

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



**PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DERIVADOS
INSOLUBILIZADOS DE LA ENZIMA L-ARABINOSA ISOMERASA PARA SU
EMPLEO EN LA BIOCONVERSIÓN DE D-GALACTOSA EN D-TAGATOSA**

**Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del
Litoral para la obtención del Grado Académico de Doctor en Química en el campo
de la Tecnología Enzimática**

Ricardo Martín Manzo

**INSTITUTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO
PARA LA INDUSTRIA QUÍMICA**

I N T E C



**Directora: Dra. Amelia Catalina Rubiolo
Codirector: Dr. Enrique José Mammarella**

**Miembros del Jurado:
Prof. Dr. Francisco Dionel Batista-Viera
Prof. Dra. Fernanda Beatriz Mozzi
Prof. Dr. Jorge Alberto Reinheimer**

2013

A la vida

A mis padres

*Para ver el mundo en un grano de arena, y el cielo en una flor silvestre,
abarca el infinito en la palma de tu mano y la eternidad en una hora*

William Blake

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Amelia Rubiolo por haber sido mi directora de Tesis y apoyarme a lo largo de la realización de la misma.

A mi codirector, Dr. Enrique Mammarella por sus consejos, dedicación y aportes indispensables en la realización de este trabajo. Por permitirme trabajar con total libertad pero con un apoyo constante. Por brindarme constantemente oportunidades de progresar y crecer a nivel profesional y personal.

A los integrantes del jurado por haber aceptado evaluar este trabajo de Tesis.

A mi familia (mis padres, mis hermanxs, mis abuelos, mis tíos), pilar innegable en mi vida, probablemente como en la de cualquier otro. Ellos son la incertidumbre, la búsqueda, lo que no queremos ser pero anhelamos, lo simbólico. Sin ellos, lo que hacemos carece de sentido; hubiese sido imposible hacer este trabajo sin su presencia y apoyo.

A mi abuela y mi madrina que siempre quisieron un “doctor” en casa.

A mis abuelos, que de algún lado me miran.

A los amigos que hice en el Doctorado que ahora son más amigos que nunca: Belén, Silvina, Marina, Celina, Cecilia, Héctor y Roberto. Mil gracias por todo! Por todas las charlas, angustias, risas, aguantes, uff, si me habrán aguantado quejándome, opinando, criticando aunque siempre compartiendo con sinceridad todos estos momentos, tengan o no que ver con la tesis, por eso son mis amigos. Por las idas y las vueltas. No hay palabras para describir haber compartido la vida con ustedes. Gracias!

A Mercedes, por ser la persona que me inició en la vida de la ciencia, que, a pesar de su fama de rigurosa y de pocos amigos, es mi amiga. Por ser mi mentora, la que me insistió en hacer en el doctorado, la que me estabilizó en momentos que tambaleaba, la que me ayudó, la que estuvo, está y estará, realmente una persona transparente y maravillosa.

Al Dr. Arturo Simonetta por aceptarme que trabaje en su laboratorio de forma desinteresada y principalmente porque su personalidad y dedicación me han servido como faro en mi formación. Realmente le agradezco infinitamente por los momentos compartidos en largas charlas de mate de consejo y de enseñanzas de vida.

A todos mis compañeros del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por los momentos compartidos a lo largo de muchos años.

A todos mis compañeros de la cátedra de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Química (Marta, Karen y Hugo) por las buenas charlas y momentos compartidos además de permitirme trabajar con total libertad en su lugar de trabajo.

Al Dr. Francisco Batista-Viera y a su grupo de investigación a cargo por haberme tratado en forma excelente en mi estadía en la Cátedra de Bioquímica, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, República Oriental del Uruguay.

Al Dr. Pedro Torres por su excéntrica pero excelente personalidad, por su capacidad de trabajo en conjunto, por las numerosas horas de trabajo compartidas en el Uruguay, por su rigor científico que me han permitido, en gran parte, el desarrollo de esta Tesis. Pedro, realmente gracias.

A mis compañeros del Grupo de Ingeniería de Alimentos y Biotecnología por los momentos compartidos, por sus consejos, por las charlas, por el buen humor y ambiente de trabajo y por su disponibilidad a resolver cualquier duda que pudiese haber tenido.

Al Dr. Alejandro Beccaria, al Dr. Iván Marcipar y a la cátedra de Biología Molecular de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por permitirme haber utilizado en numerosas ocasiones sus equipos.

A Marylane, Wellington y Gerla pertenecientes al grupo Grupo de Pesquisa en Procesos Biotecnológicos (GPBio) del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Federal de Ceará (Fortaleza, Brasil) que, en su estadía en Argentina, compartimos excelentes momentos y contribuyeron al desarrollo de esta tesis.

Al INTEC por haberme permitido disponer de los medios necesarios para realizar mi labor. Al CONICET, a la Agencia Nacional de Promoción de Científica y Tecnológica de la Argentina y al Ministerio de Educación de la Nación por los subsidios otorgados a los proyectos que posibilitaron el desarrollo de este trabajo de tesis.

Debo agradecer también el inefable apoyo de la Universidad Nacional del Litoral y de la Facultad de Ingeniería Química de dicha casa de estudios a través de los proyectos de investigación, los programas de intercambio para docentes y estudiantes de posgrado y por permitirme ejercer una de las actividades que más me gustan, la docencia.

A Fede, Javi, Mati por ser mis amigos del alma. Por hacerme el aguante y estar siempre conmigo. Los quiero.

A los compañeros de A Pedal, por los momentos contruidos, por su aporte a la transformación social, por querer mejorar este mundo, por resistir.

A Laura por estar siempre cerca y presente, a pesar de todo y la distancia.

A Juan Manuel, Melina, Diego y Cecilia por nuestra amistad en crecimiento con potencialidad e integridad.

A todos mis amigos de la vida, Gabriel, Raúl, Virginia que, si bien, nos vemos poco, siempre están en mi corazón.

A mis viejos compañeros y amigos de facultad que, si bien son pocos, están en un lugar de mi corazón.

A todos los que olvidé u omití por alguna razón.

A los momentos que trascienden, a la gente que conocí, a la gente por conocer, a la música, a los libros, al teatro, a la montaña, al viento, al agua, a la vida.

¡Gracias a todos por todo!

RESUMEN

El estudio de los azúcares raros se ha visto incrementado en los últimos años debido a los numerosos avances relacionados tanto en el entendimiento de la estructura-función de los carbohidratos como también de las potenciales aplicaciones que podrían tener. Paralelamente, la D-tagatosa ha surgido como uno de los nutraceuticos más promisorios dadas las numerosas propiedades funcionales que posee además de su capacidad edulcorante, pudiendo traer numerosos beneficios demostrables a la salud para aquellas personas que lo hayan incorporados a sus dietas. Dicho monosacárido de seis carbonos posee una dulzura prácticamente indistinguible a la D-sacarosa, aunque baja en calorías ($1,5 \text{ kcal g}^{-1}$), con propiedades prebióticas y efectos comprobados en el tratamiento de diversas enfermedades, tales como la diabetes y la obesidad. Debido a estas características, la D-tagatosa ha sido admitida y reconocida como segura por la FAO y la OMS desde el año 2001. Sin embargo, su alto costo limita su uso en alimentos de consumo masivo.

En la actualidad, el azúcar en estudio es sintetizado químicamente a partir de D-galactosa, proceso que implica la utilización de complejos pasos de purificación conduciendo a la formación de residuos químicos peligrosos y a una reducción evidente de sus propiedades edulcorantes. Las investigaciones sobre la posible producción empleando medios biológicos apuntan a la generación de procesos que sean simultáneamente aplicables en la industria y ambientalmente amigables. Asimismo, aún no se ha logrado desarrollar ningún biométodo con aplicabilidad industrial, de los cuales la conversión enzimática empleando la enzima L-arabinosa isomerasa utilizando como sustrato D-galactosa, ha surgido como el proceso biológico más sustentable y económicamente viable de la actualidad.

Dicha enzima que cataliza *in vivo* la conversión de L-arabinosa en L-ribulosa, habiéndose comprobado además, su capacidad para convertir *in vitro* la D-galactosa en D-tagatosa. De esta forma, este trabajo de Tesis ha planteado estudiar, en la forma más íntegra posible, el proceso de conversión de D-galactosa a D-tagatosa utilizando la mencionada enzima.

Por tal motivo, para el presente trabajo se ensayaron 29 cepas bacterianas empleando un método microbiológico desarrollado para evaluar la degradación del

azúcar L-arabinosa resultando seleccionada *Enterococcus faecium* DBFIQ ETW4. Además, el proceso de producción de la enzima fue optimizado tanto a través de la modificación de los componentes del medio de cultivos mediante arreglos ortogonales como mediante la mejora de la ruptura celular por ultrasonido.

La enzima fue purificada en dos pasos utilizando un bioadsorbente de afinidad L-arabitol-agarosa diseñado con dicho propósito. El peso molecular del monómero fue de 56 kDa y, en forma nativa, la enzima está dispuesta como un homotetrámero. Su punto isoeléctrico fue calculado en 3,80 presentando una temperatura óptima de 45-50°C y un pH óptimo en el rango 7,0-7,5. Asimismo, ha conservado más del 60% de su actividad luego de 6 horas de incubación en un rango de pH 6,5-8,5, y mantenido una actividad residual superior al 60% luego de 8 horas de incubación a temperaturas en el rango 20-40°C. La concentración óptima de cofactor fue de 0,31 mM de Mn^{2+} . Los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten obtenidos fueron de 43 mM para su K_M y de 18 U mg^{-1} para su V_{MAX} .

En la búsqueda de un catalizador conveniente fueron testeados soportes de diferentes orígenes y se evaluó el efecto de la inmovilización covalente multipuntual de la enzima a través empleando diversos agentes de activación. Los mejores resultados con quitosano han sido obtenidos con el soporte previamente reaccionado con fructosa a 50°C por 4 horas y activado con glutaraldehído y con el soporte coagulado con cloruro de polialuminio, para la activación con epiclorhidrina. Además, Eupergit C250L resultó ser el soporte comercial que mejor estabilizó la actividad enzimática.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción	1
1.1. Análisis prospectivo de los hidratos de carbono	2
1.2. Campos de aplicación de los hidratos de carbono	4
1.3. La centralidad de los azúcares	6
1.4. Azúcares raros	8
1.4.1. Producción enzimática de los azúcares raros	9
1.5. D-tagatosa	10
1.5.1. Producción química de D-tagatosa	11
1.5.2. Producción biológica de D-tagatosa	11
Capítulo 2. Objetivos	15
Capítulo 3. Fundamentos teóricos	18
3.1. Producción biocatalítica de azúcares raros	19
3.2. Interconversiones enzimáticas para la producción de azúcares raros	23
3.2.1. Aldosa-cetosa isomerasas para la producción de azúcares raros	29
3.2.1.1. Isomerasas para la producción de L-ribosa	30
3.2.1.2. Isomerasas para azúcares modificados y desoxiazúcares	30
3.2.1.3. L-arabinosa isomerasa para la producción de D-tagatosa	30
3.3. D-tagatosa	31
3.3.1. Generalidades	31
3.3.2. Metabolismo	33

3.3.3. D-tagatosa como sustancia reconocida como segura para su consumo	35
3.3.4. Propiedades	38
3.3.5. Propiedades beneficiosas para la salud	41
3.3.5.1. Propiedades prebióticas	41
3.3.5.2. Respuestas glicémicas e insulinémicas	43
3.3.5.3. D-tagatosa como droga antidiabética y para el control de la obesidad	44
3.3.5.4. Protección dental	45
3.3.5.5. D-tagatosa en bebidas	45
3.3.5.6. D-tagatosa para el tratamiento de la intolerancia a la D-fructosa	45
3.3.5.7. Propiedades antioxidantes	47
3.3.5.8. Otras propiedades	47
3.3.6. Estabilidad de la D-tagatosa	48
3.3.7. Importancia Comercial	48
3.3.8. Vías de obtención de la D-tagatosa	49
3.3.9. Productos comerciales de D-tagatosa	52
3.4. Producción bioquímica de D-tagatosa a partir de D-galactosa	54
3.4.1. Fuentes de la enzima	54
3.4.2. Purificación y propiedades de las diferentes enzimas L-arabinosa isomerasa caracterizadas	55
3.4.3. Caracterización de la enzima L-arabinosa isomerasa	59
3.4.4. Modificación de la L-arabinosa isomerasa empleando técnicas de ingeniería genética	68

3.4.5. Conversión de D-galactosa a D-tagatosa empleando la técnica de alteración del equilibrio de isomerización	69
3.4.6. Aplicaciones industriales de la enzima L-arabinosa isomerasa para la producción de D-tagatosa	71
3.4.6.1. Procedimiento químico	71
3.4.6.2. Procedimiento biológico empleando la enzima L-arabinosa isomerasa	73
3.4.7. Determinación analítica de la D-tagatosa	76
3.4.8. Purificación de la D-tagatosa a partir mezclas de azúcares	77
3.4.9. Comparación entre la D-xilosa y L-arabinosa isomerasa. Mecanismo de reacción	78
3.4.10. Otras aplicaciones de la enzima L-arabinosa isomerasa	81
3.5. Técnicas de purificación utilizadas para obtener preparaciones puras de la enzima L-arabinosa isomerasa	82
3.5.1. Precipitación salina con sulfato de amonio	82
3.5.2. Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)	83
3.5.3. Cromatografía de intercambio iónico (IEC)	84
3.6. Inmovilización	85
3.6.1. Soportes para la inmovilización	86
3.6.1.1. Quitosano	87
3.6.2. Métodos de inmovilización	90
3.6.2.1. Métodos reversibles	90
3.6.2.2. Métodos irreversibles	91
3.6.2.2.1. Métodos de activación del soporte	93
3.6.3. Efectos del proceso de inmovilización sobre la enzima	94

3.6.4. Producción de D-tagatosa empleando un biocatalizador inmovilizado	95
3.6.5. Comparación de la producción de D-tagatosa	98
Capítulo 4. Materiales y métodos	106
4.1. Materiales utilizados	107
4.1.1. Azúcares	107
4.1.2. Ensayos microbiológicos efectuados sobre las cepas bacterianas exploradas	107
4.1.3. Medios de cultivo para la conservación y crecimiento de las cepas estudiadas	107
4.1.4. Ensayos de determinación de la actividad enzimática y concentración de proteínas	108
4.1.5. Ensayos de purificación	108
4.1.6. Ensayos de electroforesis	109
4.1.7. Ensayos de inmovilización	109
4.1.8. Soportes comerciales para la inmovilización de la enzima	110
4.2. Métodos	110
4.2.1. Estudios microbiológicos efectuados para la obtención de la cepa productora de la enzima L-arabinosa isomerasa	110
4.2.1.1. Cepas exploradas	110
4.2.1.2. Conservación de las cepas	114
4.2.1.3. Reactivación de la cepa <i>C. acetobutylicum</i>	117
4.2.2. Ensayos microbiológicos efectuados a la cepa productora de la	118

enzima L-arabinosa isomerasa	
4.2.2.1. Pruebas de caracterización efectuadas a <i>E. faecium</i> DBFIQ E36	118
4.2.2.1.1. Ensayos de citotoxicidad mediante lisis de eritrocitos	118
4.2.2.1.2. Resistencia a Vancomicina	119
4.2.2.2. Estudios de biología molecular para la identificación genética de la cepa <i>E. faecium</i> DBFIQ E36 mediante la metodología del rRNA 16S	119
4.2.3. Estudios de fermentación de la aldopentosa L-arabinosa para la selección de cepas productoras de la enzima L-arabinosa isomerasa	121
4.2.3.1. Diseño de los medios de cultivo	121
4.2.3.2. Ensayos de fermentación de la pentosa L-arabinosa	122
4.2.4. Ensayos de crecimiento celular y producción del extracto libre de células con las cepas previamente seleccionadas	124
4.2.4.1. Evaluación del crecimiento celular	124
4.2.4.2. Producción de los extractos enzimáticos libres de células	125
4.2.5. Ensayos de mejoramiento de la ruptura de las células de enterococo empleando la metodología de disrupción celular por vibraciones ultrasónicas	128
4.2.5.1. Estudios de optimización del proceso de ruptura celular mediante sonicación pulsada	128
4.2.6. Ensayos de modificación de la composición del medio de cultivo para aumentar la producción de la enzima L-arabinosa isomerasa	133
4.2.6.1. Estudios de optimización del medio de cultivo empleado para el crecimiento de <i>E. faecium</i> DBFIQ E36 de	133

manera de maximizar la producción de la enzima L-arabinosa isomerasa	
4.2.7. Pruebas de determinación de la actividad enzimática y concentración de proteínas	139
4.2.7.1. Ensayos de actividad enzimática y proteínas efectuados sobre la enzima libre	139
4.2.8. Síntesis de los adsorbentes cromatográficos para su empleo en cromatografía de afinidad	141
4.2.8.1. Bioadsorbentes de agarosa	141
4.2.8.1.1. Activación de la agarosa	141
4.2.8.1.2. Determinación de la densidad de grupos epóxidos	142
4.2.8.1.3. Acoplamiento de D-arabinosa o L-arabitol	142
4.2.8.2. Bioadsorbente de quitosano	143
4.2.9. Ensayos de purificación efectuados al extracto libre de células obtenido de la cepa <i>E. faecium</i> DBFIQ E36 para la obtención de preparaciones puras de la enzima L-arabinosa isomerasa	144
4.2.9.1. Precipitación salina con sulfato de amonio	144
4.2.9.2. Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)	145
4.2.9.3. Cromatografía de intercambio iónico (IEC)	147
4.2.9.3.1. Intercambio iónico en DEAE-Sepharose	147
4.2.9.3.2. Intercambio iónico en QAE-Sephadex	148
4.2.9.3.3. Intercambio iónico en SP-Sepharose	149
4.2.9.4. Cromatografía de afinidad en D-arabinosa-agarosa	150
4.2.9.5. Cromatografía de afinidad en L-arabitol-agarosa	151

4.2.10. Ensayos de electroforesis en geles de poliacrilamida para la caracterización de la enzima L-arabinosa isomerasa	152
4.2.10.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	152
4.2.10.1.1. PAGE nativo	152
4.2.10.1.2. SDS-PAGE	152
4.2.10.2. Determinación del punto isoelectrico mediante isoelectroenfoque (IEF)	154
4.2.10.3. PAGE bidimensional (2D-PAGE)	154
4.2.11. Estudios de caracterización de la enzima L-arabinosa isomerasa en fase homogénea	155
4.2.11.1. Determinación de la estructura cuaternaria de la enzima L-arabinosa isomerasa	155
4.2.11.2. Espectrometría de masas	157
4.2.11.3. Determinación del peso molecular de la enzima	158
4.2.11.4. Efecto de diferentes soluciones tampón sobre la actividad enzimática	158
4.2.11.5. Efecto de cationes sobre la actividad enzimática	158
4.2.11.6. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática	159
4.2.11.6.1. pH óptimo	159
4.2.11.6.2. Temperatura óptima	159
4.2.11.6.3. Estabilidad de la enzima frente a la temperatura en presencia y ausencia de cationes divalentes	160
4.2.11.7. Determinación de los parámetros cinéticos (V_M y K_M) y de la constante de inhibición (K_I)	160

4.2.11.8. Rendimiento de conversión	161
4.2.12. Estudios de inmovilización de la enzima L-arabinosa isomerasa	161
4.2.12.1. Síntesis de diferentes soportes para la inmovilización de la enzima L-arabinosa isomerasa	161
4.2.12.1.1. Soportes de Quitosano	162
4.2.12.1.1.1. Preparación de los soportes de quitosano	162
4.2.12.2. Condiciones de activación ensayadas en la inmovilización de la enzima L-arabinosa isomerasa	166
4.2.12.2.1. Activación de soportes de quitosano con glutaraldehído	166
4.2.12.2.1.1. Baja	166
4.2.12.2.1.2. Media	166
4.2.12.2.1.3. Alta	167
4.2.12.2.2. Activación de soportes de quitosano con epíclorhidrina	167
4.2.12.3. Inmovilización de la enzima L-arabinosa isomerasa en los soportes de quitosano previamente activados	168
4.2.12.3.1. Inmovilización de la enzima L-arabinosa isomerasa en soporte activados con glutaraldehído	168
4.2.12.3.2. Inmovilización de la enzima L-arabinosa isomerasa en soporte activados con epíclorhidrina	171
4.2.12.4. Inmovilización de la enzima L-arabinosa isomerasa en soportes disponibles comercialmente	173
4.2.12.4.1. Inmovilización en Glioxil-agarosa	173
4.2.12.4.1.1. Descripción y activación de los soportes	173

glioxil-agarosa	
4.2.12.4.1.2. Inmovilización de la enzima L-arabinosa isomerasa en soportes de glioxil-agarosa	174
4.2.12.4.2. Inmovilización en agarosa epoxi-activada	176
4.2.12.4.2.1. Acondicionamiento y activación del soporte	176
4.2.12.4.2.2. Inmovilización de la enzima	177
4.2.12.4.3. Inmovilización en soportes de metacrilato	179
4.2.12.4.3.1. Acondicionamiento y activación del soporte	180
4.2.12.4.3.2. Inmovilización de la enzima	180
4.2.13. Determinación de la actividad de la enzima L-arabinosa isomerasa y concentración de proteínas en fase heterogénea	181
4.2.13.1. Actividad enzimática	181
4.2.13.2. Determinación de proteínas en el medio de reacción	184
Capítulo 5. Resultados y discusión	186
5.1. Ensayos microbiológicos realizados	187
5.1.1. Diseño y preparación de medios de cultivo	187
5.1.2. Ensayo de fermentación	188
5.1.3. Producción del extracto y evaluación de la actividad enzimática	195
5.1.4. Identificación de las cepas e identificación por PCR de la cepa del género <i>Enterococcus</i> seleccionada	200
5.1.5. Ensayos de modificación de la composición del medio de cultivo	201

de manera de maximizar la producción de la enzima L-arabinosa isomerasa producida por la cepa <i>E. faecium</i> DBFIQ E36	
5.1.5.1. Estudio de crecimiento celular en medio MRS	201
5.1.5.2. Modificación de la composición del medio de cultivo MRS para optimizar la producción de la enzima L-arabinosa isomerasa	204
5.1.6. Estudios de optimización del proceso de ruptura celular mediante sonicación pulsada	227
5.1.7. Ensayos de purificación realizados	238
5.1.7.1. Comportamiento de la enzima L-arabinosa isomerasa frente a diferentes metodologías y resinas de purificación	238
5.1.7.1.1. Precipitación salina con sulfato de amonio	238
5.1.7.1.2. Cromatografía de intercambio iónico	240
5.1.7.1.2.1. Cromatografía de intercambio aniónico en modo discontinuo	240
5.1.7.1.2.1.1. DEAE-Sepharose	241
5.1.7.1.2.1.2. QAE-Sephadex	245
5.1.7.1.2.2. Cromatografía de intercambio catiónico en modo discontinuo	245
5.1.7.1.2.2.1. SP-Sepharose	245
5.1.7.1.3. Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)	247
5.1.7.1.4. Cromatografía de afinidad en D-arabinosa	251
5.1.7.2. Estrategias de purificación de la enzima L-arabinosa isomerasa utilizadas	252

5.1.7.2.1. Purificación de la enzima L-arabinosa isomerasa empleando una estrategia de dos cromatografías de intercambio aniónico sucesivas	252
5.1.7.2.2. Cromatografía de afinidad empleando el bioadsorbente L-arabitol-Sepharose 4B para la purificación de la enzima L-arabinosa isomerasa	259
5.1.7.2.2.1. Protocolo 1	260
5.1.7.2.2.2. Protocolo 2	261
5.1.8. Ensayos de caracterización de la enzima L-arabinosa isomerasa	267
5.1.8.1. Determinación de la estructura cuaternaria	267
5.1.8.1.1. Espectrometría de Masas	267
5.1.8.1.2. Análisis electroforéticos	272
5.1.8.1.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas y desnaturalizantes (SDS-PAGE)	272
5.1.8.1.2.2. Electroforesis bidimensional	273
5.1.8.1.3. Cromatografía de filtración por geles	274
5.1.8.1.4. Determinación del comportamiento de la enzima L-arabinosa isomerasa frente a diferentes condiciones fisicoquímicas	275
5.1.8.1.4.1. Temperatura óptima	276
5.1.8.1.4.2. pH óptimo	277
5.1.8.1.4.3. Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima L-arabinosa isomerasa	279

5.1.8.1.4.4. Efecto del agregado de diferentes sustancias sobre la actividad de la enzima L-arabinosa isomerasa	286
5.1.8.1.4.4.1. Efecto de diferentes cationes sobre la actividad enzimática	287
5.1.8.1.4.4.2. Concentración óptima del catión Mn^{2+} sobre la actividad enzimática	292
5.1.8.1.4.4.3. Efecto del agregado de polioles sobre la actividad enzimática	294
5.1.8.1.4.5. Estabilidad de la enzima frente al pH y a la temperatura	297
5.1.8.1.4.6. Estabilidad térmica de la enzima L-arabinosa isomerasa a diferentes temperaturas y frente a la presencia y ausencia del cofactor Mn^{2+}	300
5.1.8.1.4.7. Rendimiento de conversión	302
5.1.9. Estudios de inmovilización de la enzima L-arabinosa isomerasa en diferentes soportes	305
5.1.9.1. Inmovilización en soportes comerciales	305
5.1.9.2. Inmovilización en quitosano	309
5.1.9.2.1. Activación con glutaraldehído	309
5.1.9.2.2. Activación con epíclorhidrina	317
5.1.9.3. Mejores biocatalizadores	323
Capítulo 6. Conclusiones	326
Referencias bibliográficas	333

Anexos	i
Anexo I. Medios de cultivo	ii
Anexo II. Métodos colorimétricos de determinación de cetosas	ix
Anexo III. Métodos de determinación de las proteínas	xlv
Anexo IV. Electroforesis y tinción en geles de poliacrilamida	liii
Anexo V. Preparación de soportes de quitosano	lxxx

