálisis Y Biocatalysis and Biotechnology. ARBOR Ciencia, Pensam y Cult. 2014;190(768):1–11.
8. Sheldon RA. Biocatalysis and Green Chemistry. Green Biocatal. 2016;1–15.
9. Luna H. Aplicación de la biocatálisis a la preparación de intermediarios para la síntesis de fármacos [Internet]. Scielo.org.mx. 2020 [cited 9 April 2020]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0583-76932004000300006
10. Villamizar C. Consideraciones generales sobre enzimología. Digitum [Internet]. 2006;6–62. Available from: <https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/141/3/CarrascoVillamizar03de18.pdf>
11. Los aspectos más generales que definen la estructura de la molécula de un compuesto orgánico: - PDF Descargar libre [Internet]. Docplayer.es. 2020 [cited 9 April 2020]. Available from: <https://docplayer.es/85887101-Los-aspectos-mas-generales-que-definen-la-estructura-de-la-molecula-de-un-compuesto-organico-son-cuatro.html>
12. Truppo MD. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry: The Need for Speed. ACS Med Chem Lett. 2017;8(5):476–80.
13. Gotor Fernández V, Hernáiz Gómez-Dégano M. Biocatálisis aplicada. Las enzimas como herramientas útiles en síntesis orgánica. An la Real Soc Española Química. 2017;113(1):27–35.
14. Barcelona U. Biocatalizadores para una química industrial más sostenible [Internet]. UABDivulga Barcelona Investigación e Innovación. 2020 [cited 9

- April 2020]. Available from: <https://www.uab.cat/web/detalle-noticia/biocatalizadores-para-una-quimica-industrial-mas-sostenible-1345680342040.html?noticiaid=1345690576586>
15. Arroyo M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharm.* 1998;39(2):111–27.
 16. Inmovilización de enzimas [Internet]. *Fbioyf.unr.edu.ar*. 2020 [cited 9 April 2020]. Available from: https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/5983/mod_resource/content/0/INMOVILIZACION_DE_ENZIMAS.pdf
 17. Sánchez-Ramírez J, Martínez-Hernández JL, Segura-Ceniceros EP, Contreras-Esquivel JC, Medina-Morales MA, Aguilar CN, et al. Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas. *Quim Nova.* 2014;37(3):504–12.
 18. Regenhart S. Estudio de la inmovilización de la β -Galactosidasa para la reutilización de la lactosa del suero de quesería. 2010;195.
 19. Pájaro NP, Verbel JT. Química verde: un nuevo reto. *Cienc e Ing Neogranadina.* 2011;21(2):169–82.
 20. Sierra, A. Meléndez, L. Ramírez, A. Arroyo M. La Química Verde Y El Desarrollo Sustentable. *Red Rev Científicas América Lat* [Internet]. 2014;VI(9):1–12. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4981/498150317001.pdf>
 21. Ávila Zárraga J, Gavilán García I, Cano Díaz G. Teoría y experimentos de química orgánica con un enfoque de química verde. Distrito Federal: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
 22. Mestres R. Química Sostenible : Naturaleza , fines y ámbito. 2013;24:103–12.
 23. Casullo P SE. Química Verde: Metas, Desafíos y Formas de Contribuir a su Desarrollo desde la Enseñanza Media. *Aportes la Química al Mejor la Calidad Vida.* 2012;15–37.
 24. Beltrán Flórez L, Acosta Cárdenas A. Empleo de una β -galactosidasa comercial de *Kluyveromyces lactis* en la hidrólisis de lactosuero. *instname Univ Antioquia.* 2012;(July).
 25. Karelén A, Ángel C, Sujaila C, Gisela P, Zulay M, Marisela R. ATCC 8554 en lactosuero diluido. 2010;143–8.
 26. Infante Pina D, Peña Quintana L, Sierra Salinas C. Intolerancia a la lactosa. *Acta Pediatr Esp.* 2015;73(10):249–58.
 27. Usuriaga Mulato Y. Inmovilización de la enzima Lactozym en soporte mesoporoso y su aplicación en la obtención de leches bajas en lactosa [Internet]. *Digital.csic.es*. 2020 [cited 18 April 2020]. Disponible en: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/152158/1/mcmm41.pdf>
 28. Guío Villarreal FA. Evaluación de la producción de galactooligosacáridos a partir de materias primas lácteas con galactosidasa inmovilizada. 2014;132. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/49957/>
 29. Rodríguez Olivenza D. Estudio de la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*. 2015;38. Available from: https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/14196/RodriguezOlivenza_D_avid_TFM_2015.pdf?sequence=2&isAllowed=y
 30. Francia K. Inmovilización de β galactosidasa y α manosidasa: aplicación al estudio del potencial inmunomodulador de residuos glicosídicos presentes en *Fasciola hepatica*. 2015

31. Leksmono CS, Manzoni C, Tomkins JE, Lucchesi W, Cottrell G, Lewis PA. Measuring lactase enzymatic activity in the teaching lab. *J Vis Exp*. 2018;2018(138):1–5.
32. Lopez BL, Quimicas PD. INMOVILIZACION DE LACTASA EN SÍLICAS CON POROSIDAD CONTROLADA Immobilization of lactase in silica with controlled porosity. *Enzyme*. 2007;(36):103–6.
33. Serra E, Blanco R, Díaz I. Síntesis y caracterización de materiales mesoporosos ordenados y su aplicación como soportes en la inmovilización de lipasa. *An la Real Soc Española Química*. 2008;(2):97–103.
34. Eciencia.urjc.es. 2020 [cited 1 June 2020]. Available from: https://eciencia.urjc.es/bitstream/handle/10115/5578/08-09_P%C3%A9rez%2CHerrero_Francisco.pdf?sequence=1&isAllowed=y
35. Mammarella E. Estudio del sistema de inmovilización de enzimas para la hidrólisis de lactosa [Internet]. *Biblioteca virtual.unl.edu.ar*. 2020 [cited 19 April 2020]. Available from: <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/handle/11185/25>
36. Rodríguez E, Villegas E. Caracterización de polímeros aplicando el método termogravimétrico. *Métodos y Mater*. 1969;2(1):25–32.
37. Introducción a. Anexo 1 Método de difracción con rayos X (DRX). 1981;1951:783–96.
38. Serrano JL. Espectroscopía infrarroja 1-Fundamentos. *Instrum y métodos análisis Quim*. 2009;35.
39. Perez P. Utilización de la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y de Transmisión (TEM) para el Análisis de las Pastas Estudiadas. 2011;1–19.
40. Clavijo J. Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Elementos*. 2013;3(3).
41. Hidrólisis de lactosa con lactasa termorresistente inmovilizada y su método de obtención - Google Patents [Internet]. *Patents.google.com*. 2020 [cited 10 June 2020]. Available from: <https://patents.google.com/patent/WO2003070928A1/es>
42. Vera C, Guerrero C, Aburto C, Cordova A, Illanes A. Conventional and non-conventional applications of β -galactosidases. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2020;1868(1):140271. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140271>