Figuras

Capítulo 3. Fundamentos teóricos

3.1.	Formas de interconversión enzimática de las tres diferentes de clases de enzima que pueden emplearse en la producción de azúcares raros tomando como ejemplo la conversión enzimática de D-galactosa	25
3.2.	Visión general de las interconversiones enzimáticas (proceso de Izumoring) de las hexosas no modificadas	27
3.3.	Visión general de las interconversiones enzimáticas (proceso de Izumoring) de las pentosas no modificadas	28
3.4.	Configuraciones químicas de los azúcares de interés	31
3.5.	Vía de la tagatosa-6-fosfato	34
3.6.	Proceso químico de manufactura de la D-tagatosa	72
3.7.	Representación esquemática de la síntesis de D-tagatosa química versus bioquímica	73
3.8.	Mecanismos de reacción propuestos para isomerasas metal (A) y no metal (B) dependientes	80

3.9.	Estructura de la quitina (arriba) y de su derivado desacetilado, el quitosano (abajo)	88
3.10.	Métodos reversibles para la inmovilización de enzimas	91
3.11.	Métodos irreversibles para la inmovilización de enzimas	92

Capítulo 4. Materiales y métodos

4.1.	Medios de cultivo utilizados para el ensayo de fermentación de la L-arabinosa para las diversas cepas exploradas	122
4.2.	Representación esquemática del proceso de fermentación de L-arabinosa en medio sólido y líquido	124
4.3.	Diagrama de flujo del proceso de elaboración de los extractos libre de células	127
4.4.	Representación geométrica del diseño central compuesto utilizado para la optimización del proceso de ruptura celular	129
4.5.	Esquema de elaboración de los extractos enzimáticos de acuerdo a la metodología propuesta para la optimización del proceso de ruptura celular por ultrasonido	131
4.6.	Esquema de elaboración de los extractos enzimáticos de acuerdo a la metodología propuesta para la optimización de la actividad enzimática empleando la metodología de arreglos ortogonales de Taguchi	137
4.7.	Representación esquemática del ensayo de actividad enzimática empleando la enzima libre	140
4.8.	Diagrama de flujo de obtención de la muestra de partida empleada para la realización de todos los ensayos de purificación	145

4.9.	Representación esquemática de la purificación de la enzima L-arabinosa isomerasa empleando resinas de cromatografía de interacción hidrofóbica	146
4.10.	Representación esquemática de la purificación de la enzima L-arabinosa isomerasa a través de una cromatografía de intercambio aniónico en la resina DEAE-Sepharose utilizada	148
4.11.	Representación esquemática de la purificación de la enzima L-arabinosa isomerasa empleando resinas de cromatografía de intercambio en forma secuencial	149
4.12.	Representación esquemática del modo de realización de la electroforesis bidimensional	155
4.13.	Equipamiento empleado para la preparación de las partículas de quitosano utilizando la técnica de goteo con aguja hipodérmica	162
4.14.	Tratamientos químicos realizados antes y después del proceso de formación de las partículas de quitosano	165
4.15.	Esquema del proceso de inmovilización de la enzima L-arabinosa isomerasa utilizando una solución de glutaraldehído al 2% (v/v) como agente activante	170
4.16.	Inmovilización covalente multipuntual en soportes de quitosano a través de la química del glutaraldehído	170
4.17.	Esquema del proceso de inmovilización de la enzima L-arabinosa isomerasa utilizando, como agente activante, epíclorhidrina a una concentración de $0,5 \text{ g ml}^{-1}$	172
4.18.	Inmovilización covalente multipuntual en soportes de agarosa utilizando la química del glioxal	176
4.19.	Representación esquemática del proceso de inmovilización covalente multipuntual sobre soportes de agarosa activados con	177

grupos epóxidos

- 4.20.** Agentes bloqueantes de grupos epóxidos utilizados rutinariamente en la química de inmovilización de proteínas 179
- 4.21.** Representación esquemática de la química de inmovilización covalente en soportes de metacrilato 181
- 4.22.** Representación esquemática del ensayo de actividad enzimática empleando la enzima inmovilizada 182

Capítulo 5. Resultados y discusión

- 5.1.** Crecimiento de diferentes cepas bacterianas en los medios adaptados para la fermentación del azúcar L-arabinosa 187
- 5.2.** Selección de cepas bacterianas fermentadoras del azúcar L-arabinosa efectuada en medios de cultivo diferenciales en fase líquida y sólida 193
- 5.3.** Curvas de turbidez a 600 nm para las tres cepas seleccionadas del estudio de screening de bacterias fermentadoras de L-arabinosa 202
- 5.4.** Curvas de crecimiento en el medio MRS de las tres cepas de bacterias del ácido láctico previamente seleccionadas como productoras de la enzima en estudio 203
- 5.5.** Influencia de los efectos principales sobre la optimización de la respuesta de la actividad enzimática, los cuales muestran la performance promedio de cada factor a un dado nivel 208
- 5.6.** Gráfico de residuos entre los valores introducidos y los pronosticados por el modelo 231
- 5.7.** Gráfico de probabilidad normal de los efectos estandarizados para la respuesta obtenida por el modelo 232

5.8.	Gráfico de Pareto estandarizado para la respuesta de la concentración de proteínas analizada	233
5.9.	Influencia de los efectos principales sobre la respuesta concentración de proteínas	234
5.10.	Curva de superficie de la respuesta estimada por el modelo obtenido luego de la aplicación del diseño central compuesto	236
5.11.	Recuperación de la actividad enzimática luego de precipitar las proteínas de los extractos libre de células empleando diferentes concentraciones de sulfato de amonio	239
5.12.	Diagrama de elución de proteínas y actividad enzimática logrado luego de la realización de la cromatografía en DEAE-Sepharose en modo batch para la purificación de la enzima L-arabinosa isomerasa.	242
5.13.	PAGE-SDS sobre un gel de poliacrilamida homogéneo al 12,5% T con diferentes muestras obtenidas de la cromatografía con DEAE-Sepharose en modo batch	244
5.14.	Perfil de elución de proteínas y actividad enzimática durante una HIC en la resina Phenyl-Sepharose	251
5.15.	Diagrama de elución de proteínas y actividad enzimática obtenido luego de realizar la cromatografía en DEAE-Sepharose en modo continuo para la purificación de la enzima L-arabinosa isomerasa	254
5.16.	PAGE-SDS de diferentes fracciones parcialmente purificadas provenientes de la estrategia de purificación de la enzima L-arabinosa isomerasa a partir de dos tratamientos iónicos sucesivos	257
5.17.	IEF de una muestra parcialmente purificada obtenida de la aplicación de la estrategia de dos intercambios iónicos sucesivos utilizando geles comerciales para isoelectroenfoque conteniendo anfolitos	258

5.18.	Diagrama de elución de la enzima L-arabinosa isomerasa purificada por cromatografía de afinidad de acuerdo al protocolo 2	262
5.19.	PAGE-SDS de diferentes fracciones parcialmente purificadas provenientes del protocolo 1 y 2 empleando un PhastGel homogéneo al 12,5% T	265
5.20.	IEF de la enzima L-arabinosa isomerasa purificada en geles prearmados homogéneos al 12,5% T	266
5.21.	Espectro de masas de la enzima L-arabinosa isomerasa obtenido luego de aplicar la técnica de mapeo peptídico empleando la enzima proteolítica tripsina	270
5.22.	Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5% en condiciones nativas	272
5.23.	Electroforesis bidimensional en Phastgel de la enzima L-AI purificada a homogeneidad empleando un PhastGel al 12,5% T	273
5.24	Cromatografía de exclusión por geles utilizando la resina Superdex 200.	275
5.25.	Efecto de la temperatura sobre la actividad de la L-arabinosa isomerasa	277
5.26.	Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la L-arabinosa isomerasa	278
5.27.	Gráfica de Lineweaver-Burk para la determinación de los parámetros cinéticos empleando D-galactosa como sustrato	280
5.28.	Regresión no lineal de los datos para la determinación de los parámetros cinéticos empleando el modelo de Michaelis-Menten (forma de hipérbola) y utilizando D-galactosa como sustrato	281
5.29.	Actividades relativas de la enzima L-arabinosa isomerasa expuesta al tratamiento con diferentes cationes en relación al extracto no	291

	suplementado con ningún catión	
5.30.	Efecto de la adición de diferentes concentraciones de Mn^{2+} sobre la actividad de L-arabinosa isomerasa	293
5.31.	Estudios de inhibición realizados sobre la enzima L-arabinosa isomerasa empleando L-arabitol a diferentes concentraciones iniciales	295
5.32.	Estabilidad de L-arabinosa isomerasa frente a la temperatura	298
5.33.	Estabilidad de L-arabinosa isomerasa frente al pH	299
5.34.	Curvas de desactivación térmica para la enzima L-arabinosa isomerasa en ausencia del cofactor Mn^{2+}	300
5.35.	Curvas de desactivación térmica para la enzima L-arabinosa isomerasa en presencia del cofactor Mn^{2+}	302
5.36.	Conversión de D-galactosa a D-tagatosa a diferentes temperaturas utilizando una preparación líquida de la enzima L-arabinosa isomerasa de <i>E. faecium</i> DBFIQ E36	303
5.37.	Microscopías electrónicas de barrido (SEM) para los soportes de glioxil-agarosa con la enzima L-arabinosa isomerasa inmovilizada	306
5.38.	Microscopías electrónicas de barrido (SEM) para el soporte Eupergit C250L con la enzima L-arabinosa isomerasa inmovilizada	307
5.39.	Fotografías de los soportes sintetizados más relevantes antes y después de la activación con glutaraldehído	311
5.40.	Fotografías de los soportes sintetizados más relevantes antes y después de la activación con epíclorhidrina	317
5.41.	Mejores biocatalizadores conteniendo la enzima L-arabinosa isomerasa inmovilizada obtenidos luego de utilizar diversos soportes y estrategias de inmovilización.	324

Tablas**Capítulo 3. Fundamentos teóricos**

3.1	Aplicaciones de los diferentes azúcares raros de cinco y seis carbonos	19
3.2.	Ventajas y desventajas de las tres clases de enzimas utilizadas en la producción de azúcares raros	26
3.3.	Ocurrencia natural de D-tagatosa en diferentes alimentos	32
3.4.	Alimentos y productos en los que se ha incorporado la sustancia GRAS D-tagatosa	36
3.5.	Propiedades físicas y químicas de la D-tagatosa	40
3.6.	Características fisicoquímicas de diferentes L-arabinosa isomerasas	56
3.7.	Propiedades bioquímicas de diferentes L-arabinosa isomerasas	60
3.8.	Parámetros cinéticos de diferentes L-arabinosa isomerasas	64
3.9.	Estudios de bioconversión de D-galactosa a D-tagatosa usando la enzima L-arabinosa isomerasa descritos por los diversos documentos de propiedad intelectual publicados	75
3.10.	Clasificación de los soportes de acuerdo a su composición	86
3.11.	Métodos de unión covalente de las enzimas	94
3.12.	Producción de D-tagatosa a partir de D-galactosa por diferentes L-arabinosa isomerasas	99

Capítulo 4. Materiales y métodos

- 4.1. Cepas bacterianas empleadas en el ensayo de fermentación de la L- arabinosa para la búsqueda de la enzima L-arabinosa isomerasa 111
- 4.2. Composición modificada del medio MRS para la producción de los cultivos enzimáticos 125
- 4.3. Niveles y factores seleccionados para el desarrollo del diseño central compuesto 130
- 4.4. Experiencias de elaboración de los extractos enzimáticos para la optimización del proceso de ruptura celular 132
- 4.5. Tratamientos y niveles seleccionados para el desarrollo del diseño de Taguchi para optimizar la producción enzimática 135
- 4.6. Experiencias de elaboración de los extractos enzimáticos para la optimización de la producción de la enzima L-arabinosa isomerasa empleando el diseño de arreglos ortogonales de Taguchi 138
- 4.7. Soportes comerciales de agarosa preactivados con glioxal utilizados para la inmovilización de la enzima L-arabinosa isomerasa 173

Capítulo 5. Resultados y discusión

- 5.1. Metabolización de la L-arabinosa por parte de cada cepa bacteriana en su correspondiente medio de cultivo diferencial 189
- 5.2. Actividad enzimática de los diferentes extractos libre de células y precipitados elaborados empleando L-arabinosa y D-galactosa como sustratos 198
- 5.3. Optimización de la actividad enzimática empleando arreglos ortogonales de Taguchi de 27 experiencias a tres niveles y 11 205

factores	
5.4.	Influencia de los factores y niveles estudiados sobre la producción de la enzima 215
5.5.	Análisis de las potenciales interacciones existentes entre dos factores a través del cálculo del índice de severidad (SI) 217
5.6.	Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados experimentales sobre la producción de la enzima L-arabinosa isomerasa por <i>E. faecium</i> DBFIQ E36 222
5.7.	Composición optimizada del medio de cultivo MRS para la producción de la enzima L-arabinosa isomerasa por <i>E. faecium</i> DBFIQ E36 225
5.8.	Valores obtenidos para la respuesta concentración de proteínas obtenida luego de la realización de las diferentes experiencias 227
5.9.	Efectos estimados para el cálculo de la respuesta concentración de proteínas luego de optimizar el proceso de ruptura celular 228
5.10.	Análisis de la varianza para los factores y sus interacciones empleando el diseño central compuesto utilizado en la optimización del proceso de ruptura celular 229
5.11.	Estimación de los valores de la respuesta estimada por el modelo de regresión obtenido 235
5.12.	Fracciones activas más relevantes obtenidas de la aplicación de las diferentes estrategias convencionales de purificación de la enzima 243
5.13.	Cromatografía de intercambio iónico en la resina SP-Sepharose Fast-Flow en modo batch para la purificación de la enzima L-arabinosa isomerasa 246
5.14.	Elución de la actividad enzimática durante una cromatografía de interacción hidrofóbica en la resina Phenyl-Sepharose 248

- 5.15. Cromatografía de interacción hidrofóbica empleando la resina Octyl-Sepharose 250
- 5.16. Cromatografía de afinidad realizada empleando un bioadsorbente con el ligando D-arabinosa inmovilizado 252
- 5.17. Fracciones activas más relevantes obtenidas luego de la aplicación de la estrategia de intercambios iónicos sucesivos empleando un lote de producción de enzima diferente 255
- 5.18. Purificación en dos pasos de la enzima L-arabinosa isomerasa de *E. faecium* DBFIQ E36 empleando el protocolo 1 261
- 5.19. Purificación en dos pasos de la enzima L-arabinosa isomerasa de *E. faecium* DBFIQ E36 empleando el protocolo 2 263
- 5.20. Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente 267
- 5.21. Parámetros cinéticos de diferentes L-arabinosa isomerasas provenientes de bacterias mesófilas 282
- 5.22. Parámetros cinéticos de diferentes L-arabinosa isomerasas provenientes de bacterias termófilas, acidófilas e hipertermófilas 284
- 5.23. Efecto de diferentes iones metálicos a una concentración 1 mM sobre la actividad isomerasa a 50°C y pH 7,0 288
- 5.24. Constantes de inhibición (k_i) para los inhibidores L-arabitol y L-ribitol estimados en enzimas L-arabinosa isomerasas de diferentes organismos bacterianos 296
- 5.25. Tiempos de vida media ($t_{1/2}$) para la enzima L-arabinosa isomerasa a diferentes temperaturas y concentraciones de cofactor. 301
- 5.26. Bioconversión de D-galactosa a D-tagatosa empleando diferentes L-arabinosa isomerasas provenientes de diversos organismos 304
- 5.27. Inmovilización de la enzima L-arabinosa isomerasa en soportes 308

comerciales

- 5.28.** Soportes de quitosano de diferentes grados de activación con 310
glutaraldehído conteniendo la enzima L-arabinosa isomerasa
inmovilizada
- 5.29.** Inmovilización de la enzima L-arabinosa isomerasa sobre soportes 314
de quitosano activados con glutaraldehído
- 5.30.** Inmovilización de la enzima L-arabinosa isomerasa sobre soportes 319
de quitosano activados con epíclorhidrina

Capítulo 1.

Introducción

1.1. Análisis prospectivo de los hidratos de carbono

La glicociencia es un campo de estudio altamente interdisciplinario cuyo objetivo es entender las estructuras y funciones de los glicanos, para así conocer como pueden ser modificados y utilizados. La misma combina la fisiología y biología del desarrollo, dado que los glicanos están involucrados en los procesos de movimiento celular y desarrollo de los tejidos, estando asociadas, además, al desarrollo y progresión de enfermedades crónicas e infecciosas, así como en el tratamiento médico de muchas de ellas. En microbiología, los mismos son intermediarios claves entre los microorganismos y sus células huésped; en la química, intervienen en el desarrollo de métodos analíticos y de síntesis de glicanos y, a nivel bioquímico, es analizado su síntesis y metabolismo. En un nivel más aplicado, influyen profundamente en la ciencia de materiales, a través de su empleo como materiales poliméricos poseyendo un amplio rango de propiedades.

Por otro lado, mientras que la genómica y la proteómica han avanzado rápidamente, la glicociencia y la glicómica han avanzado en una forma más abrupta, por lo que recientemente se ha comenzado a entender la influencia real que los glicanos juegan en los sistemas biológicos. Las investigaciones en glicociencia han permitido desarrollar una base de conocimiento fundamental que puede ser utilizada para resolver numerosos problemas importantes asociados a la investigación. Este conocimiento base, al estar combinado con las herramientas actualmente disponibles para analizar la estructura y función de los glicanos, es esencial para lograr un entendimiento completo de la biología de las bacterias, plantas y humanos.

La glicociencia, al ser una rama de la ciencia relativamente nueva, no ha sido lo suficientemente estudiada, por lo que poco se conoce en comparación a las arriba citadas. Sin embargo, con el conocimiento adquirido hasta la fecha, ha sido posible integrarla a diferentes campos de la salud, energía y ciencias de los materiales, dándole un futuro promisorio en materia de descubrimientos y desarrollos.

Asimismo, al no poseer herramientas ni técnicas analíticas propias, especialmente aquellas relacionadas a la síntesis química y enzimática, como si poseen el DNA y las proteínas, retrasan el avance en el conocimiento de las estructuras y de las funciones

que cumplen y, simultáneamente, permiten la utilización de dichas herramientas. Además, al no tener bases de datos similares a los ácidos nucleicos y proteínas, los avances y entendimientos de las estructuras y funciones de los diferentes glicanos se han visto obstaculizados.

A partir del proyecto Genoma humano y la profundización del conocimiento sobre el dogma central, se sabe que la glicosilación de proteínas, unas de las formas más comunes de modificación postraducciona, es muy importante para numerosos procesos biológicos funcionando como modulador de las actividades de las proteínas. De esta forma, asignándole una mayor importancia al estudio de los glicanos, permitirá entenderlos y resolverá diversos tipos de retos, asociados a la detección temprana del cáncer y de otras enfermedades, a través de la identificación de biomarcadores de las enfermedades; a la protección contra enfermedades infecciosas, como la influenza, por medio del conocimiento aumentado del rol de los glicanos en las interacciones huésped-patógenos y en la respuesta inmune; finalmente, en la creación de productos farmacéuticos, alimenticios y combustibles derivados de dichos carbohidratos, así como también su influencia en la ciencia de los materiales.

Para comprender la importancia que podría tener la investigación propuesta sobre las áreas disciplinares o campos de aplicación, basta con leer el informe "Transforming Glycoscience: A Roadmap for the Future", que el Consejo Nacional de Investigaciones de los Estados Unidos publicó el 16 de agosto de 2012 respecto a la importancia potencial de los glicanos y los azúcares raros en diversas áreas científicas (National Research Council, 2012). El informe revela que de las familias de las macromoléculas biológicas, son los azúcares los que han recibido menor atención por parte de los investigadores debido a la falta de herramientas para investigar sus propiedades y estructuras complejas y destaca la necesidad del desarrollo de métodos de transformación para la síntesis de carbohidratos y glicoconjugados. Los carbohidratos formando parte de las glicoproteínas y glicolípidos de las membranas celulares, desempeñan un papel clave en los procesos de comunicación de la célula con su entorno.

1.2. Campos de aplicación de los hidratos de carbono

La glicociencia posee una marcada influencia en cuatro áreas principales: salud, alimentos, energía y ciencia de los materiales. En salud humana, los hidratos de carbono están involucrados en innumerables procesos que son parte tanto de la fisiología normal, del desarrollo y del establecimiento de señales celulares (reconocimiento molecular) en conjunto como en la evolución de diversas enfermedades crónicas e infecciosas.

El glicoma, definido como la totalidad de los carbohidratos en una célula, engloba gran cantidad de información biológica clave complementando la presente en el ADN ayudando a completar la unión entre el genotipo y el fenotipo. De hecho, muchos avances en la comprensión de ciertas enfermedades son el resultado del conocimiento sobre ácidos nucleicos, proteínas y glicanos y como ellos varían en diferentes circunstancias, personas y edades. Sin embargo, poco se conoce de tales interacciones, por lo que avances relacionados en esta dirección, junto con los factores que influyen o alteran sus funciones, permitirán el desarrollo de nuevas medicinas y tratamientos terapéuticos tanto globales como persona específicos.

En forma paralela, los glicanos, especialmente aquellos presentes en las paredes celulares de las plantas (celulosa y hemicelulosa combinados en una matriz de otros biopolímeros) son capaces de proveer alternativas a los combustibles convencionales o fósiles, por lo que el aprovechamiento de dicha energía para la fabricación de biocombustibles es una opción atractiva, actualmente en desarrollo por numerosas naciones y estados dada la importancia del desarrollo energético para los mismos. Para que esto sea posible, es necesario un conocimiento completo de las membranas y paredes celulares de las plantas de modo de lograr una biodisponibilidad aumentada de dichos azúcares a través de la degradación o hidrólisis de dichas paredes.

El campo de aplicación más estudiado de los glicanos sea el asociado a las industrias alimenticias, dado que numerosos carbohidratos naturales o sintéticos, son empleados tanto en la fabricación de productos alimenticios como en su uso como ingredientes alimenticios, entre ellos los endulzantes o en productos con características prebióticas conteniendo fructo, gluco o galactooligosacáridos, sólo por mencionar algunos.

Los glicanos poliméricos (celulosa, quitina, almidón), dadas sus propiedades químicas y físicas, son factibles de ser utilizados en la creación de nuevos materiales, a través de su modificación o disposición en diversas formas, como es el caso de las micropartículas y nanopartículas. Asimismo, las modificaciones mediante reacciones químicas o enzimáticas efectuadas sobre dichos polímeros, permitirán obtener nuevas propiedades funcionales de los materiales y estudiar como los mismos interactúan en los sistemas biológicos. De esta forma, los materiales tipo glicanos son sustitutos potenciales para los plásticos derivados del petróleo, teniendo un amplio uso en diferentes aplicaciones industriales y medicina, como plataformas para el encapsulamiento y liberación controlada de diversas drogas, como estructuras soportes para la ingeniería de tejidos y para la elaboración de recubrimientos y films.

Los carbohidratos, a través de su estructura ramificada y el tipo especial de unión entre monómeros, poseen un contenido de información evolutiva estructuralmente diferente de varios órdenes de magnitud mayor para una secuencia corta en comparación a cualquier otro oligómero. Por lo tanto, un mayor nivel de información potencial es inherente a los sistemas de reconocimiento biológicos comprendidos por los ligandos complejos de carbohidratos y los receptores de proteína específicos de haptenos, tal como las lectinas. Asimismo, se ha comprobado que, el numero potencial de todos los posibles isómeros ramificados y lineales de pequeños oligosacáridos es mucho mayor al que ha sido estimado con anterioridad (Laine, 1994), por lo que son estructuras ideales para funcionar como ligandos en los sistemas de reconocimiento molecular, donde, tales estructuras están presentes en asociaciones de 6 monosacáridos o menos. Esto acontece debido a la presencia de 7 diferentes elementos estructurales, entre los más importantes: tipo de monosacárido (sustituido o no), presencia de grupos funcionales, tamaño del anillo, sitios de enlace múltiple en el anillo como puntos de unión glicosídica, anómeros α y β , configuración piranosa-furanosa y estructura de ramificación. Por ejemplo, para un trisacárido compuesto de tres hexosas, estos elementos permiten lograr un número mayor de 38.000 isómeros mientras que sólo es posible obtener 27 isómeros para 3 aminoácidos o para 3 ácidos nucleicos. La gran cantidad de isómeros potenciales que presentan los carbohidratos es debido a que los mismos no son creados a partir de una plantilla preformada, como es el caso del ADN y

las proteínas, sino a través de reacciones enzimáticas que dependen de varios factores, como la concentración de dichas enzimas y de sus respectivos sustratos. Así, el gran número de estructuras y la diversidad de formas en que los glicanos pueden interactuar con otras moléculas biológicas poseen una mayor variedad y variabilidad que la que puede ser explicada, al menos *a priori*, por el genoma. Sin embargo, estas características también presentan retos actuales en la investigación en todas las disciplinas relacionadas, principalmente, a partir del control y manipulación de los mismos tanto a nivel estructural como funcional.

1.3. La centralidad de los azúcares

Los azúcares se encuentran en forma ubicua, siendo, por lo tanto, esenciales para la existencia de la vida. El proceso bioquímico más importante es la fotosíntesis en plantas, algas y otros organismos que captan la energía solar para combinar el CO_2 y el H_2O para elaborar sus azúcares. Los azúcares más abundantes son, precisamente, aquellos producidos por las plantas, celulosa y almidón, ambos polímeros o glicanos de D-glucosa. La celulosa es el polímero estructural de las plantas y los árboles, así como también la materia prima para productos de vestimenta, papel y madera, además de resultar indigerible para los seres humanos (componente importante de nuestras dietas en forma de fibras no digeribles). Sin embargo, el almidón, que difiere sutilmente de la celulosa, es digerible a moléculas de D-glucosa, la materia prima de nuestras vías metabólicas. Básicamente, tanto nuestro metabolismo como el de todos los seres vivos, generan energía mediante la ruptura de la molécula de D-glucosa a H_2O y CO_2 , donde este último regresa al medio ambiente para volver a ser fijado. De esta manera, puede observarse que la D-glucosa es una molécula esencial para la vida. Sin embargo, también es central para la enfermedad. De hecho, la diabetes es una de las enfermedades más instauradas en el mundo, donde se calcula que, para 2030, a nivel mundial existirán 370 millones de personas afectadas por dicha enfermedad (Wild et al., 2004). Por otro lado, existen actualmente, en la Argentina, entre 400 y 500 enfermos de diabetes por cada 100.000 habitantes.

Sin embargo, la D-glucosa no es la única molécula de azúcar de importancia para la salud humana. Nuestras células transportan numerosas moléculas complejas de azúcar unidas entre ellas, los glicanos, uno de los cuatro tipos de macromoléculas esenciales para la vida que están involucradas en todos los aspectos de la medicina, biología y en un sinnúmero de aplicaciones prácticas. De hecho, tanto los ácidos nucleicos, como las proteínas y lípidos, en su mayoría, contienen glicanos ligados a sus estructuras, como es el caso de las ribosas o desoxirribosas, sólo por mencionar algunas.

De esta forma, todas las células vivas están cubiertas en sus membranas celulares con glicanos o incluyen polímeros tipo glicanos como componentes integrales de sus paredes celulares. Los mismos juegan diferentes roles, incluyendo funciones críticas en las áreas de señales celulares, reconocimiento molecular, inmunidad e inflamación. Por ejemplo, son las moléculas superficiales que definen a los grupos sanguíneos ABO influenciando en la habilidad de un individuo de aceptar sangre de otro ser humano. Los glicanos se encuentran unidos a locaciones específicas en numerosas proteínas, modulando aspectos de su actividad biológica a través de reconocimiento molecular o afectando el tiempo de circulación natural en los flujos sanguíneos. Asimismo, son componentes centrales del crecimiento de las plantas, así como también le brindan resistencia a la degradación del ambiente y de los microorganismos.

Los carbohidratos forman una de los grupos principales de biomoléculas, aunque en el pasado hayan estado eclipsadas por otros biopolímeros, incluyendo a los oligonucleótidos y a las proteínas. Avances actuales en glicoquímica y glicobiología han permitido el aislamiento y purificación de carbohidratos de fuentes naturales en mayor escala resultando en un mejor entendimiento de sus roles en procesos biológicos y enfermedades (Alper, 2001). Por lo tanto, dicho desarrollo ha renovado el interés en la química y biología de los carbohidratos, en particular en la utilización de carbohidratos en aplicaciones médicas. Asimismo, en los últimos años ha existido un incremento especial de los carbohidratos raros para su uso en medicina, tanto a partir de derivados sintéticos como semi-sintéticos, los cuales han sido utilizado principalmente como agentes antivirales (Mathé y Gosselin, 2006) y antibacterianos (Jütten y Greven, 1996). Además, los L-monosacáridos han demostrado, en particular, poseer propiedades

antineoplásicas, siendo útiles para todas las formas principales de la terapia contra el cáncer (Bicher, 1994; Forsman y Leino, 2011).

1.4. Azúcares raros

Entre los glicanos o azúcares con una mayor aplicabilidad, además de poseer potencialidad, no sólo en el campo de los alimentos, sino también en la medicina, se encuentran los llamados azúcares raros. Estos son monosacáridos y derivados de los mismos que son poco comunes o se los encuentra raramente en la naturaleza (Tang, 2012). Es importante aclarar que, de todas las hexosas y pentosas, sólo siete (D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-fructosa, D-xilosa, D-ribosa y L-arabinosa) se encuentran presentes en cantidades significativas en la naturaleza. Asimismo, presentan varias funciones biológicas conocidas y con un gran potencial para su utilización en industrias de flavours, cosméticas, de alimentos y farmacéuticas (Levin et al., 1995; Granström et al., 2007a,b; Hoshikawa et al., 2011; Mu et al., 2012).

Entre sus aplicaciones principales, se encuentran aquellas asociadas a la industria de los nutraceuticos (aditivos con propiedades funcionales), donde se han empleado azúcares raros como D-manosa, D-galactosa, D-tagatosa, L-arabinosa, D-xilosa y L-fucosa para la elaboración de bebidas para atletas y alimentos para animales y humanos con propiedades protectoras de la salud (tracto urinario y sistema renal, por mencionar sólo algunas). Además, también son muy empleados como endulzantes y en la industria farmacéutica como precursores de una amplia variedad de drogas, en particular, L-ribosa, L-fucosa, L-xilosa, D-alosa, D-celobiosa y L-glucosa, incluyendo análogos de nucleósidos empleados como antivirales (Forsman y Leino, 2011), como agentes anticancerígenos y antiinflamatorios, como oligosacáridos complejos y como monosacáridos propiamente dichos.

Por otro lado, el empleo de L-nucleósidos se ha visto incrementado dramáticamente debido a su potencial actividad biológica, mejor estabilidad metabólica y menor toxicidad en relación a los D-nucleósidos (Cho et al., 2005). Por ejemplo, la L-ribosa, es empleado para sintetizar clevidina, una droga para el tratamiento de la

hepatitis B (Chu et al., 1995; Mathé y Gosselin, 2006), la L-xilosa también se usa para producir nucleósidos del tipo 9-(2-desoxi-2-fluoro- β -L-arabinofuranosil) purina, empleadas también para el tratamiento del virus de la hepatitis B (Ma et al., 1997). Asimismo, la L-gulosa y la L-galactosa pueden ser empleadas para producir L-nucleósidos (Jeong et al., 1993; Woodyer et al., 2010). Además, la D-alosa ha atraído mucha atención debido a su probada actividad biológica como agente antitumoral, antiinflamatorio, antioxidante e inmunosupresor (Lim y Oh, 2011). También, los azúcares raros, pueden emplearse como materiales de partida para sintetizar otros compuestos valiosos, como es el caso de la D-arabinosa, empleada para producir derivados de dehidroaminoácidos utilizados como compuestos antitumorales (Moran et al., 1993; Yoshikawa et al., 1993).

1.4.1. Producción enzimática de los azúcares raros

Como los mencionados azúcares se encuentran sólo en pequeñas cantidades en la naturaleza, sus propiedades no han sido estudiadas en forma completa. En este sentido, la investigación de la síntesis de los mencionados azúcares conducirá a su estudio y consecuente aplicación. Así, dado que los carbohidratos contienen múltiples centros quirales de carbono, la síntesis química de los mismos se convierte en tediosa y larga, por lo tanto, no siendo recomendable. De esta manera, la síntesis enzimática es la más adecuada para la producción de dichos carbohidratos dada la estereoespecificidad que presenta. Es en esta dirección hacia donde el grupo de investigación que lidera Ken Izumori ha estado desarrollando estrategias para la preparación de todas las hexosas a partir de D-glucosa, proceso denominado por ellos mismos como Izumoring (Gramström et al., 2004; Izumori, 2006). En este ciclo de interconversiones intervienen oxidorreductasas, aldosa-cetosa isomerasas y epimerasas. Asimismo, han sido descritas las estrategias de síntesis de las pentosas, tal como ha sido desarrollado por Beerens et al., (2012).

Sin embargo, como principal desventaja a esta estrategia se encuentra el hecho de que los azúcares raros son innecesarios para los organismos, pudiendo, en todo caso, llegar a ser productos menores o subproductos de reacciones enzimáticas siendo

insuficiente, la producción de dichos azúcares, por lo que deberán efectuarse estudios que profundicen las eficiencias catalíticas de las diversas enzimas potencialmente involucradas.

De esta forma, para producir cantidades sustanciales de azúcares raros, nuevas enzimas con mayores eficiencias catalíticas hacia los azúcares de interés, deberán ser aisladas por diversas metodologías o modificadas, a partir de las ya existentes, por ingeniería, de modo de incrementar sus bajas actividades. Es así como las estrategias de evolución directa han probado ser técnicas interesantes para aumentar la actividad o la selectividad de varias enzimas. Por ejemplo, la ingeniería de la enzima manitol- L-deshidrogenasa NAD dependiente de *Apium graveolens* mediante mutagénesis al azar ha incrementado la estabilidad térmica de la enzima y, por ende, aumentó la producción de L-gulosa y L-galactosa a partir de D-sorbitol y galactitol, respectivamente (Woodyer et al., 2010). En síntesis, tanto la búsqueda de enzimas más selectivas y activas catalíticamente como su modificación por ingeniería genética, serán las herramientas del futuro para incrementar el rendimiento de producción de los azúcares raros de interés.

Por tal motivo, el desarrollo de bioprocesos para la obtención de azúcares raros como la D-tagatosa puede abrir una importante ruta para el desarrollo de glicanos con nuevas propiedades farmacológicas.

1.5. D-tagatosa

Dentro de la totalidad de los azúcares raros, la D-tagatosa es uno de los más estudiados y, simultáneamente, poseedor de una ductilidad, un perfil de propiedades y numerosos campos de aplicación únicos tanto en el mercado de los edulcorantes con propiedades funcionales (nutraceúticos), convirtiéndola en la potencial azúcar de mesa del futuro, como también en el sector farmacéutico siendo un promisorio adyuvante de drogas para el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas la diabetes y obesidad (Lu et al., 2008; Espinosa y Fogelfeld, 2010).

Entre sus aplicaciones, es utilizada como un edulcorante saludable bajo en calorías en alimentos, productos de confitería, suplementos dietarios y bebidas (Levin, 2002; Oh, 2007), además de ser útil como intermediario en la síntesis de otros compuestos ópticamente activos, en preparaciones cosméticas y en detergentes.

1.5.1. Producción química de D-tagatosa

Industrialmente, la D-tagatosa es producida químicamente a partir de la lactosa en un proceso de dos pasos. En el primer paso, la lactosa es enzimáticamente hidrolizada a D-galactosa y D-glucosa. En el segundo paso, la D-galactosa es isomerizada a D-tagatosa bajo condiciones alcalinas (pH 12) usando hidróxido de calcio como agente acomplejante (Beadle et al., 1992).

La desventaja que tiene este proceso es que toda isomerización química es inespecífica y, por ende, lleva a la formación de subproductos no deseados, aromas indeseables y desechos químicos. Además, a través de esta vía se ha comprobado una reducción de la dulzura de la D-tagatosa.

1.5.2. Producción biológica de D-tagatosa

Las enzimas que catalizan las reacciones de isomerización (isomerasas) se han convertido en moléculas biológicas tecnológicamente interesantes, debido a que juegan una función pivote dentro del ciclo de Izumoring en la biosíntesis de azúcares raros o no comunes (Granström et al., 2004; Izumori, 2002; Izumori, 2006) permitiendo producir dichos azúcares en la cantidad que sea necesaria dada su baja concentración y disminuyendo, simultáneamente, sus elevados costos.

Aunque la mayoría de los L-nucleósidos pueden sintetizarse de la L-ribosa (Ahmed et al., 1999), este importante precursor para la síntesis de drogas antivirales, no está disponible en cantidades abundantes en la naturaleza (Akagi et al., 2002) y, por ende, debe de sintetizarse químicamente (Yun et al., 2005). Una de las posibilidades alternativas para la síntesis de L-ribosa está basada en la isomerización enzimática de la L-ribulosa (Zakaria, 2001; Helanto et al., 2007; Helanto et al., 2009) donde, la enzima

L-arabinosa isomerasa, intervendría en la producción de dicha cetopentosa a partir de L-arabinosa, un azúcar mucho más económico y disponible en mayores cantidades en la naturaleza (Yeom et al., 2008). Por su parte, el proceso enzimático de obtención del cetozúcar tiene las ventajas de utilizar condiciones de temperatura y pH más suaves, además de no formar productos secundarios, indicando que la reacción de isomerización enzimática es altamente específica.

Asimismo, como para el fin perseguido, no se busca una enzima con actividad *in vitro* hacia la L-arabinosa, sino una enzima altamente específica hacia el sustrato de interés, D-galactosa, de manera de poder trabajar directamente con desechos orgánicos que contengan la mencionada aldohexosa, entre ellos el lactosuero, por lo que esta alternativa de uso de la enzima L-arabinosa isomerasa, no ha sido profundizada en este trabajo de tesis, aunque haya sido desarrollada por otros grupos, como es el caso de la enzima L-arabinosa isomerasa proveniente de *Bacillus licheniformis* (Prabhu et al., 2008; Kim et al., 2009; Prabhu et al., 2010a; Zhou y Wu, 2012).

Si bien hay varios grupos de investigación estudiando extensivamente la isomerización enzimática de la D-tagatosa a partir de la D-galactosa utilizando la enzima L-arabinosa isomerasa, no existe aún un método enzimático de producción industrial de esta cetohexosa.

Es por ello que se ha decidido encarar la conversión enzimática del aldazúcar D-galactosa, proveniente de la hidrólisis enzimática previa de la D-lactosa, a D-tagatosa, una cetohexosa de alto valor agregado, utilizando la enzima L-arabinosa isomerasa. Dado que esta enzima no se encuentra disponible en forma comercial, es necesario obtenerla a través del cultivo de microorganismos identificados como productores de dicha enzima.

Además, la manufactura bioquímica de D-tagatosa a partir de D-galactosa, empleando la enzima L-arabinosa isomerasa, ha estado siendo estudiada, en los últimos años, en forma extensiva en ciertos microorganismos, especialmente aquellos provenientes de ambientes de condiciones extremas (altas temperaturas y concentraciones salinas).

En la selección de los microorganismos productores de la enzima caracterizados hasta el momento, han primado ciertos criterios tecnológicos relacionados con el comportamiento de la enzima frente a la temperatura, tales como termoestabilidad y temperaturas óptimas elevadas, ya que esto permitiría acelerar la cinética del proceso de isomerización como así también lograr mayores rendimientos de conversión (Lee et al., 2005b). Sin embargo, esto no beneficia otros aspectos esenciales para el adecuado desarrollo tecnológico de dicho proceso. En primer lugar, como dichos organismos son de características termofílicas o hipertermofílicas (*Thermotoga maritima* y *T. neapolitana*, por mencionar sólo algunos), han sido aislados de ambientes extremos no seguros y no inocuos (Lee et al., 2004; Kim et al., 2002); en segundo lugar, los mismos poseen cinéticas de crecimiento tan bajas, que la producción no recombinante de dicha enzima se vuelve inviable, de esta forma, el gen que codifica a la enzima, debe ser extraído, acondicionado y transformado a un huésped heterólogo, con las consecuencias higiénicas sanitarias, entre otras, que implica la utilización de la tecnología del DNA recombinante, debido a que la aplicación de la mencionada tecnología trae aparejado el hecho de que los organismos huéspedes utilizados por excelencia en la ingeniería genética, no poseen status GRAS (por ejemplo, *E. coli*). En definitiva, la producción de D-tagatosa tanto por células como por enzimas provenientes de huéspedes no reconocidos como GRAS pueden causar problemas de seguridad y sanitarios, por lo que su aplicabilidad tecnológica en forma directa es escasa para obtener un producto de uso en alimentación humana (Burdock y Carabin, 2004).

Por otra parte, dado que el proceso de isomerización es comercialmente viable, la mayor parte de la información pertinente sobre la L-arabinosa isomerasa ha sido documentada recientemente en diferentes patentes (Boudebouze et al., 2011). Los trabajos de Oh et al., (1998), muestran que, ya desde finales de la década del '90, se han posicionado como uno de los grupos líderes en el diseño de procesos enzimáticos para la producción de D-tagatosa. Como ejemplo, resulta de interés mencionar que Kim et al., (2003a) pudieron producir 230 g l⁻¹ de D-tagatosa utilizando un reactor con reciclo de sustrato con la enzima L-arabinosa isomerasa proveniente de *Geobacillus stearothermophilus* inmovilizada, resultados que se acercan a criterios comerciales aceptables debido a la alta concentración de D-tagatosa lograda.

La alternativa propuesta en la presente tesis, ha consistido en la producción en forma no recombinante de la enzima L-arabinosa isomerasa empleando organismos que sean considerados como seguros para su uso y consumo (GRAS). Además, resulta de especial interés, trabajar con microorganismos pertenecientes al denominado grupo de bacterias del ácido láctico, no sólo porque que las mismas son consideradas bacterias GRAS, sino por ser utilizadas permanentemente en la fabricación de innumerables alimentos debido a su alta tasa de crecimiento a temperaturas medias, entre sus propiedades fisicoquímicas más relevantes. Así, producir la enzima L-arabinosa isomerasa aislada de dichos organismos mesófilos y GRAS, y que posea una adecuada cinética de conversión a D-tagatosa, nos permitirá desarrollar un proceso tecnológico mucho más viable para obtener un producto o aditivo de uso en alimentación humana, así como también la elaboración de productos fermentados con la cepa seleccionada y oportunamente estudiada (Hugenholtz y Smid, 2002; Hugenholtz et al., 2002).

Capítulo 2.

Objetivos

El objetivo general de esta Tesis fue: **Obtener, purificar y caracterizar preparados activos de la enzima L-arabinosa isomerasa (EC 5.3.1.4) aislada de cepas bacterianas no recombinantes. Analizar y profundizar los aspectos básicos y aplicados involucrados en el proceso de bioconversión *in vitro* de la D-galactosa en D-tagatosa.**

De esta forma, para lograr obtener los correspondientes preparados activos de la enzima L-arabinosa isomerasa, en primer lugar, el organismo bacteriano debe aislarse, producir la enzima a partir de dicha bacteria y purificarla en forma parcial como paso previo a su exhaustivo estudio. Así, en el presente trabajo de Tesis, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

- Aislar, seleccionar y caracterizar cepas de microorganismos metabolizadores del azúcar L-arabinosa.
- Diseñar y optimizar medios de cultivo de manera de maximizar la producción de la enzima buscada.
- Estudiar y optimizar el proceso de elaboración del extracto libre de células para la producción de la enzima L-arabinosa isomerasa.
- Analizar, seleccionar y aplicar técnicas de purificación para obtener preparaciones activas de la enzima con elevada pureza.
- Caracterizar física, química y termodinámicamente las diferentes preparaciones purificadas de la enzima L-arabinosa isomerasa obtenidas.
- Analizar, caracterizar y optimizar el proceso enzimático de bioconversión de D-galactosa en D-tagatosa en fase homogénea.
- Estudiar el proceso de formación de geles de quitosano y analizar las diferentes vías químicas para producir la inmovilización de la enzima L-arabinosa isomerasa mediante la formación de enlaces covalentes en forma multipuntual.
- Sintetizar y caracterizar en base a actividad y estabilidad nuevos biocatalizadores, inmovilizando la enzima L-arabinosa isomerasa en diferentes

soportes insolubles. Selección de aquellos con mejor comportamiento en las condiciones de reacción establecidas.

- Estudiar y comparar el comportamiento de dichos biocatalizadores en el proceso de transformación de D-galactosa en D--tagatosa.

Capítulo 3.

Fundamentos

Teóricos

3.1. Producción biocatalítica de azúcares raros

La sociedad internacional de azúcares raros (ISRS) ha clasificado a los monosacáridos y sus derivados de acuerdo a su abundancia en la naturaleza (Granström et al., 2004). En dicha clasificación, de todas las hexosas y pentosas, sólo 7 fueron consideradas que están presentes en cantidades significativas (D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-fructosa, D-xilosa, L-ribosa y L-arabinosa), mientras que 20 hexosas y 9 pentosas han sido incluidas dentro de los azúcares raros. Por otro lado, todas las tetrasas son consideradas azúcares raros. Asimismo, otros azúcares raros son aquellos incluidos dentro del grupo de los monosacáridos desoxigenados, los cuales suelen funcionar como elementos de reconocimientos de receptores o moléculas bioactivas, o con modificaciones secundarias, como aminación o metilación (Graber et al., 1988; Trefzer et al., 1999). Por su condición, no pueden ser extraídos de fuentes naturales y por lo tanto, deben ser producidos a través de reacciones químicas o bioquímicas, aunque algunos, como la D-xilulosa y la D-sorbosa, se encuentran disponibles comercialmente. Asimismo, a pesar de su baja abundancia, los mismos presentan un gran potencial para diferentes aplicaciones, tal como puede observarse en la **Tabla 3.1**.

De esta manera, la búsqueda de rutas eficientes de producción de estos compuestos incrementará su disponibilidad para diferentes propósitos (Granström et al., 2004).

Tabla 3.1. Aplicaciones de los diferentes azúcares raros de cinco y seis carbonos (adaptado de Ahmed, 2001 y Beerens et al., 2012).

Azúcar	Aplicaciones
D-alosa	Tratamiento del cáncer, en particular la leucemia mieloide crónica (Naha et al., 2008)
	Supresión de la formación del trombo y del daño por reperfusión (Hossain et al., 2004)
	Crioprotector para células de mamíferos y órganos

	Inmunosupresor
D-altrosa	Síntesis de carbamatos cíclicos de glicosaminas derivadas (química polimérica)
D-arabinosa	Síntesis de compuestos antitumorales, tal como derivados dehidroaminoacídicos Producción de ácido eritroascórbico y ácido oxálico
D-gulosa	Agente para formulación de drogas y aditivo alimentario
D-idosa	Síntesis de carbamatos cíclicos de glicosaminas derivadas (química polimérica)
D-lixosa	Síntesis de agentes antitumorales e inmunomodulatorios
D-psicosa	Endulzante sin calorías, tratamiento de la diabetes (Baek et al., 2010) Potencial antihelmíntico (Sato et al., 2008) Precursor de las xilosilpsicosas (usadas como prebióticas, cosméticas y terapéuticas)
D-ribulosa	Material de partida para pentosas ramificadas (útil en química farmacéutica)
D-sorbosa	Bloque constructor para productos bioactivos e industriales Agente de control de insectos
D-tagatosa	Endulzante bajo en calorías, tratamiento de la diabetes Contribución a la salud humana (antiplaca, prebiótico) Aditivo en detergentes, cosméticos y formulaciones farmacéuticas
D-talosa	Actividades antimicrobianas y antitumorales, marcador de los antígenos O

D-xilulosa	Material de partida para pentosas ramificadas (útil en química farmacéutica)
L-alosa	Agente terapéutico para enfermedades que involucran vasculogénesis (Arnold y Siladi, 1997)
L-altrosa	Componente de oligo- y polisacáridos importantes biológicamente
L-fructosa	Inhibidor potencial de varias glucosidasas Mezclas de L- y D-fructosa matan hormigas y moscas domésticas
L-galactosa	Potencial en la síntesis de medicamentos antivirales basados en L-nucleósidos Componentes de las saponinas, con aplicaciones en alimentos, cosméticos y farmacéuticos
L-glucosa	Material de partida para vacunas glicoconjugadas contra enfermedades causadas por <i>Shigella sonnei</i> Propiedades citotóxicas y citoestáticas hacia células neoplásicas (terapia contra el cáncer)
L-gulosa	Bloque de construcción de la bleomicina A ₂ , un antibiótico glicopeptídico (y potencial agente anticáncer) Síntesis de nucleósidos que exhiben una potente actividad contra los virus HIV y de la hepatitis B Material de partida para la producción de medicamentos antivirales basados en L-nucleósidos
L-idosa	Sus derivados son empleados en la síntesis de sustancias sensibles a la α -L-iduronidasa Sus derivados son usados como donantes glicosilos en la síntesis de

	oligosacáridos de heparina
L-lixosa	Componente del antibiótico avilamicina A Potencial inhibidor de la L-fucosidasa
L-manosa	Componente de glicósidos esteroideos
L-psicosa	Material de partida para la producción de L-fructosa
L-ribosa	Bloque de partida para la síntesis de L-nucleósidos anticancerígenos y antivirales Bloque de partida para la síntesis de glicoconjugados, oligonucleótidos y L-aptámeros
L-ribulosa	Material de partida para la producción de L-ribosa
L-sorbosa	Material de partida para la producción de L-tagatosa Precursor de la síntesis del inhibidor de la glicosidasa, L-desoxigalactonojirimicina Material de partida para la producción de ácido L-ascórbico (vitamina C) Material de partida para la síntesis de L-talitol
L-tagatosa	Potencial como endulzante funcional (Itoh e Izumori, 1996) Potencial en quimioterapia Precursor de materiales complejos, como 1,2,3,4-diisopropilideno tagatofuranosa Material de partida para la síntesis de L-desoxigalactonojirimicina
L-talosa	Precursor de nucleósidos de L-talosa, inhibidor <i>in vitro</i> del crecimiento de células de leucemia L1210

L-xilosa	Material de partida para la síntesis de nucleósidos contra el virus de la hepatitis B Síntesis de derivados de la L-ribofuranosa
L-xilulosa	Inhibidor potencial de varias glicosidasas Síntesis de L-xilosa y L-lixosa Indicador de hepatitis o cirrosis hepática

Al analizar brevemente la **Tabla 3.1**, puede apreciarse que la L-ribosa interviene en la síntesis de numerosas drogas anticancerígenas e infecciones virales siendo su aplicación más importante, la terapia antiviral, donde el mismo es incorporado en análogos de L-nucleósidos (Gumina et al., 2001), dado que poseen actividad antiviral aumentada, mejor estabilidad metabólica y perfiles toxicológicos más favorables. Es por ello que, desde el descubrimiento de la lamivudina (2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina o 3TC), numerosos análogos de L-nucleósidos están siendo experimentados en pruebas clínicas o estudio preclínicos, mientras que otros azúcares como la L-gulosa, L-xilosa y L-galactosa podrían ser usados para producir L-nucleósidos (Ma et al., 1997; Woodyer et al., 2008), así como también inhibidores (Leang et al., 2003) e insecticidas (Ahmed, 2001).

3.2. Interconversiones enzimáticas para la producción de azúcares raros

Para la realización concreta de las transformaciones enzimáticas propuestas por el ciclo de Izumoring, a nivel bioquímico, se han identificado tres tipos de respuestas metabólicas indispensables para lograr la interconversión correspondiente entre todos los azúcares monosacáridicos arriba descritos en el menor número de reacciones posibles, lo que implica la utilización de tres grupos diferentes de enzimas (**Figura 3.1**). El primer grupo son las aldosa-cetosa isomerasas (EC 5.3.1.X), que catalizan una reacción redox intramolecular, intercambiando el grupo funcional carbonilo entre las posiciones C-1 y C-2 (Izumori, 2006); el segundo grupo está constituido por las

carbohidrato epimerasas (EC 5.1.3.X), las cuales catalizan la reorientación de un grupo hidroxilo, convirtiendo al sustrato en uno de sus epímeros (Samuel y Tanner, 2002); y, el tercer grupo, engloba a las oxidoreductasas (EC 1.1.X.X), las cuales convierten los carbohidratos en sus correspondientes polioles y viceversa (Usvalampi et al., 2009). Asimismo, las oxidoreductasas que actúan sobre cetosas son también denominadas poliol deshidrogenasas, mientras que aquellas que actúan sobre las aldosas son conocidas como aldosa reductasas (Granström et al., 2004).

Un análisis detallado de las funciones de las enzimas revela que, en general, las isomerasas son biocatalizadores ambiguos activos hacia un rango simple de sustratos, donde, dicha promiscuidad puede traer aparejada la formación de productos secundarios complicando el posterior procesamiento downstream, tal como ocurre con la D-glucosa-6-fosfato isomerasa de *Pyrococcus furiosus*, que convierte L-tagatosa a L-talosa y a L-galactosa (Yoon et al., 2009). Por otro lado, las epimerasas son las enzimas más importantes y utilizadas en el ciclo de producción de los azúcares raros, ya que permiten el acceso a las diferentes estructuras, en contraste con las isomerasas y las oxidoreductasas cuyas modificaciones están limitadas a las posiciones C-1 y C-2 (**Tabla 3.2**).

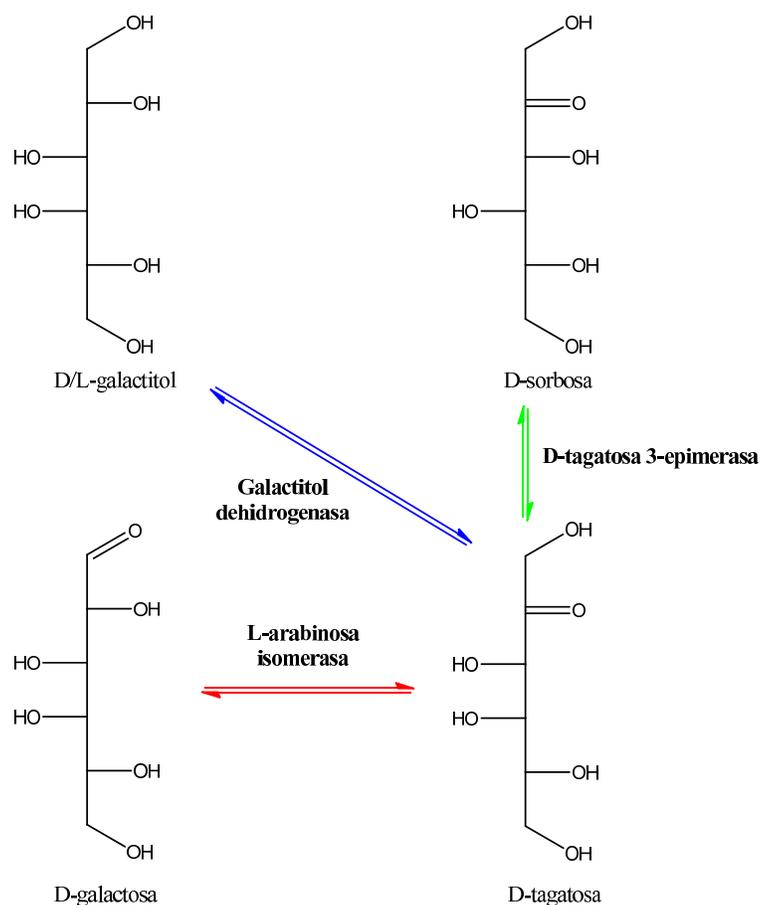


Figura 3.1. Formas de interconversión enzimática de las tres diferentes de clases de enzima que pueden emplearse en la producción de azúcares raros tomando como ejemplo la conversión enzimática de D-galactosa.

Sin embargo, su principal desventaja es que son activas sólo sobre azúcares sustituidos con un grupo fosfato o un nucleótido, lo cual incrementa drásticamente los costos de producción. Por ejemplo, una excepción muy interesante es la D-tagatosa 3-epimerasa, que cataliza la epimerización de todas las cetohechosas y cetopentosas en la posición C-3, lo que ha permitido la producción de D-psicosa a partir de D-fructosa (Itoh et al., 1995; Takeshita et al., 2000b). De esta manera, la identificación de nuevas epimerasas facilitará la creación de atajos en las rutas sintéticas actuales. Por ejemplo, la D-glucosa podría funcionar como un sustrato económico para la biosíntesis de L-idosa en una sola reacción empleando una 5-epimerasa en vez de efectuar un proceso de tres

reacciones enzimáticas, que es la ruta más corta descrita hasta el momento. En este sentido, sólo han sido caracterizadas cuatro epimerasas de carbohidratos que han mostrado ser activas naturalmente hacia azúcares no sustituidos. Ellas son la mencionada D-tagatosa-3-epimerasa, la celobiosa 2-epimerasa, la UDP-galactosa-4-epimerasa (Kim et al., 2011) y la L-ribulosa-5-fosfato-4-epimerasa.

Tabla 3.2. Ventajas y desventajas de las tres clases de enzimas utilizadas en la producción de azúcares raros.

Enzima	Ventajas	Desventajas
Isomerasas	Sustratos usualmente no sustituidos Amplia especificidad de sustrato	Es usual la formación de mezclas de productos
Epimerasas	Atajo en la ruta sintética Puente potencial entre los azúcares D- y L-.	Sustratos usualmente no sustituidos Estricta especificidad de sustrato
Oxidoreductasas	Sustratos usualmente no sustituidos Puente entre los azúcares D- y L-.	Necesidad de regeneración del cofactor

II

Pentosas

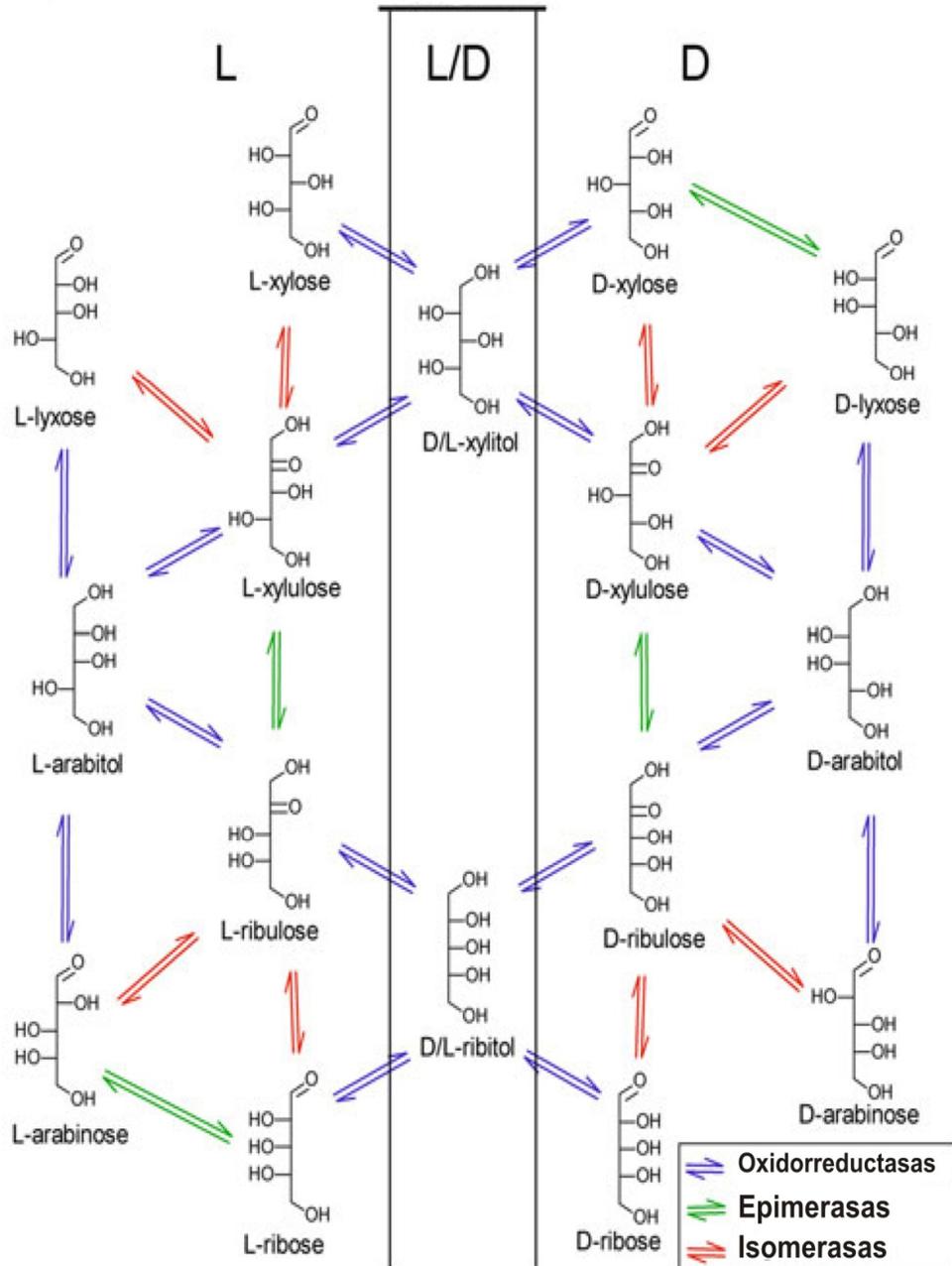


Figura 3.3. Visión general de las interconversiones enzimáticas (proceso de Izumoring) de las pentosas no modificadas. Adaptado de Granström et al., (2004).

Sin embargo, los azúcares D pueden convertirse a sus correspondientes azúcares L empleando los correspondientes polioles como intermediarios. En este sentido, las oxidoreductasas pueden utilizarse en un proceso de dos pasos, reducción del azúcar seguido por oxidación del poliol (**Figura 3.2** y **Figura 3.3**). De todas formas, ciertos polioles, como el xilitol y el sorbitol, son en sí compuestos valiosos económicamente, dado que son empleados como endulzantes con efecto refrescante (Granström et al., 2007a,b). Asimismo, la principal desventaja de las oxidoreductasas es que precisan de cofactor para su regeneración, en general NAD(P)H. Por lo tanto, estas reacciones son usualmente realizadas dentro de las células, donde el metabolismo celular provee el poder reductivo. Asimismo, existe la posibilidad de utilizar sistemas de regeneración cofactor específicos en caso de que las enzimas hayan sido aisladas con anterioridad (Huwig et al., 1997; Demir et al., 2011).

3.2.1. Aldosa-cetosa isomerasas para la producción de azúcares raros

Debido a que la especificidad de estas enzimas suele ser amplia, pueden aplicarse en la síntesis de las cetosas y/o aldosas a partir de la materia prima más económica. Esta falta de especificidad puede ser apreciada en el clásico ejemplo de la D-xilosa isomerasa en la producción de jarabe de alta D-fructosa a partir de D-glucosa, presentando mejor isomerización D-glucosa/D-fructosa que hacia su sustrato natural D-xilosa/D-xilulosa. Además, otro ejemplo concreto es la enzima D-lixosa isomerasa de *Providencia stuartii*, la cual es activa no sólo para el par D-lixosa/D-xilulosa sino para otros 9 pares de aldosa/cetosas. La mayor actividad de esta enzima ha sido detectada sobre los grupos aldosa con los grupos hidroxilos C-2 y C-3 en configuración L, al igual que en el sustrato natural, sin embargo, muy poca actividad sobre los sustratos especulares ha sido observada, como en el caso de la L-lixosa y la L-manosa (Kwon et al., 2010).

Asimismo, se ha comprobado que varias isomerasas naturalmente activas hacia sustratos fosforilados han convertido carbohidratos libres utilizando diferentes sustratos, entre ellas, la ribosa-5-fosfato isomerasa (Park et al., 2011b; Yeom et al., 2011b) y la manosa-6-fosfato isomerasa (Yeom et al., 2009a,b).

La segunda característica más importante a tener en cuenta con esta clase de enzimas, es su especificidad hacia una de las dos aldosas. Si la enzima no es lo

suficientemente específica, se obtendrán mezclas conteniendo tres azúcares, por ello su selección adecuada es un parámetro muy importante, dado que llevará a mejores rendimientos y a una purificación más fácil del producto, reduciendo los correspondientes costos. En este sentido, la enzima L-ramnosa isomerasa de *B. pallidus* (Poonperm et al., 2007a,b) y D-glucosa-6-fosfato isomerasa de *Pyrococcus furiosus* (Yoon et al., 2009) presentan esta no muy deseable propiedad, por lo que su potencial uso tecnológico, se ha visto drásticamente disminuido.

Las enzimas isomerasas utilizadas actualmente o con gran potencial en la síntesis de azúcares raros, son mencionadas a continuación.

3.2.1.1. Isomerasas para la producción de L-ribosa

Se han caracterizado varias enzimas que catalizan la producción de L-ribosa a partir de diferentes sustratos, tales como manosa-6-fosfato isomerasa (Yeom et al., 2011a) y L-ribosa isomerasa (Mizanur et al., 2001) arrojando resultados prometedores. Sin embargo, aún no ha sido caracterizado ningún proceso de producción de estos azúcares.

3.2.1.2. Isomerasas para azúcares modificados y desoxiazúcares

Las enzimas L-ramnosa isomerasa (Leang et al., 2004a,b), L-fucosa isomerasa (Ju y Oh, 2010) y D-xilosa isomerasa (Hausler y Stutz, 2001; Rao et al., 2009) prefieren desoxiazúcares como sustratos. Además, pueden tolerar otras modificaciones en los centros mayores que el C-3 y utilizar azúcares epiméricos o funcionalizados como sustratos, por lo que poseen una aplicación futura para la producción de azúcares modificados.

3.2.1.3. L-arabinosa isomerasa para la producción de D-tagatosa

En los últimos años, dicha enzima ha sido estudiada extensivamente debido a su potencial aplicación industrial en la producción biológica del azúcar raro, D-tagatosa (Prabhu et al., 2008; Cheng et al., 2010a,b).

3.3. D-tagatosa

3.3.1. Generalidades

La D-tagatosa (**Figura 3.4**) es un monosacárido enantiómero de la D-fructosa (inversión en el C-4), que ha sido introducida como un agente endulzante bajo en calorías, presentando un valor calórico de 1,5 kcal/g (Levin et al., 1995; Patra et al., 2009). Su apariencia como polvo cristalino resulta similar al de la sacarosa presentando un 92% de dulzura respecto a la misma, de acuerdo a una prueba equivalente de sabor de endulzantes (Lawless y Heymann, 1998).

Aparece naturalmente en baja cantidad en una goma producida por el árbol *Sterculia setigera*, como así también en pequeñas cantidades en diversos alimentos tratados térmicamente como leche de vaca en polvo y esterilizada, cacao caliente, donde es originado por la isomerización química de la D-galactosa (Troyano et al., 1991; 1992). También se la encuentra en una variedad de quesos, yogures, otros productos lácteos (Richards y Chandrasekhara, 1960; Troyano et al., 1996; Mendoza et al., 2005) y en diversos alimentos, tal como se observa en la **Tabla 3.3**.

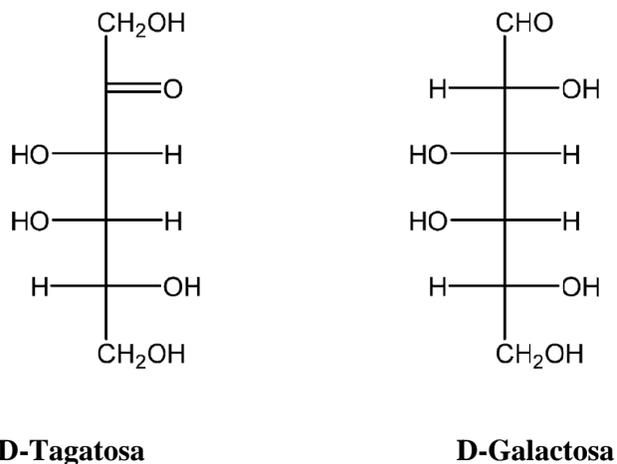


Figura 3.4. Configuraciones químicas de los azúcares de interés.

Tabla 3.3. Ocurrencia natural de D-tagatosa en diferentes alimentos (Adaptado de Mitchell, 2007).

Alimento	[D-tagatosa] (mg/kg)
Manzana	3500
Ananá	1800
Naranja	1500
Concentrado de arándanos	800
Pasas de uva	700
Dátiles	700
Trigo integral	100
Legumbres secas	100
Árbol tropical de dátiles (<i>Sterculia setigera</i>)	30% del azúcar
Leche de vaca esterilizada	2000-3000
Leche de vaca en polvo	800
Leche con cacao caliente	140-1000
Leche UHT	5
Fórmula infantil Enfamil [®]	23
Yogurt natural BA [®]	29
Queso Roquefort	20

Queso Feta	17
Queso Gjetost	15
Queso parmesano	10
Metabolito de <i>Lactobacillus</i> y <i>Streptococcus</i>	Rango variable

3.3.2. Metabolismo

La D-tagatosa es catabolizada a través la vía de la tagatosa-6-fosfato (**Figura 3.5**), una rama del metabolismo de la D-galactosa presente en algunos microorganismos, entre los que podemos mencionar: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus mutans*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Shiota et al., 1962; Bissett y Anderson, 1974a,b; Thomas, 1975; Hamilton y Lebttag, 1979; Bissett et al., 1980; Bissett y Anderson, 1980a,b; Anderson y Bissett, 1982a,b; Anderson y Markwell, 1982; Szumilo y Russa, 1982; Crow et al., 1983; Yu et al., 1990; Rosey et al., 1991). En dicha vía, la galactosa-6-fosfato es degradada a los intermediarios de la glicólisis, dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, a partir de la acción en serie de las enzimas galactosa-6-fosfato isomerasa, tagatosa-6-fosfato-quinasa y tagatosa difosfato aldolasa. La vía de la tagatosa-6-fosfato conduce a la fructosa-1,6-bifosfato, que actúa como intermediario regulatorio del flujo de carbono central y de la velocidad de crecimiento (Bond et al., 1998). Aun cuando se metaboliza la D-tagatosa como única fuente de carbono, se piensa que la misma es fosforilada por la hexoquinasa para dar D-tagatosa-6-fosfato y luego ingresar al ciclo metabólico de la D-galactosa.

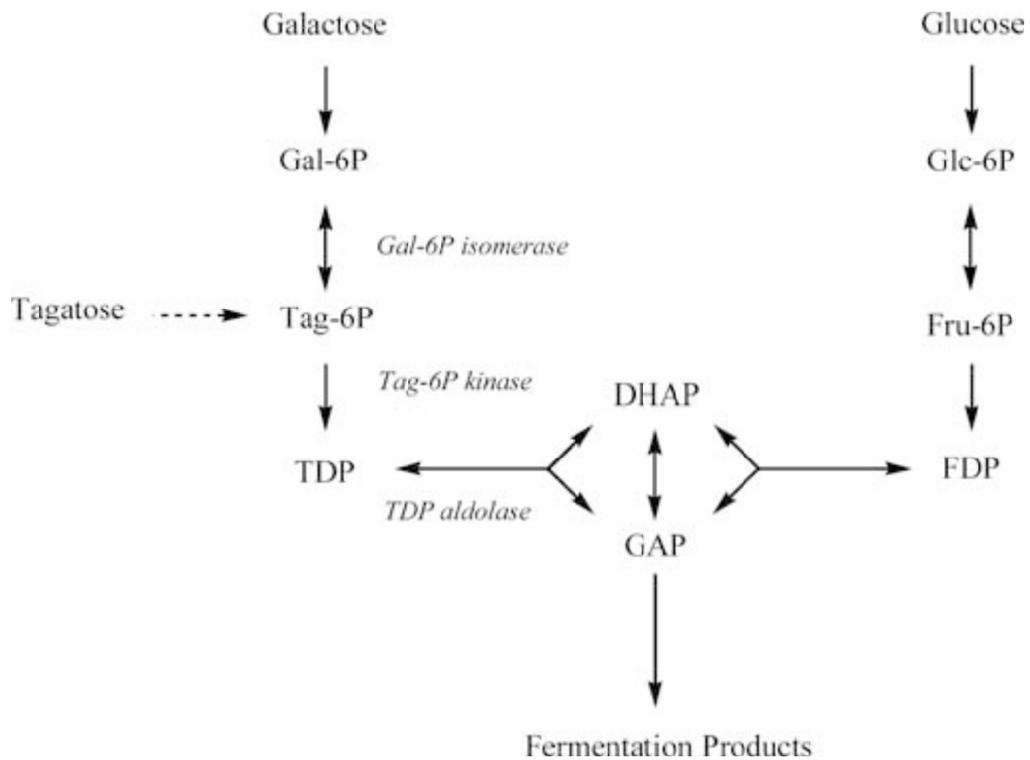


Figura 3.5. Vía de la tagatosa-6-fosfato (Extraída de Crow et al., 1983). Línea de puntos: reacción hipotética de la hexoquinasa; TDP: tagatosa difosfato; FDP: fructosa difosfato; DHAP: dihidroxiacetona fosfato; GAP: gliceraldehído-3-fosfato.

Los animales superiores, incluidos los seres humanos, no poseen la vía de la tagatosa-6-fosfato, por ende, dicho azúcar no se descompone espontáneamente. Según Saunders et al., (1999b), en ratas oralmente adaptadas, el 68% de la D-tagatosa marcada con C_{14} se descompuso a CO_2 , a pesar de que las mismas no metabolizaban dicha cetosa (Bär et al., 1999). Laerke y su grupo de investigación, estudiaron el patrón de fermentación de la D-tagatosa en cerdos (Laerke y Jensen, 1999; Laerke et al., 2000) y descubrieron que la flora microbiana intestinal de dicho animal había degradado la D-tagatosa a ácidos grasos de cadena corta, los cuales, luego, podían ser absorbidos por el cerdo.

La D-tagatosa es un azúcar con mala absorción en los seres humanos, lo que significa que es un nutriente no absorbible. Se supone que es parcialmente absorbida en forma de ácidos grasos de cadena corta producidos por la degradación de dicho azúcar

por la flora normal presente en el intestino grueso humano (Buemann et al., 1998; Saunders et al., 1999a; Buemann et al., 2000a,b,c; Laerke et al., 2000; Boesch et al., 2001; Normen et al. 2001). Así, la recuperación de la energía del azúcar es baja, ya que parte de ella se utiliza en el aumento de la biomasa de la microflora que luego es excretada en las heces (Bertelsen et al., 2001b).

Diferentes pruebas clínicas humanas realizadas con pacientes con diabetes tipo 2 y con sujetos controles, quienes recibieron regímenes diarios de D-tagatosa por un año, mostraron que ambos grupos en forma gradual y consistente perdieron peso a velocidades médicamente deseables, demostrando, simultáneamente, que la D-tagatosa no incrementa el nivel de D-glucosa en sangre. Además, se ha comprobado que la D-tagatosa presenta numerosos beneficios médicos tales como estimulación del desarrollo fetal, disminución de los síntomas asociados a la diabetes tipo 2, hiperglucemia, anemia y hemofilia en la población general (Kim, 2004).

3.3.3. D-tagatosa como sustancia reconocida como segura para su consumo

Al haberse comprobado la capacidad de la D-tagatosa de alterar las proporciones de ácidos grasos de cadena corta, favoreciendo el desarrollo de bacterias probióticas, ha sido admitida y reconocida como segura (**GRAS**: General Recognised as Safe) por los Estados Unidos (Favara, 2003) y por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) estableciéndose, desde 2001, una dosis diaria aceptable dependiente de cada producto en el que ha sido incorporada, tal como se observa en la **Tabla 3.4** (Bär, 2004; Food Standards, 2004). En 2005 fue aprobada en Brasil (ANVISA, 2005), Unión Europea (UK Food Standards Agency, 2005) y Sudáfrica (The South African Food Control, 2005) como ingrediente alimentario. Es importante aclarar que, en 1999, la FDA incluyó a la D-tagatosa como un ingrediente (no un aditivo) seguro y, en 2007, la autoridad de seguridad alimentaria Europea (EFSA) confirmó esta conclusión. En la Argentina, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (A.N.M.A.T.) aún no ha aprobado la utilización de D-tagatosa como ingrediente alimentario.

Tabla 3.4. Alimentos y productos en los que se ha incorporado la sustancia GRAS D-tagatosa.

Categoría regulatoria	Tipo de alimento	Funcionalidad	Concentración de uso
Productos de panadería y confitería	Galletas, muffins, pan rápido y tortas de café tipo pan rápido	Estimulador del sabor	2%
Bebidas: dietéticas/no carbonatadas y reducidas en CO ₂	Bebidas carbonatadas dietéticas y libres de azúcar incluidas bebidas hechas con leche, jugos, té y basados en café (listas para beber, RTD, preparadas de mezclas y mezclas secas)	Estimulador del sabor	1%
Bebidas basadas en café	Bebidas con café como el cappuccino y el latte	Estimulador del sabor	1%
Postres congelados basados hechos con leche, reducido/bajo en grasas	Helado dietético, postres congelados hechos con leche, bajo en grasas y yogurts congelados no grasos y novedades relacionadas	Endulzante a granel, texturizador	3%
Golosinas duras	Dietéticas y normales	Endulzante a granel	15%

Barras alimenticias y caramelos blandos dietéticos	Barras de energía, fortificadas en nutrientes, baja en grasas, etc.	Endulzante a granel, texturizador	15%
Glaseados	Aquellos usados en brownies, tortas de mezcla	Endulzante a granel, texturizador	30%
Bebidas tipo suplementos/reemplazo de comidas	Bebidas proteicas, suplementos dietarios, bebidas dietéticas	Endulzante a granel, texturizador	5g/ración (240 ml)
Chocolate con leche	Cubiertas, películas y caramelos de chocolate con leche	Estimulador del sabor	3%
Cereal para el desayuno	Cereales listos para comer	Endulzante a granel, texturizador	5,45-20 g (dependiente del tamaño de la ración)
Granizados/Batidos de frutas	Bebidas granizadas frutales y lácteas	Estimulador del sabor	1%
Caramelos blandos/masticables	Confiterías basadas en frutas, caramelos masticables, turrón, cremas y dulce de leche/pastelero (excluyendo gelatinas, gomitas, orozuz)	Estimulador del sabor y endulzante a granel	3%

Goma de mascar sin azúcar	Chicles sin azúcar y libre de azúcares	Endulzante a granel	30%
Endulzante principal bajo en calorías	Sustituto de azúcares	Endulzante a granel	2,5 g/ración
Yogurt	Yogurt (excluyendo el yogurt congelado)	Estimulador del sabor	2%
	Pasta de dientes y enjuague bucal	Efecto anticariogénico	10%
		Efecto antihiperглиcémico	
Suplemento dietario			

Como efecto negativo puede observarse que, al no existir ningún mecanismo de degradación que se encuentre presente antes del intestino grueso humano, la ingesta excesiva de D-tagatosa puede provocar hinchazón en el estómago e intestino delgado así como también náuseas, flatulencia y diarrea. El consumo recomendado de D-tagatosa está por debajo de 30 g diarios para un adulto sano de sexo masculino, dado que concentraciones mayores han provocado náuseas, flatulencia, diarrea, debido a la fermentación de la D-tagatosa y a los efectos osmóticos provocados en el intestino delgado y colon (Buemann et al., 1999a,b).

3.3.4. Propiedades

La forma cíclica de la D-tagatosa consiste de: D-tagato- α -2,6-piranososa (79%), β -D-tagato-2,6-piranososa (14%), α -D-tagato-2,5-furanosa (2%), y β -D-tagato-2,6-furanosa (5%) (Köpper y Freimund, 2003).

La D-tagatosa es menos higroscópica que la D-fructosa y la mayoría de los endulzantes, excepto el eritritol, y posee una viscosidad menor que la de la sacarosa a la misma concentración y temperatura, aunque ligeramente mayor que la de la D-fructosa y que la del sorbitol. Además, debido al hecho de que es un monosacárido, la depresión del punto de congelamiento y de la actividad acuosa es mayor que en la sacarosa. Asimismo, comparte con los polioles las propiedades de poseer un bajo valor calórico y de no provocar daño al esmalte dental, aunque, a diferencia de los polioles, no posee efecto laxante (Levin et al., 1995) y, como resultado de estas propiedades, es considerado un potencial edulcorante reducido en energía.

Como la D-tagatosa es un azúcar reductor, participa en las reacciones de pardeamiento durante el tratamiento térmico. En relación a esta propiedad, la reacción de Maillard ha sido seguida en diferentes sistemas modelos con el objetivo de clasificar el mecanismo cinético de la D-tagatosa en relación a otros endulzantes susceptibles a esta reacción. Estos estudios han permitido comprobar que la D-tagatosa ha participado en la creación de sistemas de sabores completamente nuevos y diferentes a los otros endulzantes, por lo que puede ser utilizada, en este sentido, para crear sabores de caramelos o maltas en productos de confitería o cereales. Sin embargo, su incorporación a productos que experimentan altas temperaturas a un bajo contenido de humedad, como cereales cocinados tradicionalmente o productos de panificación, es riesgosa dado que en estas situaciones la reacción de Maillard es difícil de controlar y la aparición de sabores amargos es común (Skytte, 2009).

Además, al tratarse de un azúcar reductor, se ha comprobado que a altas temperaturas se descompone más fácilmente que la sacarosa, azúcar no reductor (Levin, 2002; Kim, 2004). Las propiedades más relevantes de la D-Tagatosa se presentan en la **Tabla 3.5**.

Tabla 3.5. Propiedades físicas y químicas de la D-tagatosa.

Propiedades	Valor
Familia Química	Cetocarbohidrato monosacárido; isómero de la D-galactosa
Formula molecular	$C_6H_{12}O_6$
Peso molecular	180,16
Forma Física	Sólido cristalino blanco
Olor	Ninguno
Punto de fusión	134°C
Rotación óptica	$\alpha_D^{20} = -5^\circ$ (c=1 en agua)
Solubilidad	58% (m/m) a 20°C
Rango de estabilidad al pH	2-7
Higroscopicidad	Ninguna (a 75% de HR/30°C)
Densidad bulk	0,7-0,9 g ml ⁻¹
Estabilidad al pH	Sí
Temperatura de transición vítrea en seco (T _g ')	15
Dulzura relativa	92% de la sacarosa en una solución 10% (m/m)
Calidad de la dulzura	Sabor indistinguible al de la sacarosa con una aparición tan rápida como la D-fructosa

Efecto Refrescante	No tiene
Valor calórico	1,5 kcal g ⁻¹ (30% del contenido energético de la sacarosa)
Reacción de Maillard y caramelización	Experimenta
Campo potencial de aplicación	Alimento dietario bajo en calorías, alimento para diabéticos, adyuvante, potenciador de sabores, excelente para bebidas gaseosas aciduladas y zumos de frutas cítricos
Estado de regulación	Sustancia GRAS para uso en drogas y alimentos tanto para animales como para humanos

3.3.5. Propiedades beneficiosas para la salud

La D-tagatosa, además de ser reconocida como un endulzante bajo en calorías, es también un nutraceútico, definido como un alimento o componente del mismo que posee un efecto médico comprobado y beneficioso para la salud (Pszczola, 1992). La acción beneficiosa de estos componentes varía desde el suplemento de minerales esenciales o vitaminas hasta la protección contra varias enfermedades infecciosas. En este sentido, en el año 2005, la unidad de nuevos alimentos declaró a la D-tagatosa un alimento completamente nuevo y totalmente seguro. Asimismo, ha sido comprobado que incrementa el número de factores sanguíneos claves en la coagulación y estimula fertilidad y el desarrollo del feto (Levin, 2000a,b).

3.3.5.1. Propiedades prebióticas

Los prebióticos han sido definidos como ingredientes alimenticios no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o

la actividad de una o un número limitado de bacterias endógenas beneficiosas en el colon que estimulan la salud del huésped (Gibson y Roberfroid, 1995). Dentro de estas sustancias, se ha descrito que la D-tagatosa promueve el crecimiento de especies de *Lactobacillus* y de otras bacterias del ácido láctico.

La D-tagatosa es sólo parcialmente metabolizada en el intestino delgado y al ingresar al colon funciona como una fibra soluble lentamente fermentable. Asimismo, sólo aproximadamente el 20% de la D-tagatosa ingerida es absorbida en el intestino delgado donde, la parte absorbida, es metabolizada en el hígado empleando la misma vía metabólica que la D-fructosa. Por otro lado, la D-tagatosa no absorbida es completamente fermentada en el colon por la microflora endógena, resultando en la producción de ácidos grasos de cadena corta (formato, acetato, propionato, butirato, valerato, capronato y heptanoato).

De esta manera, la D-tagatosa puede ser considerada como un endulzante prebiótico a granel empleado en alimentos debido a que:

- la mayoría llega al colon sin ser absorbida;
- su valor calórico es de $1,5 \text{ kcal g}^{-1}$, aportando sólo el 33% de las calorías que aporta la sacarosa (Bertelsen et al., 1999; Livesey y Brown, 1996);
- la lenta fermentación *in vitro* indica selectividad, lo que significa que no es fermentada por todas las bacterias colónicas;
- existe más estimulación de la producción *in vitro* de butirato en cerdos (46,3%) adaptados (Jensen y Laue, 1998; Laerke y Jensen, 1999; Laerke et al., 2000);
- se evidencia un incremento en la producción *in vitro* de butirato (47%) y lactato en heces de humanos adaptados al consumo del cetoazúcar (Jensen et al., 1998; Mortensen, 1999);
- existe un aumento en el número de bifidobacterias y de bacterias del ácido (principalmente *Lactobacillus*) en heces humanas luego de la adaptación a la D-tagatosa, mientras que las enterobacterias (bacteroides, anaerobios totales, coliformes, enterobacterias lactosa negativas) disminuyeron su recuento (Bertelsen et al., 2001b).

Es importante aclarar que los cerdos y los humanos poseen tractos gastrointestinales similares y cualitativamente los mismos tipos de bacterias indígenas intestinales. Por lo tanto, los cerdos son buenos modelos de estudio para los humanos en relación a la digestión y a la fermentación.

Las bacterias del ácido láctico y, en particular, aquellas del género *Lactobacillus*, (Klaenhammer, 1998) son habitantes importantes del tracto intestinal de los animales y hombres, dado que poseen numerosos beneficios funcionales, tales como:

- mantenimiento de la microflora normal;
- interferencia de patógenos;
- exclusión y antagonismo;
- inmunoestimulación e inmunomodulación;
- actividades anticarcinogénicas y antimutagénicas;
- deconjugación de los ácidos biliares;
- presentación de lactasa *in vivo*.

Por otro lado, el butirato tiene efectos importantes sobre la salud del colon, debido a que es la fuente de energía principal para el epitelio colónico (Roediger, 1980). Asimismo, juega un rol importante en el control de la proliferación y diferenciación de las células epiteliales colónicas (Johnson, 1995), mientras que inhibe tanto el crecimiento de colonocitos neoplásicos (Hague et al., 1996) como la hiper-proliferación pre-neoplásica inducida por promotores de tumores *in vitro* (Velázquez et al., 1996).

Sin embargo, una de las principales desventajas de poseer efectos prebióticos es el riesgo de generar efectos colaterales gastrointestinales una vez que ha sido consumida en dosis mayores a las toleradas. De esta forma, el nivel de D-tagatosa máximo tolerado por día es de 20 g en una sola dosis o 30 g divididos a lo largo del día (Lee y Storey, 1999).

3.3.5.2. Respuestas glicémicas e insulinémicas

La calidad de los carbohidratos en la dieta es importante para lograr tener un estilo de vida saludable y evitar la obesidad. Asimismo, la producción de insulina es disparada

por los altos niveles de glucosa en sangre (Brand-Miller, 1999). El incremento en la respuesta de glucosa e insulina puede ser solo predicha midiendo la concentración de ambos compuestos luego de la ingesta de un alimento y comparándolos con un alimento de referencia, típicamente D-glucosa (Brand-Miller et al., 2002; Sentko, 2004). Se ha comprobado que la D-tagatosa posee un índice GI (glucémico) y GII (insulinémico) de 3, en comparación con el índice GI y GII de 100 para la D-glucosa (Seri et al., 1993; Donner et al., 1999; Foster-Powell et al., 2002). Aparte de tener en cuenta estos valores, para medir la respuesta glucémica real, es preciso utilizar un sistema complejo, como es el caso de un alimento (que contiene carbohidratos, proteínas y grasas), dado que los mismos también alteran la respuesta GI y GII. De esta manera, aunque fueron utilizados alimentos complejos, de todas formas, la respuesta glucémica e insulinémica resultó ser muy baja, como es el caso del chocolate elaborado con D-tagatosa que arrojó un valor de 2,5 en comparación con el chocolate realizado con sacarosa que mostró un valor de 13 (Livesey, 2003; Monro, 2003).

3.3.5.3. D-tagatosa como droga antidiabética y para el control de la obesidad

Estudios realizados en humanos sugieren que la D-tagatosa es una potencial droga para el tratamiento de la diabetes tipo II y otras enfermedades relacionadas (Moore, 2006), a través de los efectos beneficiosos producidos sobre la hiperglicemia e hiperinsulinemia postprandial (Donner et al., 1996; Donner et al., 1999; Donner, 2006). De esta manera, la D-tagatosa regula la D-glucosa en sangre inhibiendo el aumento de D-glucosa postprandial. Además, como el efecto postprandial es independiente de la secreción de insulina, la D-tagatosa sería también útil en el tratamiento de la diabetes tipo I debido a la disminución de los requerimientos de insulina. Asimismo, en dichos estudios ha inducido la pérdida de peso (Buemann et al., 2000c) sin provocar hipoglucemia reduciendo la absorción de ciertos alimentos y, simultáneamente, el aumento del colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), disminuyendo el riesgo de patologías cardiovasculares, ambas importantes para el control de la diabetes y constituyendo características beneficiosas e independientes para el control de la enfermedad (Rader, 2006; Shepherd et al., 2006). Por último, podría ser

utilizada en pacientes prediabéticos en conjunto con otras drogas orales, tales como sulfonilureas y metformina (Lu et al., 2008).

Asimismo, se ha comprobado su efecto en la promoción del desarrollo fetal y del embarazo (Levin, 2002) y en la reducción de los síntomas asociados a la anemia y la hemofilia (Seri et al., 1993; Lu et al., 2008).

3.3.5.4. Protección dental

En general, los carbohidratos sustitutos de otros endulzantes azucarados que presentan una fermentación oral bacteriana lenta, reducen el riesgo de caries dental, debido a que el proceso de producción de ácidos es menor, por lo que dicho azúcar puede considerarse no cariogénico (Imfeld, 1983; Levin, 2002). Para arribar a las mencionadas observaciones, la D-tagatosa fue testeada empleando la metodología de medición del pH en placa usando una solución al 10%. Asimismo, se ha comprobado su papel en la prevención de la formación de la placa dentaria y del biofilm de microorganismos, contribuyendo también en la disminución de los síntomas de la halitosis o mal aliento (Cisar et al., 1979; Wong, 2000).

3.3.5.5. D-tagatosa en bebidas

Recientemente se han formulado bebidas comerciales de limonada y de leche pasteurizada conteniendo D-tagatosa, comprobándose la estabilidad de la D-tagatosa en estas bebidas (pérdidas menores a 0,1% en bebidas ácidas o tratadas térmicamente a temperaturas de pasteurización) y, por lo tanto, conservándose su poder prebiótico (Bell y Luecke, 2012).

3.3.5.6. D-tagatosa para el tratamiento de la intolerancia a la D-fructosa

La intolerancia a la D-fructosa puede deberse tanto a una mala absorción de dicho azúcar como a una intolerancia con características hereditarias, conllevando a una pobre digestión de dicho azúcar. Dicha deficiencia metabólica reside en la falta de la forma

activa de la enzima fructosa 1,6-difosfato aldolasa presente en el hígado, por lo que la ingesta de D-fructosa lleva a la formación y acumulación de D-fructosa-1-fosfato por la fructoquinasa, derivando en problemas renales, hipoglucemia y severos calambres. Sin embargo, la condición más común es la mala absorción a nivel del intestino delgado, similar a lo que acontece con la intolerancia a la D-lactosa, incluso provocando síntomas similares (diarrea, gases, vómitos, calambres estomacales). De esta forma, para aquellas personas que son intolerantes hereditarios a la D-fructosa, la D-tagatosa no resulta recomendable para su consumo, mientras que aquellos que solo posean problemas de mala absorción, la D-tagatosa se convierte en una excelente opción.

3.3.5.7. Propiedades antioxidantes

Paterna et al., (1998) han estudiado las propiedades antioxidantes de la D-tagatosa en hepatocitos murinos cultivados; para ello, analizaron tanto la generación de radicales aniónicos superóxidos como las consecuencias del stress oxidativo causado por compuestos pro-oxidantes en células intactas, observando que la formación inducida por nitrofurantoína del radical aniónico superóxido, no fue alterada por la D-tagatosa concluyendo, de esta manera, que la misma es un quelador metálico débil que puede antagonizar las consecuencias del stress oxidativo tóxico dependiente de metales en los hepatocitos. Dichas propiedades antioxidantes, resultarían del secuestro de hierro reactivo, por lo tanto protegiendo a diferentes moléculas del daño potencial del radical hidroxilo.

En segundo lugar, se ha demostrado que el agregado de D-tagatosa a una solución preservadora o de almacenamiento de un órgano, reduciría el daño por reperfusión del órgano a lo largo de la cirugía y/o seguido a la remoción de un órgano de un sujeto. Esto ocurre dado que la D-tagatosa ejerce un doble efecto beneficioso preservando el órgano y previniendo la herida por reperfusión. El primer efecto que ejerce es el de ser un antioxidante de fase acuosa, dado que es quelador del ión hierro, evitando que el mismo se particione hacia las membranas y que promueva la peroxidación de la membrana lipídicas, evitando así, el daño celular oxidativo. El segundo efecto es que la exposición de altas concentraciones de D-tagatosa a las células de los órganos, como las células

hepáticas, disminuiría masivamente el ATP, lo que evitaría y/o prevendría el inicio del proceso de apoptosis celular (Boelsterli, 2002).

3.3.5.8. Otras propiedades

También ha sido aprovechado como agente estimulador y mejorador de sabores y como endulzante a granel (Lee y Storey, 1999; Rosenplenter y Mende, 2004; Taylor et al., 2008). Esto es una propiedad importante de la D-tagatosa, por dos razones principales. En primer lugar, porque reduce los efectos de persistencia de los azúcares de alta intensidad (aspartamo, acesulfamo-K, sacarina y sucralosa) cuando es combinada con ellos en concentraciones de 0,2 a 1%, mejorando profundamente la calidad de los alimentos (Andersen y Vigh, 1995) y, en segundo lugar, la D-tagatosa experimenta reacción de Maillard (Salpigidis, 2001) a una velocidad mucho mayor y produciendo compuestos volátiles o flavours (aldehídos y cetonas, preferentemente) únicos en relación a la D-fructosa (pirazinas, preferentemente), también una cetohexosa.

Esto ha permitido su utilización en la elaboración de nuevos alimentos, en particular en aquellos donde las percepciones a caramelo, malta, chocolate con leche, cacao o cereales, sean deseables (Schnermann y Schieberle, 1997; Kriebardis, 2004):

También ha demostrado ser útil como intermediario en la síntesis de otros compuestos orgánicos ópticamente activos y también, ha sido empleado como aditivo en detergentes, cosméticos y en formulaciones farmacéuticas (Ibrahim y Spradlin, 2000).

Igualmente, se ha comprobado que la D-tagatosa no es genotóxica (Kruger et al., 1999b,c) ni induce aumento de peso o hipertrofia hepática (Kruger et al., 1999a) en ratas adaptadas a una dieta rica en D-tagatosa (> al 5% en la dieta).

Por último, es importante aclarar que la D-tagatosa no presentaría reacciones alérgicas para el ser humano y en particular, para aquellos alérgicos a la leche bovina, debido a que a pesar de ser obtenida a partir de una materia prima láctea, el suero de quesería, durante el proceso de manufactura, las diferentes preparaciones son sometidas a procesos de eliminación (pasos cromatográficos), desnaturalización (pH alcalinos) y

cristalización, por lo que cualquier componente de la leche, en principal caseínas y proteínas del suero han sido eliminadas previamente y no han sido encontrados en las preparaciones comerciales luego de la realización de diferentes análisis de ELISA (Taylor et al., 2005).

3.3.6. Estabilidad de la D-tagatosa

La estabilidad de la cetoheptosa en soluciones buffers durante el almacenamiento por 6 meses es dependiente del pH, del tipo de buffer, de la concentración del mismo y de la temperatura. La pérdida es mayor a pH 7,0 que a pH 3,0 y, en buffer fosfato, la degradación es mayor que en buffer citrato. Asimismo, la degradación fue menor a concentraciones de 0,02 M que a 0,1 M; y al aumentar la temperatura de 20 a 40°C, también aumentó considerablemente la degradación y el pardeamiento en forma simultánea (Dobbs y Bell, 2010; Luecke y Bell, 2010). Por otro lado, la deliquesencia de la D-tagatosa sólida aconteció a humedades relativas mayores al 85% a cualquier temperatura. Asimismo, se comprobó que para preservar la calidad química y física de la D-tagatosa, debe conservarse a 20°C y humedad relativa del 33% (Grant y Bell, 2012).

3.3.7. Importancia Comercial

La D-tagatosa, al ser una sustancia GRAS, puede ser utilizada en confituras, bebidas, alimentos especiales y en productos dietéticos bajos en calorías, como una sustancia edulcorante única. Además, esta capacidad endulzante no varía con la variación de la concentración de D-tagatosa, lo que si acontece con otros endulzantes, tales como con la sucralosa y el rebaudiósido A (Fujimaru et al., 2012). Además de los usos arriba citados, puede ser utilizada como aditivo en drogas o medicamentos de receta para enmascarar sabores desagradables y como edulcorante en pastas de dientes, enjuagues bucales y cosméticos, tal como el lápiz de labios saborizado.

La expectativa es que este azúcar competirá parcialmente con el mercado de los polioles. El uso mundial de dichos polioles es de aproximadamente de unos 1,2 millones

de toneladas/año de los cuales, el sorbitol, es el que posee el mayor mercado entre los alcoholes superiores (alrededor de 1 millón de toneladas/año) con la competitividad de ser el poliol más barato, aproximadamente en EEUU su valor ronda en U\$S 1,2/kg. Otros polialcoholes, entre los que podemos mencionar al xilitol, eritritol, manitol e isomaltitol, se consumen en aproximadamente 200.000 toneladas/año y tienen una mayor gama de precios que va desde los 3 U\$S kg⁻¹ hasta los 7 U\$S kg⁻¹.

Se espera que la D-tagatosa, como edulcorante, cree nuevos mercados, debido a sus propiedades únicas, como su efecto promotor en la pérdida de peso y la ausencia de efecto refrescante, por mencionar sólo algunas. El precio comercial se establecerá cerca del precio de los sustitutos del azúcar, y también será determinado por diversos factores, entre los que podemos incluir las materias primas, el tamaño de la planta, el costo de la optimización del proceso y, principalmente, la demanda del mercado (Kim, 2004).

3.3.8. Vías de obtención de la D-tagatosa

Realizando un estudio sobre azúcares que giraban el plano de luz polarizada hacia la izquierda (levógiros), Gilbert Levin descubrió accidentalmente la D-tagatosa, la cual es estructuralmente muy similar a la L-fructosa. La D-tagatosa, molécula dextrógira, rápidamente cobró importancia comercial en el mercado de los edulcorantes obtenidos por vía de las transformaciones químicas.

La producción por vía bioquímica de la D-tagatosa fue estudiada en primer lugar por Izumori et al., (1984) obteniendo D-tagatosa a partir de D-galactitol (dulcitol) empleando la bacteria *Arthrobacter globiformis*. Asimismo, las bacterias *Gluconobacter oxydans* (Manzoni y Rollini, 2001; Rollini y Manzoni, 2005), *Mycobacterium smegmatis* (Izumori y Tsuzaki, 1988), *Enterobacter agglomerans* (Muniruzzanman et al., 1994) y *Klebsiella pneumoniae* (Shimonishi et al., 1995) han sido reportadas como organismos capaces de oxidar el D-galactitol a D-tagatosa. La enzima responsable de dicha biotransformación es la sorbitol/galactitol deshidrogenasa (EC 1.1.1.16), tal como ha sido estudiado en cepas de *Pseudomonas* sp. (Shaw, 1956) y *Mycobacterium* sp. (Szumilo, 1981; Rollini y Manzoni, 2005). Con esta metodología, el rendimiento de

producción de D-tagatosa a partir de dulcitol fue del 85%, es decir que 14 g de cristales de D-tagatosa fueron obtenidos a partir de 1 litro de medio con dulcitol al 2% (Izumori et al., 1984).

La D-psicosa-3-epimerasa (Kim et al., 2006a) de *Agrobacterium tumefaciens* y la D-tagatosa-3-epimerasa de *Pseudomonas cichorii* son capaces de convertir la D-sorbosa a D-tagatosa (Itoh et al., 1994; Ishida et al., 1997; Yoshida et al., 2007). Sin embargo, tanto la D-sorbosa como el D-galactitol son sustratos muy costosos, por lo tanto poseen escaso potencial para ser utilizados con fines comerciales. La producción máxima por este método resultó ser de 18,4 g l⁻¹ de D-tagatosa por cada 20 g l⁻¹ de D-galactitol empleado, lo que arroja un 92% de rendimiento. Sin embargo, dado que el costo del galactitol como materia prima es relativamente alto (500-800 U\$S kg⁻¹), este proceso no ha sido considerado para una producción a gran escala de D-tagatosa.

Diversas cepas del hongo *Mucoraceae* son capaces de transformar la D-psicosa a D-tagatosa (Yoshihara et al., 2006) y, por otro lado, como la producción en masa de D-psicosa a partir de D-fructosa se ha convertido en un proceso industrialmente viable en los últimos años (Takeshita et al., 2000a,b; Kim et al., 2006a), la producción de D-tagatosa a partir de D-fructosa vía D-psicosa constituye un método alternativo sustentable de poder ser aplicado a pesar de requerir dos interconversiones sucesivas.

En 1991 y 1992, Beadle y sus colaboradores patentaron el primer proceso económicamente viable de fabricación de la D-tagatosa a partir de la isomerización química de la D-galactosa. Según la patente, la D-galactosa derivada de la hidrólisis de la D-lactosa es isomerizada gracias a la presencia de un catalizador de calcio. Como la D-lactosa derivada del lactosuero es considerada una materia prima muy barata, este fue el primer proceso económicamente viable que ha sido descrito para la fabricación de la D-tagatosa.

Igualmente, ha sido propuesta la síntesis quimo-enzimática del cetozúcar a partir de la D-galactosa (proveniente de la hidrólisis de la lactosa) oxidándola con la enzima piranosa oxidasa a galactosona para luego ser químicamente reducida a D-tagatosa (Freimund et al., 1996). Este procedimiento ha permitido obtener un rendimiento del

proceso alrededor del 30%, bastante menor al obtenido empleando la enzima L-arabinosa isomerasa.

En este sentido, el estudio de Cheetham sobre la producción de D-tagatosa a partir de D-galactosa empleando una bacteria del ácido láctico (Cheetham y Wootton, 1993), demostró que la enzima L-arabinosa isomerasa puede realizar fehacientemente esta conversión, transformándose en una potencial aplicación para llevar a cabo dicho proceso de isomerización. Asimismo, ha sido descrito que *Enterobacter agglomerans* también produce D-tagatosa a partir D-galactosa cuando dicha especie bacteriana es cultivada en un medio preinducido con L-arabinosa (Oh et al., 1998). Además, se ha demostrado que, sobreexpresando la L-arabinosa isomerasa de *Escherichia coli*, *B. subtilis* y *S. typhimurium* (Roh et al., 2000a,b) y *M. smegmatis* (Takata et al., 2007) en una cepa de *E. coli* recombinante, la conversión de D-galactosa a D-tagatosa fue llevada a cabo en forma eficiente.

Ibrahim y Spradlin (2000) patentaron un proceso de isomerización enzimático utilizando una L-arabinosa isomerasa proveniente de una bacteria del ácido láctico. Dado que el proceso de isomerización es comercialmente viable, la mayor parte de la información pertinente sobre la L-arabinosa isomerasa ha incitado que la misma sea incluida recientemente en diferentes patentes. La mayor producción de D-tagatosa que se haya informado hasta el momento resulta ser de 230 g l⁻¹ utilizando un reactor con reciclo de sustrato conteniendo a la enzima L-arabinosa isomerasa de *Geobacillus stearothermophilus* inmovilizada (Kim et al., 2003a) y, dichos resultados se acercan a criterios comerciales aceptables debido a la alta concentración de D-tagatosa lograda.

Por otro lado, también ha sido ensayada la síntesis de mutantes de *Lactococcus lactis* que tengan alterada la vía metabólica D-tagatosa-6-fosfato en algunas de sus enzimas, la única vía de degradación de la D-lactosa en bacterias del ácido láctico y otros pocos organismos siendo, por ello, responsable de la degradación de la D-galactosa y que, al encontrarse bloqueada acumulará, de esta forma, D-tagatosa (van Rooijen et al., 1991). Los genes que codifican esta vía genética en *L. lactis* (*lacABCD*) pueden encontrarse en el operón D-lactosa. Esta bacteria ha sido seleccionada como fábrica celular debido a su sencillo metabolismo del carbono, a su amplio arsenal de

herramientas genéticas, incluyendo un sistema eficiente de integración y su muy eficiente sistema para la sobreproducción de enzimas (NICE). De esta forma, para inducir la acumulación de los derivados de D-tagatosa en lactococos, la estrategia inicial fue la de interrumpir los genes *lacC* y/o *lacD* resultando en la producción de tanto D-tagatosa-6-fosfato como de D-tagatosa-1,6-difosfato. La disrupción del gen *lacD* fue efectuada a través de un proceso de recombinación en dos pasos, involucrando la integración de un plásmido resistente a eritromicina conteniendo sólo los genes *lacC* y *lacF* a través de un único evento de entrecruzamiento, seguido por la remoción del gen *lacD* (o reversión al tipo salvaje) en un segundo evento de recombinación, espontáneo, denominado doble crossover. Este evento ocurrió en un 50% de los mutantes, por lo que la cepa mutante fue obtenida con facilidad. Asimismo, el crecimiento del mutante *lacD* en medios con D-glucosa fue idéntico al tipo salvaje, pero el crecimiento con D-lactosa estuvo seriamente comprometido, aunque el metabolito D-tagatosa-1,6-difosfato fue el único producido. Sin embargo, para que su uso sea práctico, deberán desarrollarse estrategias para defosforilar la D-tagatosa y excretarla al medio exterior (Hugenholtz y Smid, 2002).

3.3.9. Productos comerciales de D-tagatosa

En Junio de 2004, la organización mundial de la salud (OMS), a través de la comisión mixta de expertos sobre aditivos en alimentos, investigó la seguridad de la D-tagatosa, arribando a la conclusión de que su consumo es altamente seguro, no determinándose una ingesta diaria recomendada.

A mediados del año 2005, la D-tagatosa comenzó a ser producida químicamente por la empresa Arla Foods Ingredients de acuerdo a la patente de Beadle et al., (1992), pero debido a la formación de subproductos y a los altos costos relacionados al tratamiento de los residuos y del proceso en general, además de no haber desarrollado una estrategia de mercado adecuada para disponibilizar e informar a los consumidores sobre este endulzante, en el año 2006, Arla decidió dejar de producir dicho azúcar. En forma paralela, y a partir del año 2007, Nutrilab NV, una subsidiaria de la empresa Damhert/Biofood Group Company de Bélgica, desarrolló un proceso biológico de

producción de D-tagatosa a partir de D-lactosa contenida en el permeado del suero. Asimismo, en Julio del 2010, EEUU liberó el proceso que impedía la producción de esta azúcar y autorizó a la comercialización de la D-tagatosa.

Este proceso de obtención biológica consiste, básicamente, en la utilización de la siguiente estrategia: en el primer paso, la lactosa es enzimáticamente hidrolizada a D-glucosa y D-galactosa empleando la lactasa Nutrilab IML inmovilizada proveniente de *Aspergillus oryzae*. El pH de la hidrólisis fue de 4,0-4,5 y la hidrólisis se completó luego de 24 horas a 25°C. A continuación, ambos azúcares fueron separados por cromatografía y la D-galactosa fue expuesta a una enzima L-arabinosa isomerasa de características desconocidas (se sabe que es una enzima mutada y proveniente de un organismo genéticamente modificado), pero que sin dudas debe presentar características tecnológicas relevantes. Luego, la D-tagatosa fue separada de la D-galactosa por un sistema de 30 columnas de lecho móvil simulado, variante de la cromatografía líquida de alta eficiencia utilizada para resolver compuestos muy difíciles de separar (Subramanian, 2007). Mientras que la D-galactosa regresa al sistema como reciclo, la D-tagatosa es cristalizada. Para ello, se ha evaporado solvente de modo de llegar a la sobresaturación, pero para evitar su daño, este proceso de evaporación, fue realizado a bajas temperaturas, menores a la del punto de maduración de la D-tagatosa. El proceso de nucleación se efectuó sembrando cristales de D-tagatosa en alcohol absoluto a la preparación concentrada. La operación de cristalización fue realizada en modo continuo y llevada a cabo en un evaporador con una cámara de calentamiento tipo tubo calandria y un agitador central aplicando vacío de hasta 0,1 bar.

La mencionada empresa ha elaborado una planta para producir 10.000 toneladas de D-tagatosa por año, de donde el 70% es D-tagatosa sólida y el 30% es jarabe de D-tagatosa y cuya inauguración aconteció en Mayo de 2012, produciendo no sólo D-tagatosa sino también una serie de productos comerciales que han salido a la venta en ciertas zonas de Europa con motivo de evaluar la factibilidad de comercialización de los mismos. El objetivo de dicha empresa es insertar a esta cetohexosa en el mercado norteamericano a partir del año 2013. El producto más popular a comercializarse es la denominada “Tagatose” formado por D-tagatosa (39,92%), isomaltosa (39,92%), fibras

alimentarias (inulina y oligosacáridos; 20,14%) y sucralosa (0,02%), producto orientado a la panadería y pastelería. Otros productos comerciales, pueden apreciarse en la siguiente página de internet:

http://www.nutrilab.be/images/upload/catalogus_damhert_NL_FR_ENG.pdf

De todas formas, tanto la producción como la comercialización del nutraceutico como de los productos realizados con él, se encuentran en una etapa de estudios de mercado tanto en relación a la aceptación por parte de la sociedad como por la relación costos/beneficios que pueden traerle a la empresa, dado que el precio de la D-tagatosa es elevado (como ejemplo, en Argentina 1 g de D-tagatosa al 98,5% tiene un valor de 2000 pesos en comparación con 1g de D-galactosa al 99% que presenta un valor de 5,50 pesos y con 1 g de D-lactosa al 98,5% que presenta un valor de 0,50 pesos). De esta manera, por un lado el valor agregado al sustrato proveniente del suero del queso es elevado pero, en forma simultánea, ese precio probablemente se vea trasladado a los productos alimenticios comerciales, de ahí que el éxito de este emprendimiento permanecerá incierto hasta que dichos estudios de mercado hayan finalizado y se evalúe en forma concreta el impacto y aceptación de estos productos por parte del consumidor.

3.4. Producción bioquímica de D-tagatosa a partir de D-galactosa

3.4.1. Fuentes de la enzima

Diversas fuentes de la enzima L-arabinosa isomerasa (Smyrniotis, 1962) han sido reportadas o patentadas para su empleo en la reacción enzimática de isomerización. Las enzimas L-arabinosa isomerasa de *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius* (Lee et al., 2005b), *E. coli* (Roh et al., 2000b), *G. stearothermophilus* (Kim et al., 2001b), *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* (Zhang et al., 2007), *Thermotoga neapolitana* (Kim et al., 2002), *Thermus* sp. (Kim et al., 2003b), *Thermotoga maritima* (Lee et al., 2004) y *Thermoanaerobacter mathranii* (Jørgensen et al., 2004) han sido reportadas como enzimas que poseen la capacidad de isomerizar la D-galactosa en D-tagatosa, luego de haber sido expresadas en forma recombinante en huéspedes heterólogos.

Muchos otros genes de dicha enzima han sido clonados de diversas especies bacterianas, entre las que podemos indicar: *E. coli*, *Salmonella enterica* subgrupo *enterica* serotipo *Typhimurium*, *Yersinia pestis*, *Shigella flexneri*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus halodurans*, *Enterobacter aerogenes*, *Oceanobacillus iheyensis*, *Lactobacillus gayonii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Bifidobacterium longum*, *Bacteroides thetaiotaomicron* y *T. maritima*. El futuro estudio de las enzimas L-arabinosa isomerasas provenientes de la expresión de dichos genes, las convierten en potenciales candidatos para su utilización en la isomerización de la D-galactosa.

3.4.2. Purificación y propiedades de las diferentes enzimas L-arabinosa isomerasa caracterizadas

Hasta la actualidad, sólo han sido purificadas y caracterizadas las enzimas L-arabinosa isomerasa de las siguientes bacterias: *Acidothermus cellulolyticus*, *Anoxybacillus flavithermus*, *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermodenitrificans* (Baek et al., 2004), *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Thermoanaerobacter mathranii*, *Thermotoga maritima* y *Thermotoga neapolitana*. Según estudios de caracterización informados en la literatura, la L-arabinosa isomerasa de *E. coli* se compone de seis subunidades idénticas, donde dicha subunidad posee un peso molecular aproximado $60.000 \text{ g mol}^{-1}$ (Patrick y Lee, 1968, 1969; Patrick et al., 1971; Patrick y Lee, 1975; Wallace et al., 1978). *In vivo*, la enzima L-arabinosa isomerasa se encuentra presente en forma de complejos de 4 o 6 unidades de monómero de enzima (**Tabla 3.6**). De acuerdo al análisis bibliográfico efectuado, los pesos moleculares de dichos monómeros oscilan entre los 52.000 y 68.000 Da, dependiendo del organismo del cual proviene cada enzima. Por otro lado, los valores de los diferentes puntos isoeléctricos de las enzimas a las cuales se les ha determinado dicha propiedad fisicoquímica, se encuentran en el rango de 4,80 a 6,00 (Nakamatu y Yamanaka, 1969; Patrick y Lee, 1975; Yamanaka,

1975; Lin et al., 1985; Kim et al., 2002; Jørgensen et al., 2004; Kim, 2004; Lee et al., 2004; Kim y Oh, 2005; Lee et. al, 2005a; Lee et. al, 2005b; Manjasetty y Chance, 2006; Rhimi y Bejar, 2006; Chouayekh et al., 2007; Rhimi et al., 2007a; Zhang et al., 2007; Prabhu et al., 2008).

Asimismo, se ha comprobado que la L-arabinosa isomerasa de *E. coli* se trata de una metaloenzima donde los cationes divalentes juegan un rol esencial en su mecanismo de reacción. Además, las L-arabinosa isomerasas de *Lactobacillus gayonii* y *Enterobacter aerogenes* son también activadas por cationes divalentes (Nakamatu y Yamanaka, 1969; Oliver y Mortlock, 1971; Yamanaka, 1975).

Tabla 3.6. Características fisicoquímicas de diferentes L-arabinosa isomerasas.

Monómero (Da)	pI	Subunidades (Da)	Organismo	Refs.
57.000/56.040†	5,51†	Tetrámero (224.000)‡	<i>A. acidocaldarius</i>	Lee et. al, (2005b)
53.000†	4,80	Dímero (113.000)	<i>B. licheniformis</i>	Prabhu et al., (2008)
57.000/56.320† (<i>B. halodurans</i>); 57.000/56.090 (<i>G. stearothermophilus</i>)	5,80/ 5,60†	Tetrámero (225.000)‡, «/Tetrámero (224.000)‡, «; Dímero - banda débil (112.000)‡, «	<i>B. halodurans</i> / <i>G. stearothermophilus</i>	Lee et. al, (2005a)
56.000/56.160†	NI	Tetrámero (225.000)«	<i>G. stearothermophilus</i>	Rhimi y Bejar, (2006);

				Rhimi et al., (2007a)
56.000/56.120†	NI	Tetrámero (230.000)‡	<i>G. thermodenitrificans</i>	Kim y Oh, (2005)
60.000 (sedimentación en presencia de urea 8 M) / 56.040§	NI	Hexámero (362.000); sedimentación por equilibrio a baja velocidad	<i>E. coli</i>	Patrick y Lee, (1975); Kim, (2004); Manjasetty y Chance, (2006)
68.000	NI	Tetrámero (271.000); centrifugación por gradiente de densidad en sacarosa	<i>L. gayonii</i>	Nakamatu y Yamanaka, (1969); Yamanaka, (1975)
59.600×	NI	NI	<i>L. plantarum</i> SK-2	Zhang et al., (2007)
55.000×	NI	Hexámero (330.000)	<i>L. plantarum</i> NC8	Chouayekh et al., (2007)
52.000/52.820†	NI	Tetrámero (220.000)‡	<i>T. mathranii</i>	Jørgensen et al., (2004)
57.000/56.658†	5,70 (por IEF)	Tetrámero (230.000)‡	<i>T. maritima</i>	Lee et al., (2004)

55.000×	NI	Tetrámero (212.000)‡	<i>T. maritima</i>	Jørgensen et al., (2004)
56.677§	NI	NI	<i>T. neapolitana</i>	Kim et al., (2002)
55.814§	NI	NI	<i>S. Typhimurium</i>	Lin et al., (1985)
55.876§	5,1	NI	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	Li et al., (2011)
55.000/54.768†	5,63	NI	<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	Cheng et al., (2010a)
56.000/55.893†	NI	NI	<i>B. stearothermophilus</i> IAM 11001	Cheng et al., (2010b)
56.000†	4,90	Dímero (115.000)‡	<i>B. subtilis</i>	Kim et al., (2010b)
53.000/53.428†	4,80	NI	<i>L. fermentum</i>	Xu et al., (2012)
55.000/55.300†	NI	Tetrámero (230.000)‡	<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	Rhimi et al., (2011)
54.000/53.680† (MALDI-TOF)		Tetrámero (220.000)‡	<i>L. sakei</i> 23K	Rhimi et al., (2010)
55.000×	NI	NI	<i>B. longum</i>	Salonen et al., (2012a)

* NI: no informado

† Monómero: SDS-PAGE/ calculado de la secuencia nucleotídica; × Monómero: SDS-PAGE; § Monómero: calculado de la secuencia nucleotídica; ‡ Agregado: cromatografía de filtración en geles; « Agregado: electroforesis en gel en gradiente nativa

3.4.3 Caracterización de la enzima L-arabinosa isomerasa

Para una efectiva producción enzimática de D-tagatosa, las diferentes condiciones de reacción, tales como pH, temperatura, tipo y concentración de iones metálicos, deben ser optimizados. Las condiciones de reacción óptimas de las L-arabinosa isomerasas bacterianas ya caracterizadas, se muestran en la **Tabla 3.7**.

La temperatura óptima para la L-arabinosa isomerasa, en mesófilos, se encuentra en el rango de 30-50°C; para termófilos, dicho rango se sitúa entre 60 y 80°C y, para hipertermófilos, el mismo es de 85-95°C.

En general, el pH óptimo de la mayoría de las L-arabinosa isomerasas caracterizadas a la fecha, se sitúa en el rango de pH de 6,0 a 8,0.

Las L-arabinosa isomerasas suelen requerir Mn^{2+} como cofactor de isomerización para incrementar la velocidad de reacción de la isomerización (Patrick y Lee, 1968), mientras que las isomerasas proveniente de organismos hipertermofílicos requieren Co^{2+} (Kim et al., 2002; Lee et al., 2004). Además, se ha demostrado que los iones Mn^{2+} mejoran la velocidad de isomerización de la reacción de conversión de L-arabinosa a L-ribulosa (Patrick y Lee, 1968; Nakamatu y Yamanaka, 1969). Ninguna enzima ha probado no necesitar el cofactor metálico para su funcionamiento aunque, en algunas de ellas, dicho requerimiento sea bajo.

Tabla 3.7. Propiedades bioquímicas de diferentes L-arabinosa isomerasas.

Especie bacteriana	T ópt. (°C)	pH ópt.	t _{1/2} (min)	Ión metálico	Referencias
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	65	6,0-6,5	NI	Mn ²⁺	Lee et al., (2005a)
<i>Bacillus licheniformis</i>	50	7,5 (5-9)	NI	Mn ²⁺	Prabhu et al., (2008)
<i>Bacillus halodurans</i>	50	7,5-8,0	20 (70°C)	Mn ²⁺	Lee et al., (2005b)
<i>Bacteroides thetaiotaomicron,</i> <i>Clostridium acetobutylicum,</i> <i>Oceanobacillus iheyensis,</i> <i>Salmonella typhimurium,</i> <i>Shigella flexneri, Vibrio parahaemolyticus,</i> <i>Yersinia pestis</i>	40-50	7,5-8,5	NI	Mn ²⁺	Kim, (2004)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	50	6,4-6,9	NI	Mn ²⁺	Yamanaka y Wood, (1966)
<i>Escherichia coli</i>	30	6,0-8,0	60 (50°C)	Fe ²⁺ , Mn ²⁺ y otros	Patrick y Lee, (1975); Yoon et al., (2003)

<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	60-90	7,0-8,5	52 (80°C); 17 (70 C)	Mn ²⁺	Jung et al., (2005); Lee et al., (2005b); Kim et al., (2006b); Oh et al., (2006a); Rhimi y Bejar, (2006); Cheon et al., (2009)
<i>Streptomyces</i> sp.	NI	7,0	NI	NI	Yamanaka e Izumori, (1973)
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	60-70	8,5	42 (75°C)	Mn ²⁺	Kim y Oh, (2005)
<i>Lactobacillus gayonii</i>	30-40	6,0-7,0	NI	Co ²⁺ , Mn ²⁺	Nakamatu y Yamanaka, (1969)
<i>Lactobacillus plantarum</i> (NC8 y SK-2)	60 (NC8) y 50 (SK- 2)	6,5-9,0	240 (5°C)	Co ²⁺ , Fe ³⁺ , Mn ²⁺	Heath et al., (1958); Zhang et al., (2007); Chouayekh et al., (2007)

<i>Mycobacterium smegmatis</i>	45	7,0-7,5	10 (45°C)	Mn ²⁺	Izumori et al., (1978)
<i>Thermoanaerobacter mathranii</i>	65	8,0	NI	Mn ²⁺	Jørgensen et al., (2004)
<i>Thermotoga maritima</i>	85-90	7,0-7,5	185 (90°C)	Co ²⁺	Lee et al., (2004)
<i>Thermotoga neapolitana</i>	85-90	7,0	120 (90°C)	Co ²⁺	Kim et al., (2002); Hong et al., (2007)
<i>Thermus</i> sp.	60	8,5	NI	Mn ²⁺	Kim et al., (2003b)
<i>B. longum</i>	55	6,0-6,5	52h (50°C)	Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Salonen et al., (2012a)
			3h (55°C)		
			6h (pH 5,0)		
<i>L. fermentum</i>	65	6,5	28h (pH 8,0)	Co ²⁺ , Zn ²⁺ , Mn ²⁺	Xu et al., (2012)
			30 (85°C)		
			220 (75°C)		
<i>B. subtilis</i>	32	7,5	NE	Mn ²⁺	Kim et al., (2010b)
<i>A. flavithermus</i>	95	9,5-	NE	Ni ²⁺	Li et al.,

		10,5		(2011)
<i>L. sakei</i> 23K	30-40	5,0-7,0	33 h (pH 3,0) 80 (50°C)	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ Rhimi et al., (2010)
<i>A. cellulolytica</i>	75	7,5	2 h (75°C)	Co ²⁺ , Mn ²⁺ Cheng et al., (2010a)
<i>B. stearothermophilus</i> IAM 11001	65	7,5	60 (65°C)	Mn ²⁺ Cheng et al., (2010b)
<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	15-35	5,5-6,5	90 (45°C) 40 (50°C)	Mn ²⁺ Rhimi et al., (2011)

* NI: no informado

Los parámetros cinéticos de algunas L-arabinosa isomerasas en reacciones con L-arabinosa o D-galactosa como sustrato se muestran en la **Tabla 3.8**. Todas las enzimas previamente caracterizadas poseen una mayor especificidad para L-arabinosa, su sustrato natural, que para D-galactosa, lo que sugiere que es necesario modificar dicha especificidad de sustrato para aumentar la conversión de D-galactosa. La relación de eficiencias catalíticas ($k_{cat} K_M^{-1}$) de D-galactosa hacia L-arabinosa han ido disminuyendo en las enzimas que presentan temperaturas óptimas cada vez más altas, de esta manera, para la enzima proveniente de la bacteria mesófila *B. halodurans* la relación es de 128, para la bacteria termófila *G. stearothermophilus*, la relación es de 51, mientras que para el organismo hipertermófilo *T. maritima*, dicha relación de eficiencias es de 9. Así, se aprecia que las altas temperaturas han incrementado la especificidad de la enzima hacia D-galactosa.

Tabla 3.8. Parámetros cinéticos de diferentes L-arabinosa isomerasas.

Sustrato	Cepa	V _{MÁX} (U mg ⁻¹)	K _M (mM)	k _{cat} (min ⁻¹)	k _{cat} K _M ⁻¹	Referencias
L-arabinosa	<i>E. aerogenes</i>	NI	33	NI	NI	Yamanaka y Wood, (1966)
	<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>	35,5	48	1.989	41	Lee et al., (2005b)
	<i>B. licheniformis</i>	180	369	12.455	34	Prabhu et al., (2008)
	<i>B. halodurans</i>	33	36	1.864	51	Lee et al., (2005a)
	<i>G. stearothermophilus</i> US100	42	29	2.040	71	Rhimi y Bejar, (2006)
	<i>E. coli</i>	248	60	NI	NI	Yoon et al., (2003)
	<i>G. stearothermophilus</i> T6	37	63	2.048	33	Lee et al., (2005a)
	<i>G. stearothermophilus</i>	96	67	4.100	61	Kim et al., (2006b)
	<i>G. stearothermophilus</i> (enzima mutante)	134	100	6.475	65	Kim et al., (2006b)
<i>G. stearothermophilus</i>	97	77	4515	58	Cheon et al.,	

(expresada en <i>B. subtilis</i>)					(2009)
<i>G. thermodenitrificans</i>	86	145	6.960	48	Kim y Oh, (2005)
<i>G. thermodenitrificans</i> (enzima mutante)	178	106	14.434	136	Oh et al., (2006b)
<i>T. mathranii</i>	NI	80	NI	NI	Jørgensen et al., (2004)
<i>B. longum</i>	42	120	5.760	48	Salonen et al., (2012a)
<i>L. fermentum</i>	24,3	30	570	19	Xu et al., (2012)
<i>L. sakei</i>	264	31,6	2048	64,8	Rhimi et al., (2010)
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> NC8	40	43,4	673	15,5	Chouayekh et al., (2007)
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> SK-2	NE	28	NE	NE	Zhang et al., (2007)
<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	164	33,7	NE	NE	Rhimi et al., (2011)
<i>A. flavithermus</i>	95	78,5	53	0,67	Li et al., (2011)
<i>T. neapolitana</i>	119	116	6.740	58	Kim et al.,

						(2002)
	<i>T. maritima</i>	41	31	2.340	75	Lee et al., (2004)
	<i>E. aerogenes</i>	NI	270	NI	NI	Yamanaka y Wood, (1966)
	<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>	7,5	129	NI	NI	Lee et al., (2005b)
	<i>B. halodurans</i>	1,3	167	120	0,4	Lee et al., (2005a)
	<i>G. stearothermophilus</i> US100	8,9	57	438	8,5	Rhimi y Bejar, (2006)
D-galactosa	<i>E. coli</i>	NI	1.480	NI	NI	Yoon et al., (2003)
	<i>G. stearothermophilus</i> T6	9,0	120	516	4,3	Lee et al., (2005a)
	<i>G. stearothermophilus</i>	7,8	145	173	1,2	Kim et al., (2006b)
	<i>G. stearothermophilus</i> (enzima mutante)	37,6	578	1211	2,1	Kim et al., (2006b)
	<i>G. stearothermophilus</i> (expresada en <i>B. subtilis</i>)	69	279	3185	11,4	Cheon et al., (2009)

<i>G. thermodenitrificans</i>	6,9	408	204	0,5	Kim y Oh, (2005)
<i>G. thermodenitrificans</i> (enzima mutante)	35,4	399	1046	3,1	Oh et al., (2006b)
<i>T. mathranii</i>	NI	120	NI	NI	Jørgensen et al., (2004)
<i>T. neapolitana</i>	14,3	250	810	3,2	Kim et al., (2002)
<i>B. longum</i>	7,7	590	424,8	0,72	Salonen et al., (2012a)
<i>A. flavithermus</i>	233	25,2	131	5,2	Li et al., (2011)
<i>A. cellulolytics</i>	4,9	28,9	269	9,3	Cheng et al., (2010b)
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> NC8	7	69,7	112	1,6	Chouayekh et al., (2007)
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> SK-2	NE	119	NE	NE	Zhang et al., (2007)
<i>L. fermentum</i>	9,8	60	540	9	Xu et al., (2012)
<i>L. sakei</i>	76	59	608	10,3	Rhimi et al., (2010)

<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	44	52,1	NE	NE	Rhimi et al., (2011)
<i>T. maritima</i>	8,9	60	504	8,4	Lee et al., (2004)

NE: no ensayado

3.4.4. Modificación de la L-arabinosa isomerasa empleando técnicas de ingeniería genética

La estructura tridimensional de la L-arabinosa isomerasa de *E. coli* ya ha sido resuelta (Manjasetty y Chance, 2006). La estructura cristalina y su comparación estructural con la L-fucosa isomerasa de *E. coli*, sugiere un posible sitio de unión de metales. Dicha estructura cristalina constituye una base para lograr la identificación de los determinantes responsables de la isomerización de la D-galactosa a D-tagatosa. Así, basándose en la estructura cristalina resuelta y en la técnica de alineación de secuencias, se han sugerido los residuos esenciales para el sitio catalítico y para el sitio de reconocimiento del sustrato de la enzima L-arabinosa isomerasa de *G. stearothermophilus* (Rhimi et al., 2007b).

Para incrementar la isomerización de la D-galactosa, se proponen técnicas de evolución molecular; es decir, efectuar estudios de mutación de los aminoácidos dentro o cercanos al sitio activo, de modo de lograr los siguientes efectos: un aumento o cambio en la especificidad por el sustrato, una mayor termoestabilidad, un aumento en la tasa de conversión, un incremento de la temperatura óptima y una disminución del pH óptimo (Kim, 2004). Estas modificaciones permitirán desarrollar L-arabinosa isomerasas con una potencial aplicación a nivel industrial. La evolución directa del gen de la L-arabinosa isomerasa ha sido sugerida como una herramienta poderosa para aumentar la velocidad de reacción (Kim et al., 2001a). Por ejemplo, una L-arabinosa isomerasa mutada proveniente de *G. stearothermophilus*, obtenida a partir de una reacción en cadena de la polimerasa susceptible al error, exhibe un cambio en tres

aminoácidos (V322M, A393T y A408V) en relación a la enzima no mutada. Dicha enzima mutada, muestra una mayor actividad de isomerización de D-galactosa, mayor temperatura óptima, mayor eficiencia catalítica para D-galactosa y mayor velocidad de producción de D-tagatosa de D-galactosa (Kim et al., 2006b). Asimismo, la enzima L-arabinosa isomerasa de *G. thermodenitrificans* mutada en dos sitios, C450S-N475K, fue obtenida mediante mutagénesis sitio dirigida. La misma, convierte D-galactosa a D-tagatosa con un rendimiento del 58%, mientras que la enzima nativa permite una conversión a D-tagatosa del 46% luego de 300 minutos a 65°C (Oh et al., 2006b).

La aplicación comercial de la L-arabinosa isomerasa requiere preferentemente un rango de pH ácido para reducir las reacciones no específicas y de pardeamiento no enzimático (Kim, 2004). El pH óptimo de los mutantes Q408V y R408V disminuye de 8,5 a 7,5, y las actividades de los mutantes son 60 y 30% más altas, respectivamente, que la enzima nativa (Oh et. al, 2006a). Empleando la técnica de mutagénesis sitio dirigida, se realizaron estudios comparativos con la enzima nativa y sus mutantes, comprobándose que el residuo aminoacídico Lys-269 de la enzima L-arabinosa isomerasa, proveniente de la bacteria acidófila *A. acidocaldarius*, posee un rol fundamental en la determinación del pH óptimo (Lee et al., 2005b). Asimismo, para la obtención de enzimas acidotolerantes, Rhimi et al., (2009a) produjeron tres mutantes (Q268K, N175H y Q268K/N175H) a partir de la enzima proveniente de *G. stearothermophilus* US100, de los cuales los mutantes Q268K y Q268K/N175H fueron significativamente más acidotolerantes y más estables a pH ácidos que la enzima nativa, sin alterar el porcentaje de conversión logrado.

3.4.5. Conversión de D-galactosa a D-tagatosa empleando la técnica de alteración del equilibrio de isomerización

El equilibrio entre el sustrato y el producto no puede ser cambiado simplemente modificando la enzima por ingeniería genética, ya que el mismo depende de la termodinámica de la reacción y, por lo tanto, es controlado por la temperatura de la reacción (Chang et al., 1999). De esta manera, para obtener un mayor rendimiento de conversión del producto que el establecido a una cierta temperatura, el equilibrio

debería desplazarse hacia los productos. Así, si un material se une más específicamente al producto (D-tagatosa) que al sustrato (D-galactosa), la adición del mismo (como por ejemplo, ácido bórico) causará un desplazamiento en el equilibrio, como consecuencia de la formación de un complejo, entre el producto y dicho material. Una vez formado, este complejo no participará en el equilibrio de la reacción. Así, cuando el sustrato residual se convierta en producto, de manera de restablecer el equilibrio, el resultado será el desplazamiento del equilibrio hacia la formación del producto. La formación del complejo producto-material puede ser propuesto como una alternativa al método de biotransformación a altas temperaturas para lograr una producción industrial viable de D-tagatosa.

Los boratos forman complejos con los carbohidratos (De Muyneck et al., 2006), interactúan con los sistemas enzimáticos y cambian el equilibrio de cualquier reacción que involucre a carbohidratos cis-diol (Smith y Johnson, 1976). Ciertas cetosas como la lactulosa, maltulosa y celubiolosa, se sintetizan a partir de las aldosas lactosa, maltosa y celobiosa, respectivamente, debido a la isomerización de alto rendimiento en soluciones alcalinas que contengan borato (Hicks y Parrish, 1980; Hicks et al., 1983). Además, se ha comprobado que los boratos poseen una mayor capacidad de acomplejamiento con la D-tagatosa que con la D-galactosa. Así, en la reacción de isomerización entre la D-galactosa y la D-tagatosa catalizada por L-arabinosa isomerasa, la formación preferencial del complejo D-tagatosa/borato desplaza el equilibrio hacia la formación de D-tagatosa. Actualmente, se está estudiando la alta producción de D-tagatosa utilizando esta técnica de formación de desplazamiento del equilibrio a través de la formación de complejos azúcar-borato (Lim et al., 2007; Salonen et al., 2012b).

3.4.6. Aplicaciones industriales de la enzima L-arabinosa isomerasa para la producción de D-tagatosa

3.4.6.1. Procedimiento químico

Químicamente, la D-tagatosa ha sido producida por isomerización química de la D-galactosa empleando catalizadores de calcio, de acuerdo a la patente número 5.078.796 descripta por Beadle et al., (1991, 1992), cuyo esquema puede apreciarse en la **Figura 3.6**. Este procedimiento está referido en función de la reacción de la D- o la L-galactosa con un hidróxido metálico de calcio, bajo condiciones básicas (pH 12). En estas condiciones, un complejo tagatosa-hidróxido metálico sólido intermediario es formado rápidamente y con un alto rendimiento. La temperatura del paso de isomerización varía de -15°C a 40°C . Entonces, el complejo intermediario es neutralizado con una solución de ácido sulfúrico y la D-tagatosa es liberada. Finalmente, la D-tagatosa debe ser purificada por cromatografía de intercambio iónico. Cabe aclarar que este proceso es aplicable para la producción de D- o L-tagatosa a partir de D- o L-galactosa, respectivamente. Sin embargo, la baja especificidad de la reacción (lo que conduce a la formación de subproductos no deseados), las drásticas condiciones operativas (complejo proceso de purificación con un paso adicional al proceso biológico y posterior tratamiento de residuos tóxicos) y los costos han hecho que esta metodología no sea tecnológicamente viable siendo, en la actualidad, sólo utilizada para la síntesis de D-tagatosa de grado farmacéutico y no alimenticio (Oh, 2007; Boudebbouze et al., 2011).

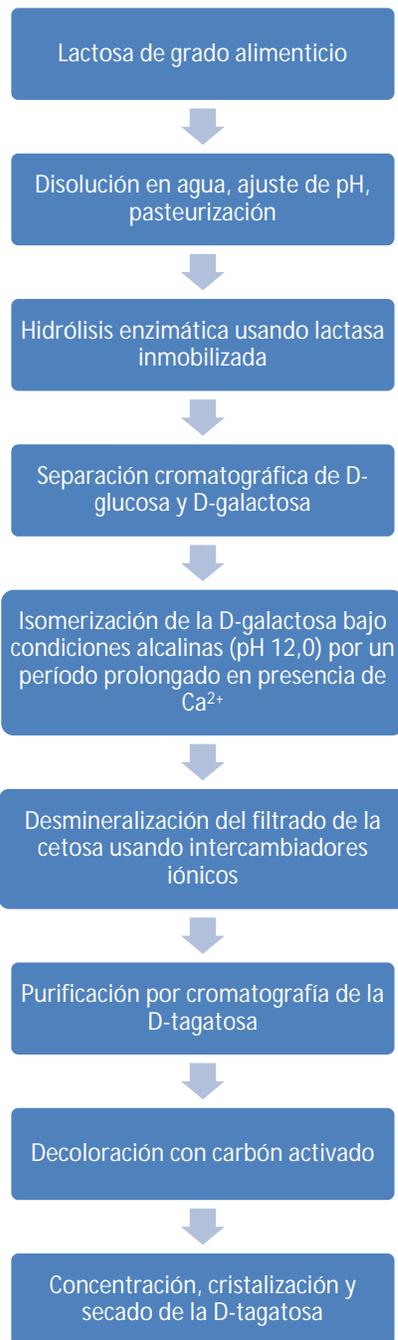


Figura 3.6. Proceso químico de manufactura de la D-tagatosa.

3.4.6.2. Procedimiento biológico empleando la enzima L-arabinosa isomerasa

La ventaja que posee este proceso biológico empleando esta enzima es la conversión del sustrato al producto en un solo paso de isomerización. Además, la reacción es específica, es llevada a cabo en condiciones no drásticas de temperatura y pH, convirtiéndolo en un proceso ambientalmente amigable y donde la eficiencia del catalizador puede ser mejorada mediante el empleo de herramientas de evolución molecular, sólo por mencionar algún ejemplo. En la **Figura 3.7** puede observarse esquemáticamente ambos procesos de isomerización, el propuesto en esta tesis y el proceso químico, actualmente de uso en la industria farmacéutica.

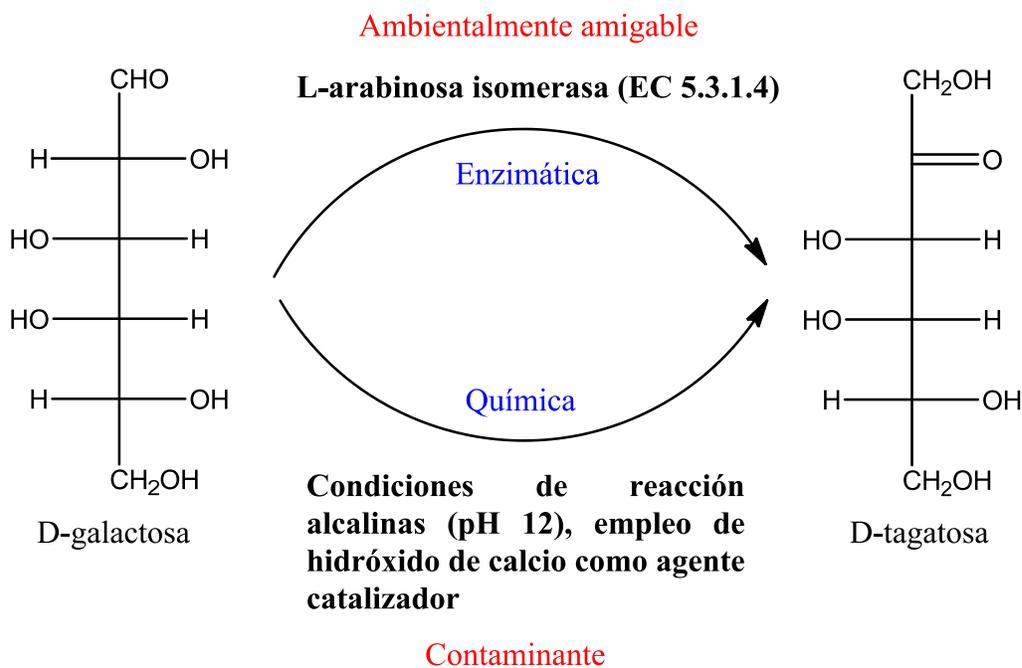


Figura 3.7. Representación esquemática de la síntesis de D-tagatosa química versus bioquímica.

Por su parte, la reacción enzimática también se encuentra equilibrada termodinámicamente, al igual que la D-glucosa isomerasa. Adicionalmente, a pH

alcalinos, se observa la formación de subproductos no deseados, por lo que es recomendable operar a pH ácidos y altas temperaturas (Lee et al., 2005a).

Esta vía de producción presenta un gran potencial tecnológico, verificable a través del gran número de publicaciones científicas y, en particular, de las patentes publicadas en los últimos diez años, las cuales protegen los genes (a través de la bacteria modificada), las proteínas, el uso/aplicación de una sustancia como la D-tagatosa (Bertelsen et al., 2001b) y las aplicaciones biotecnológicas derivadas del uso de la enzima L-arabinosa isomerasa o D-tagatosa (Boudebbouze et al., 2011). De esta manera, han sido protegidas intelectualmente numerosas cepas incluyendo los siguientes géneros o especies: *Zymomonas* (Picataggio et al., 1995); *Zymomonas mobilis* (Zhang et al., 1998); *E. coli* (Kim et al., 2000); *G. thermodenitrificans* (Sin et al., 2005); *Corynebacterium* (Kim et al., 2008b). Asimismo, varias enzimas fueron protegidas con patentes (Pyun et al., 2002; Hansen et al., 2003; Rhimi et al., 2006; Kim et al., 2008; Rhimi et al., 2009b) al igual que los procesos que la utilizan (Kim et al., 2004; Cho et al., 2009; Kim et al., 2009). Asimismo, numerosas aplicaciones del nutraceútico D-tagatosa han sido patentadas: como prebiótico (Vigh y Andersen, 1999), como droga para el tratamiento del síndrome metabólico X (Donner, 2002), como estimulante de los factores sanguíneos (Levin, 2000a), como droga para estimular la fertilidad y el desarrollo fetal (Levin, 2000b), como suplemento crioprotector (Levin, 2002b), como ingrediente en alimentos y bebidas (Boelsterli, 2002), como agente anti-biofilm (Lee et al., 2003), como ingrediente en laxantes (Levin y Yongming, 2003), como agente contribuyente a la cremosidad de productos lácteos (Sälzer y Levin, 2005); en métodos y composiciones para prevenir y tratar la aterosclerosis, síndrome metabólico y síntomas derivados (Lodder y Casis, 2010), en el café conteniendo una composición determinada de D-tagatosa (Lee et al., 2011) y como un azúcar derivado (Uenoyama et al., 2011).

Asimismo, se han utilizado células con la enzima L-arabinosa isomerasa. El empleo de células vivas protegería a la enzima de la desnaturalización permitiendo una posterior reutilización del catalizador favoreciendo la viabilidad del proceso (Zhang et al., 2010b). Así, las células fueron utilizadas en la producción de D-tagatosa en

productos lácteos en forma simultánea a la fermentación de la lactosa (Rhimi et al., 2011b). También, se ensayó el proceso de producción de D-tagatosa empleando tanto células de *L. lactis* MG1363 conteniendo la enzima L-arabinosa isomerasa de *B. longum* NRRL B-41409 como con la enzima sola en presencia de altas concentraciones de borato, obteniendo muy buenos rendimientos de conversión en ambos casos (Salonen et al., 2012b).

Actualmente, el estudio de los métodos de producción de D-tagatosa empleando la enzima L-arabinosa isomerasa se encuentra centrado en la generación de biocatalizadores estables, acidotolerantes y termoactivos, permitiendo la producción a mayores velocidades, obteniendo mayores conversiones y promoviendo su uso a escala industrial. En la **Tabla 3.9**, se observan los rendimientos de conversión informados en las diferentes patentes disponibles hasta la actualidad. Además, también han sido patentados un procedimiento para la producción de D-tagatosa empleando oligosacáridos de soja y otro para el uso de organismos incapaces de excretar D-galactosa (Cho et al., 2009; Kim et al., 2009). Aun cuando el uso de D-tagatosa ha ido aumentando a lo largo de los años, los costos de producción no han disminuido demasiado. Para que esto ocurra, será necesario incrementar la eficiencia catalítica, tanto por ingeniería de proteínas como por la búsqueda de nuevas enzimas L-arabinosa isomerasa.

Tabla 3.9. Estudios de bioconversión de D-galactosa a D-tagatosa usando la enzima L-arabinosa isomerasa descritos por los diversos documentos de propiedad intelectual publicados.

Organismo	Tasa de bioconversión (%)	Sistema de conversión*	Referencias
<i>A. flavithermus</i>	60% luego de 1,4h a 95°C	5 mM D-gal	Favara, (2003)

<i>L. sakei</i> 23K	36% luego de 7h a 40°C	50 mM D-gal	Rhimi et al., (2010)
<i>B. stearothermophilus</i> US100	48% luego de 7h a 70°C	5 mM D-gal	Rhimi y Bejar, (2006)
<i>G. stearothermophilus</i>	28,5% luego de 5h a 60°C	10 mM D-gal	Kim et al., (2006b)
<i>G. thermodenitrificans</i>	46% luego de 5h a 65°C	100 mM D-gal	Jung et al., (2005)
<i>T. maritima</i>	56% luego de 6h a 80°C	10 mM D-gal	Lee et al., (2004)
<i>T. neapolitana</i>	46% luego de 5h a 65°C	10 mM D-gal	Kim et al., (2002)
<i>Thermus</i> sp. IM6501	54% luego de 3 días a 60°C	55 mM D-gal	Kim et al., (2003b)
<i>A. acidocaldarius</i>	44% luego de 6h a 60°C	10 mM D-gal	Lee et al., (2005b)
<i>A. cellulolytics</i>	50% luego de 12h a 75°C	50 mM D-gal	Cheng et al., (2010a)

* empleando la enzima obtenida en forma recombinante y purificada

3.4.7. Determinación analítica de la D-tagatosa

Los métodos de determinación de la D-tagatosa pueden dividirse en dos grandes categorías: colorimétricos y cromatográficos. Los primeros se basan en la formación de derivados del hidroximetilfurfural empleando ácidos inorgánicos y modificadores

orgánicos (Dische y Borenfreund, 1951; Kulka, 1956). Los mismos son inespecíficos, poco sensibles y reproducibles, aunque tienen la ventaja de ser muy rápidos, lo que es importante a la hora de realizar numerosas determinaciones simultáneas.

Por otro lado, el empleo de técnicas cromatográficas de HPLC usando columnas de intercambio iónico, por ejemplo aquellas de la línea Aminex HPX-87 de Bio-Rad, han permitido el desarrollo de técnicas cuantitativas, más robustas y reproducibles para la determinación de esta cetohexosa o relacionadas (Givry et al., 2007; Salonen et al., 2012b). Asimismo, el empleo de soluciones salinas de buffer borato como buffer de elución en las mencionadas columnas, ha constituido un excelente método para cuantificar mezclas complejas de diferentes aldosas y cetosas (de Muyndck et al., 2006).

3.4.8. Purificación de la D-tagatosa a partir mezclas de azúcares

La purificación de D-tagatosa producida por la conversión, tanto química como enzimática, de la D-galactosa contenida en el suero lácteo, no es fácil como consecuencia de sus similares características fisicoquímicas y de solubilidad. De hecho, la purificación de este tipo de carbohidratos representa la operación más costosa del proceso de producción del ingrediente alimentario, siendo alrededor del 90% de los costos de producción (Montañés et al., 2012). Los procesos actuales de purificación de estos carbohidratos involucran procesos cromatográficos en columnas en serie a alta presión empleando resinas de intercambio iónico (HPAEC o IMPC) o de carbón activado (Goulas et al., 2003; Hernández et al., 2009; Nobre et al., 2009), así como también la nanofiltración a través de membranas (Goulas et al., 2002; Feng et al., 2009). Las principales desventajas de estas metodologías son los altos costos de procesamiento y las numerosas regulaciones existentes en el uso de solventes o reactivos, como consecuencia de la necesidad de efectuar prácticas ambientalmente amigables. Debido a estas condiciones, la extracción con fluidos supercríticos se presenta como una técnica viable para obtener D-tagatosa de alta pureza dado que, si bien es una técnica optimizada para extraer compuestos no polares, la adición de cosolventes polares al CO₂ ha permitido purificar dichos azúcares, producto del sustancial aumento de solubilidad de los mismos en el cosolvente (Montañés et al., 2007; 2008; 2009). Así, para la D-

tagatosa, las condiciones de 300 bar como presión de extracción, 60°C como temperatura de extracción y 30% (v/v) de isopropanol (0,6 ml min⁻¹ de modificador orgánico) han permitido recuperar más del 75% de la D-tagatosa de una mezcla D-tagatosa/D-galactosa 70/30 en % (m/m), con una pureza mayor al 90%, de acuerdo con lo que ha sido descrito Montañés et al. (2006).

3.4.9. Comparación entre la D-xilosa y L-arabinosa isomerasa. Mecanismo de reacción

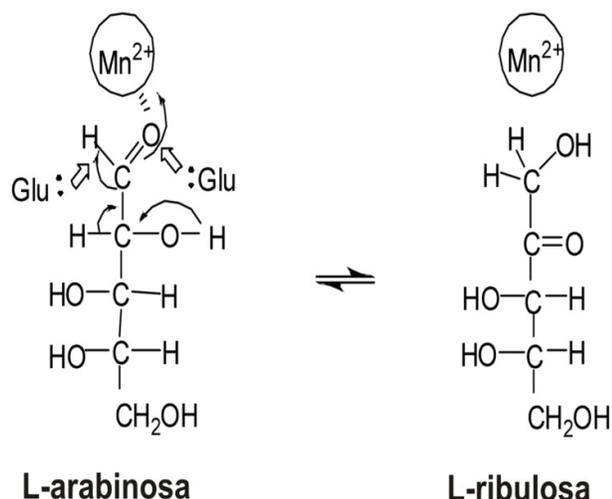
La producción de jarabe de maíz de alta fructosa (HFCS) a partir de la D-glucosa puede brindar un ejemplo análogo al de la producción de D-tagatosa comercial a través de la isomerización de la D-galactosa. La conversión química de D-glucosa a D-fructosa ha sido conocida como la transformación de Lobry de Bruyn Alberda van Ekenstein, y es llevada a cabo a alta temperatura y pH alcalinos (Barker et al., 1973). Dado que la isomerización química de la D-glucosa es inespecífica y lleva a la formación de productos coloreados no deseados, a la generación de sabores desagradables (off-flavors), y a la reducción de la dulzura, es difícil obtener una concentración de D-fructosa de más del 40% (m/m) utilizando este método. Por estas razones, la producción comercial de HFCS ha empleado desde la década del '60 un sistema de conversión enzimática utilizando la enzima D-xilosa isomerasa.

La similitud de secuencias entre la D-xilosa y la L-arabinosa isomerasa es baja, siendo sólo del 5,0% en *E. coli*, del 5,2% en *T. neapolitana* y 5,6% en *T. maritima*. A pesar de este bajo nivel de similitud, las dos enzimas poseen muchas propiedades en común. Ambas enzimas median la "isomerización" entre una aldosa y una cetosa. En la D-xilosa isomerasa, dicha isomerización se produce a través de un mecanismo denominado "intercambio de hidruros o hydride shift" (apertura del anillo del sustrato, isomerización a través del movimiento o cambio de un hidruro del C-2 al C-1 y cierre del anillo del producto), donde un catión divalente desempeña un papel fundamental en el desarrollo de dicho mecanismo (Collyer y Blow, 1990; Collyer et al., 1990; Lavie et al., 1994; Asboth y Naray-Szabo, 2000; García-Viloca et al., 2003). Este mecanismo de cambio de hidruro en la D-xilosa isomerasa sería el mismo que en la L-arabinosa

isomerasa, ya que los cationes divalentes (Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} , entre otros) contribuyen a la actividad catalítica de esta enzima en cuanto a la isomerización de la D-galactosa (Roh et al., 2000a; Kim et al., 2002; Kim et al., 2003b; Yoon et al., 2001; Yoon et al., 2003; Jørgensen et al., 2004; Lee et al., 2004). Asimismo, ambas enzimas presentan una baja especificidad de sustrato. *In vivo*, la D-xilosa isomerasa transforma D-xilosa en D-xilulosa, aunque, *in vitro*, también lleva a cabo la isomerización de D-glucosa a D-fructosa mientras que, la L-arabinosa isomerasa cataliza *in vivo* la conversión de L-arabinosa a L-ribulosa además de poder isomerizar, *in vitro*, la bioconversión de D-galactosa a D-tagatosa. Ambos procesos de isomerización *in vitro* son los que presentan actualmente un importante interés en su desarrollo de manera de poder lograr diversas aplicaciones comerciales.

Asimismo, se ha descrito que aquellas aldosas tipo glucosa con configuraciones 2,3-treo y 3,4-eritro, en este caso D-galactosa y L-arabinosa, tienden a formar 2-cetosas cuando reaccionan químicamente con el catión Ca^{2+} y trietanolamina en metanol por 10 minutos a 60°C. Esta reacción transcurriría por dos mecanismos, tanto a través de la migración intramolecular de un hidrógeno (intercambio de hidruro 1, 2) como a partir de un intermediario enediol (Tanase et al., 2001). Este estudio ha mostrado tanto el mecanismo catalítico potencial que desarrollan las aldosa-cetosa isomerasas, así como también la esencialidad de la presencia del metal para que la reacción pueda llevarse a cabo.

A Mecanismo de Transferencia de Hidruros



B Mecanismo Enediol

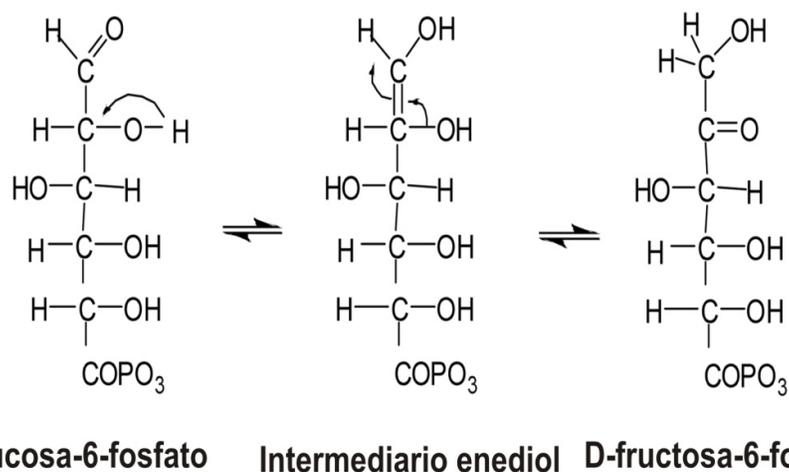


Figura 3.8. Mecanismos de reacción propuestos para isomerasas metal (A) y no metal (B) dependientes.

Los iones metálicos juegan un rol esencial en la estabilización de los intermediarios a lo largo de la reacción, mecanismo conocido como transferencia de hidruros (Asboth y Naray-Szabo, 2000), típico de las enzimas L-arabinosa y D-xilosa

isomerasa. Por otro lado, el mecanismo enediol es típico de aquellas isomerasas que no requieren metal para la reacción, como la glucosa-6-fosfato y tagatosa-6-fosfato isomerasa, tal como puede observarse en la **Figura 3.8** (Kim et al., 2010a).

Por otro lado, la evolución directa de las diferentes enzimas con el objetivo de alterar la especificidad de sustrato, ha permitido observar que una pequeña modificación en la estructura aminoacídica cercana al sitio activo ha conllevado a cambios conformacionales importantes en la estructura de la enzima, alterando la posición del ión metálico y derivando en una disminución de la actividad. En cambio, para las isomerasas no metal dependientes, dichas mutaciones conllevaron a un incremento considerable de la actividad, dado que se encuentran disponibles un mayor número de posiciones no esenciales para la modificación. Por lo tanto, alterar la especificidad hacia el sustrato e incrementar la actividad en forma simultánea, es más factible en isomerasas no metálicas que en metaloenzimas.

Con respecto a la especificidad de la enzima L-arabinosa isomerasa para catalizar la isomerización de varias aldosas, se realizaron estudios *in silico* del sitio activo empleando una enzima L-arabinosa isomerasa de *B. licheniformis*, únicamente activa hacia L-arabinosa (sustrato específica) y una proveniente de *G. stearothermophilus*, activa hacia D-galactosa y L-arabinosa (no específica). Los resultados del modelado revelaron que la especificidad de dicha enzima se debe a un solo aminoácido de diferencia entre los dos sitios activos (Glutamina en *B. licheniformis* y Glicina en *G. stearothermophilus*), lo que conduce por un lado, a la disminución del tamaño del sitio activo, lo que no permite el acomodamiento correcto de la D-galactosa y, por otro lado, no acontece la formación de enlaces puente de hidrógeno entre el C-1 y el C-2 de la D-galactosa con el sitio activo, por lo que la transferencia del protón está impedida y la reacción no ocurre (Prabhu et al., 2010).

3.4.10. Otras aplicaciones de la enzima L-arabinosa isomerasa

Actualmente, las isomerasas se han convertido en moléculas biológicas tecnológicamente interesantes, debido a que juegan una función pivote en la biosíntesis

de azúcares raros o no comunes (Granström et al., 2004; Izumori, 2002; Izumori, 2006). Como consecuencia de su escasez en la naturaleza y sus elevados costos de producción, los mismos están disponibles en pequeñas cantidades y a un elevado costo.

El empleo de L-nucleósidos se ha incrementado dramáticamente debido a su potencial actividad biológica y menor toxicidad en relación a los D-nucleósidos (Cho et al., 2005). Aunque la mayoría de los L-nucleósidos pueden sintetizarse de la L-ribosa (Ahmed et al., 1999), este importante precursor para la síntesis de drogas antivirales, no está disponible en cantidades abundantes en la naturaleza (Akagi et al., 2002) y, por ende, debe de sintetizarse químicamente (Yun et al., 2005). Una de las posibilidades alternativas para la síntesis de L-ribosa está basada en la isomerización enzimática de la L-ribulosa (Zakaria, 2001; De Muynck et al., 2007; Helanto et al., 2007; Helanto et al., 2009; Zhou y Wu, 2012) donde, la enzima L-arabinosa isomerasa, intervendría en la producción de dicha cetopentosa a partir de L-arabinosa, un azúcar mucho más económico y disponible en mayores cantidades en la naturaleza (Yeom et al., 2008). Cabe aclarar que, en este caso, no se busca una enzima con actividad *in vitro* hacia la D-galactosa, sino una enzima altamente específica hacia su sustrato natural, la L-arabinosa, de manera de poder trabajar directamente con desechos orgánicos que contengan la mencionada aldopentosa (Kim et al., 2009).

3.5. Técnicas de purificación utilizadas para obtener preparaciones puras de la enzima L-arabinosa isomerasa

3.5.1. Precipitación salina con sulfato de amonio

Las proteínas son moléculas anfipáticas que en disolución se encuentran solvatadas por moléculas de agua, exponiendo hacia el exterior (fase acuosa) sus porciones hidrofílicas y permaneciendo los grupos hidrofóbicos en el interior. El sulfato amónico en concentraciones bajas (poca fuerza iónica) aumenta la solubilidad de las proteínas (solubilización por salado); sin embargo, cuando se añade a altas concentraciones (elevada fuerza iónica) se consigue la precipitación por salado de las

mismas. Las moléculas de sulfato amónico, entre otras acciones, disminuyen la solvatación (hidratación) de las proteínas, al competir exitosamente por las moléculas de agua, por lo que aquéllas exponen sus grupos hidrofóbicos, que interactúan entre sí mediante fuerzas de Van der Waals, lo que provoca su precipitación.

3.5.2. Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) permite separar las proteínas de acuerdo a la hidrofobicidad de sus superficies, basándose en la interacción reversible entre los parches hidrofóbicos de las proteínas y la superficie hidrofóbica de la resina de HIC. La interacción entre ambos está altamente influenciada por la presencia de sales en el buffer de corrida, de modo tal que, una alta concentración salina incrementa sustancialmente la interacción, mientras que, disminuyéndola, se debilita la misma interacción. De esta forma, aquellas proteínas que poseen la menor hidrofobicidad relativa a las otras proteínas presentes, serán las que eluyan primero al disminuir la concentración de sal.

Cuando una sustancia hidrofóbica, como una proteína o un ligando, es sumergida en agua, un fenómeno análogo a la tensión superficial acontece, principalmente debido a que las moléculas de agua no pueden mojar la superficie hidrofóbica, debido a la imposibilidad de formar puentes de hidrógeno, estructurándose alrededor de la molécula y formando una capa de agua. Así, al minimizar la extensión de esta capa, habrá un menor número de moléculas de agua ordenadas disponibles, lo que genera una situación termodinámica favorable en la cual la entropía se incrementa. Así, para ganar entropía, las sustancias hidrofóbicas deben combinarse de manera de minimizar el área total de dichas capas. De esta forma, la interacción hidrofóbica depende del comportamiento de las moléculas de agua más que de la atracción directa entre moléculas hidrofóbicas.

Esta técnica constituye un paso ideal cuando las muestras ya han sido precipitadas con sulfato de amonio o luego de una cromatografía de intercambio iónico, ya que en ambos casos la muestra objetivo contiene altas concentraciones salinas, pudiéndose, por tanto, aplicarse directamente a la columna. Los medios HIC se pueden clasificar en dos

categorías principales, dependiendo de sus interacciones con los componentes de la muestra: las cadenas estrictamente alquílicas (butil, octil, éter, isopropil) que muestran un carácter puramente hidrofóbico y los ligandos arílicos (fenil, por ejemplo), los cuales presentan un comportamiento mixto donde la presencia de interacciones hidrofóbicas y aromáticas y la ausencia de cargas, le asignan propiedades cromatográficas finales diferentes.

3.5.3. Cromatografía de intercambio iónico (IEC)

La cromatografía de intercambio iónico (IEC) separa a las moléculas a partir de sus diferencias en la carga neta superficial. Como las moléculas de proteína varían considerablemente su carga en función del pH, exhibirán diferentes grados de interacción con el medio cromatográfico que dependerán de la carga global, densidad de cargas y distribución de la carga superficial. Los grupos cargados dentro de una molécula que contribuyen a la carga superficial neta, poseen diferentes valores de pKa dependiendo de su estructura y del microambiente químico en el que se encuentren. En el caso de las proteínas, que están construidas de diferentes aminoácidos conteniendo grupos débilmente ácidos y básicos, su carga superficial neta cambiará gradualmente mientras el pH del ambiente cambie, comportándose como moléculas anfotéricas. La IEC se basa en que la relación entre la carga superficial neta y el pH es única para cada proteína. En una IEC ocurren interacciones reversibles entre las moléculas cargadas y el medio de IEC cargado opuestamente de modo de favorecer la unión o elución de moléculas específicas y así lograr la separación. Un medio para IEC comprende una matriz de partículas esféricas sustituidas con grupos iónicos que están cargados negativamente (catiónico) o positivamente (aniónico). Adicionalmente la matriz es porosa, de manera de lograr una elevada área superficial interna. El medio está empaquetado en una columna de manera de formar un lecho empacado, el cual es equilibrado con buffer que llena los poros de la matriz y el espacio entre las partículas. El pH y la fuerza iónica del buffer de equilibrado son seleccionados de manera de asegurar que, cuando la muestra es cargada, las proteínas de interés se unan a la resina y la mayor cantidad de impurezas no lo hagan. De esta forma, la muestra deseada es

concentrada en la columna mientras que, las moléculas que no tengan la carga superficial correcta, son arrastradas a través de la columna. Es importante aclarar que es muy importante la condición de la muestra, de manera de lograr la mayor resolución o separación de grupos y maximizar la carga de muestra. Idealmente, la muestra de partida debe estar en las mismas condiciones que el buffer de partida. Cuando toda la muestra ha sido cargada y la columna lavada de manera de que todas las proteínas débilmente unidas hayan atravesado la columna (por ejemplo, cuando la señal UV a 280 nm haya regresado a la línea de base), las condiciones se alterarán de manera de eluir las proteínas unidas. Para ello, en general se incrementa la fuerza iónica del buffer (concentración de sal) o más raramente, cambiando el pH. A medida que la fuerza iónica aumenta, las sales iónicas (en general Na^+ o Cl^-) compiten con los componentes unidos por las cargas sobre la superficie del medio y una o más de las especies unidas comenzarán a eluir y desplazarse por la columna. A mayor carga neta de la proteína a un cierto pH, más retenida se encontrará a la resina y mayor fuerza iónica precisará para su elución. Así, controlando los cambios en la fuerza iónica a través del uso de diferentes formas de gradiente, las proteínas de interés son eluidas diferencialmente en una forma purificada y concentrada.

3.6. Inmovilización

Las enzimas son biocatalizadores con excelentes perspectivas para su implementación en la industria, dado que poseen alta actividad en condiciones suaves, alta estero- y regioselectividad. Sin embargo, las mismas poseen un origen biológico y han evolucionado para satisfacer un conjunto de requerimientos fisiológicos, algunas veces opuestos a las necesidades de la industria (son solubles, inestables y diseñadas para trabajar sobre compuestos orgánicos bajo condiciones fisiológicas). Por lo tanto, la inmovilización es usualmente requerida para la mayoría de las aplicaciones industriales de las enzimas (Mateo et al., 2007a). En general, el proceso de inmovilización permite el aumento de la estabilidad de la enzima, la reutilización del derivado y su empleo en procesos altamente controlados a través de su inclusión en reactores enzimáticos.

De esta manera, la inmovilización de enzimas en carriers o soportes es un método adecuado para lograr un aumento en la estabilidad con retención de la actividad, lo que permite el uso continuo de dichas proteínas inmovilizadas en procesos industriales. Para una enzima o proteína específica, la estabilidad depende de la estructura de la enzima nativa y del soporte seleccionado (Mateo et al., 2007b).

3.6.1. Soportes para la inmovilización

Las características físicas de las matrices (diámetro medio de la partícula, hinchamiento, resistencia mecánica y a la compresión) son de importancia fundamental para el funcionamiento de los sistemas inmovilizados y determinarán el tipo de reactor empleado (Brena y Batista-Viera, 2006). En particular, el tamaño de la partícula y los parámetros del poro, determinan el área superficial total y, por lo tanto, afectan en forma crítica la capacidad de unión de enzimas.

Tabla 3.10. Clasificación de los soportes de acuerdo a su composición (adaptado de Guisán, 2006).

Orgánicos

Polímeros naturales

- polisacáridos: celulosa, dextranos, agar, agarosa, quitina, alginato
- proteínas: colágeno, albúmina
- carbono

Polímeros sintéticos

- Poliestirenos
 - Otros polímeros: poliacrilato, polimetacrilato, poliacrilamida, poliamidas,
-

polímeros vinilos y alilos

Inorgánicos

Minerales naturales: bentonita, sílice

Materiales procesados: vidrio (no poroso y de poro controlado), metales, óxidos metálicos de poro controlado

En particular, los soportes porosos son generalmente preferidos debido a que su gran área superficial permite una mayor carga enzimática, logra una mayor protección del medioambiente y las interacciones formadas son planas evitando el impedimento estérico, a pesar de poseer mayores restricciones difusionales en comparación a los soportes no porosos. Estos últimos, no poseen resistencia a la transferencia de masa, aunque su escasa área superficial hace que los mismos deban ser dispuestos en finas fibras o nanopartículas, haciendo muy complicada su separación del medio reaccional, lo que limita su uso en sistemas continuos en lecho fijo y fluidizado. Asimismo, los soportes porosos deberían poseer una distribución de poro controlada de manera de optimizar las propiedades de capacidad y flujo. Por otro lado, a pesar de las numerosas ventajas de los soportes inorgánicos (alta estabilidad contra la degradación química, física y microbiana), en la mayoría de las aplicaciones industriales se emplean matrices orgánicas, dado el carácter hidrofílico de los mismos, que resulta ser determinante para el nivel de actividad de la enzima (Gemeiner, 1992).

Numerosos soportes comerciales para la inmovilización de enzimas se encuentran disponibles y su selección dependerá de las propiedades del catalizador y de su uso pretendido (White y Kennedy, 1980; Taylor, 1991).

3.6.1.1. Quitosano

Los polímeros naturales presentan ventajas en relación a los polímeros sintéticos dado que son biodegradables y biocompatibles, aunque puedan exhibir una limitación

en su reactividad y procesamiento. De esta forma, la quitina, poli(N-acetil-1,4-β-D-glucopiranosamina) es el segundo polisacárido más abundante de la naturaleza formando parte del exoesqueleto de los crustáceos, las membranas de los insectos y las paredes celulares de los hongos (Synowiecki y Al-Khateeb, 2003; Rinaudo, 2006). A nivel estructural es similar a la celulosa, el polímero natural más abundante. Paralelamente, el quitosano (**Figura 3.9**) es obtenido de la desacetilación de la quitina siendo un copolímero lineal de 2-acetoamido-2-desoxi-D-galactopiranososa (GlcNAc) y β-(1→4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa (GlcN) con un contenido de GlcN mayor al 50% (Chen et al., 2011).

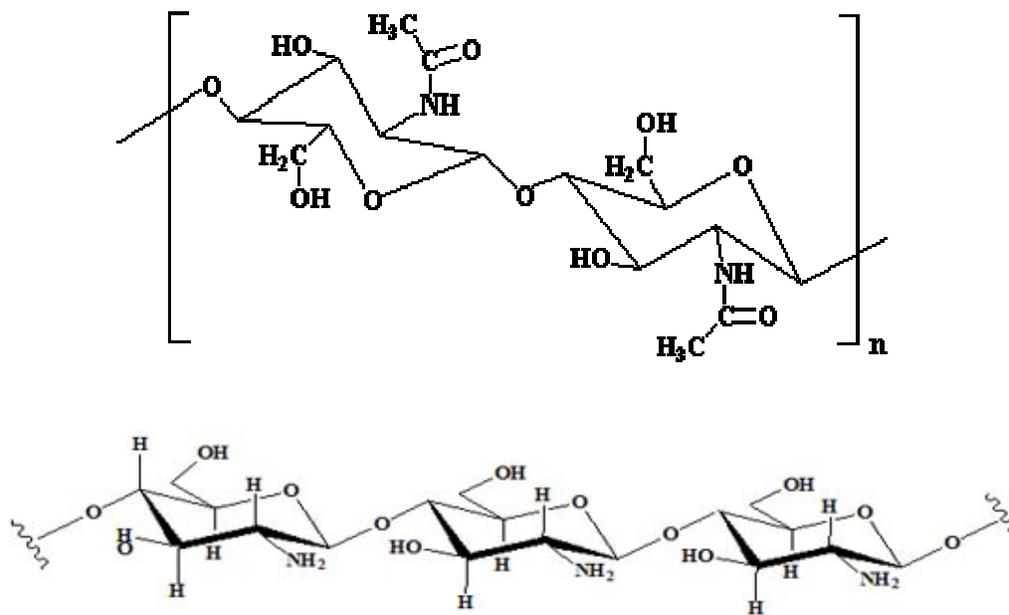


Figura 3.9. Estructura de la quitina (arriba) y de su derivado desacetilado, el quitosano (abajo).

Las aplicaciones de la quitina son menores a las del quitosano, dado que la quitina es químicamente inerte e insoluble en agua y ácidos, mientras que el quitosano es relativamente reactivo y puede ser procesado en numerosas formas (Shi et al., 2006).

El quitosano muestra un alto porcentaje de nitrógeno (6,89%), que lo coloca como un potencial agente gelificante industrial (Muzzarelli, 1973).

La solubilidad del quitosano depende de la distribución de los grupos amino libres y de los grupos N-acetilo. En ácidos diluidos (pH <6,5) como ácido acético y fórmico, los grupos amino libres se encuentran protonados y la molécula se vuelve soluble.

Los grupos amino libres presentes en el polímero pueden adquirir una carga positiva en presencia de soluciones ácidas formando una sal soluble que le da al quitosano numerosas propiedades, destacándose la quelación a iones metálicos, enzimas y grasas (Maghami y Roberts, 1988). En pH ácido, el quitosano se comporta como un polielectrolito con alta densidad de carga (una carga positiva/molécula de glucosamina), lo que le permite interactuar con las enzimas, dado que ellas están cargadas negativamente (Craveiro et al., 1999).

La presencia de grupos amino e hidroxilos reactivos le proveen la capacidad de ser modificado químicamente de manera de asignarle propiedades fisicoquímicas útiles y funciones biológicas distintivas (Kurita, 2001; Tharanathan y Kittur, 2003; Sashiwa y Aiba, 2004; Mourya e Inamdar, 2008). Las reacciones específicas que sufre involucran el grupo amino (N-acetilación y reacción de Schiff) en la posición C-2 y las reacciones no específicas, que incluyen a los grupos hidroxilo ubicados en el C-3 y C-6 (esterificación y eterificación) dando lugar a reacciones químicas como acilación, cuaternización, carboximetilación, galactosilación, sulfatación y tiolación, permitiendo obtener una gran variedad de productos con propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, anticoagulantes y con propiedades de liberación controlada de sustancias, dado que pueden atravesar las diferentes barreras o mucosas (Van der Lubben et al., 2001). Asimismo, este gran número de grupos aminos primarios, permite que el quitosano sea modificado homogéneamente en medio acuoso en base a la nucleofilicidad de los mismos (Kumar et al., 1999). El grado de desacetilación del quitosano nunca es completo y representa una propiedad importante de dicha molécula, dado que mide la cantidad de grupos amino libres en el polisacárido.

3.6.2. Métodos de inmovilización

Los soportes para la inmovilización deben presentar una elevada densidad de grupos funcionales naturales o de fácil activación de manera de ligar fuertemente la enzima. Asimismo, la fuerza de la unión está garantizada por una congruencia geométrica entre la enzima y el soporte.

Existen numerosos acercamientos para inmovilizar la enzima a un soporte que van desde una adsorción física reversible y enlaces iónicos a enlaces covalentes estables. La mejor forma de clasificarlos es en función de la reversibilidad de la interacción (Gupta y Mattiasson, 1992). La fuerza de la unión es inversamente proporcional a la reversibilidad de la interacción, es así que, la estabilidad y la reversibilidad, son parámetros difíciles de satisfacer en forma simultánea. A nivel global, como criterio general, se busca sacrificar la reversibilidad de manera de ganar en estabilidad de la enzima.

En la mayoría de los procesos, la inmovilización covalente ha demostrado que imparte una muy buena estabilidad a largo plazo y permite, además, un uso repetido de la enzima inmovilizada.

3.6.2.1. Métodos reversibles

Con este tipo de unión al soporte, las enzimas pueden ser liberadas del soporte bajo condiciones suaves. El uso de métodos reversibles es atractivo económicamente dado que, cuando la actividad enzimática en el soporte decae tanto por la liberación como por la desnaturalización de la enzima, una nueva porción de enzima activa puede ser incorporada al soporte, regenerándolo, lo que reduce considerablemente los costos en los casos donde el soporte es el principal gasto del biocatalizador. A pesar de ello, la inmovilización reversible es usualmente empleada para inmovilizar enzimas lábiles y para aplicaciones en sistemas bioanalíticos (Woodward, 1985). Entre los métodos reversibles, se destacan: la adsorción, la unión covalente por puentes disulfuro y la unión por quelación (**Figura 3.10**).

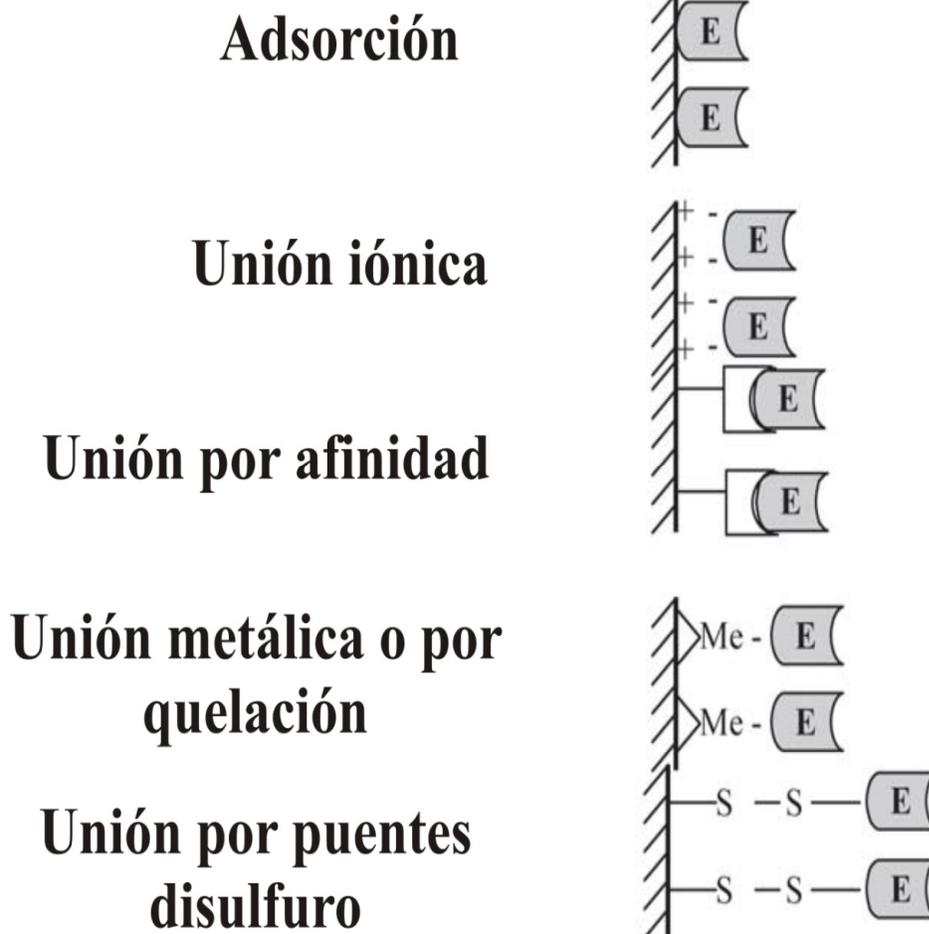


Figura 3.10. Métodos reversibles para la inmovilización de enzimas. Extraído y adaptado de Guisán, 2006 (ed.).

3.6.2.2. Métodos irreversibles

Este tipo de metodología se fundamenta en que, una vez que la enzima se ha unido al soporte, no podrá ser liberada sin destruir la actividad biológica y/o el soporte. Los procedimientos más comunes para este tipo de inmovilización son el acoplamiento covalente, el entrapamiento, la micro-encapsulación y el entrecruzamiento (**Figura 3.11**).

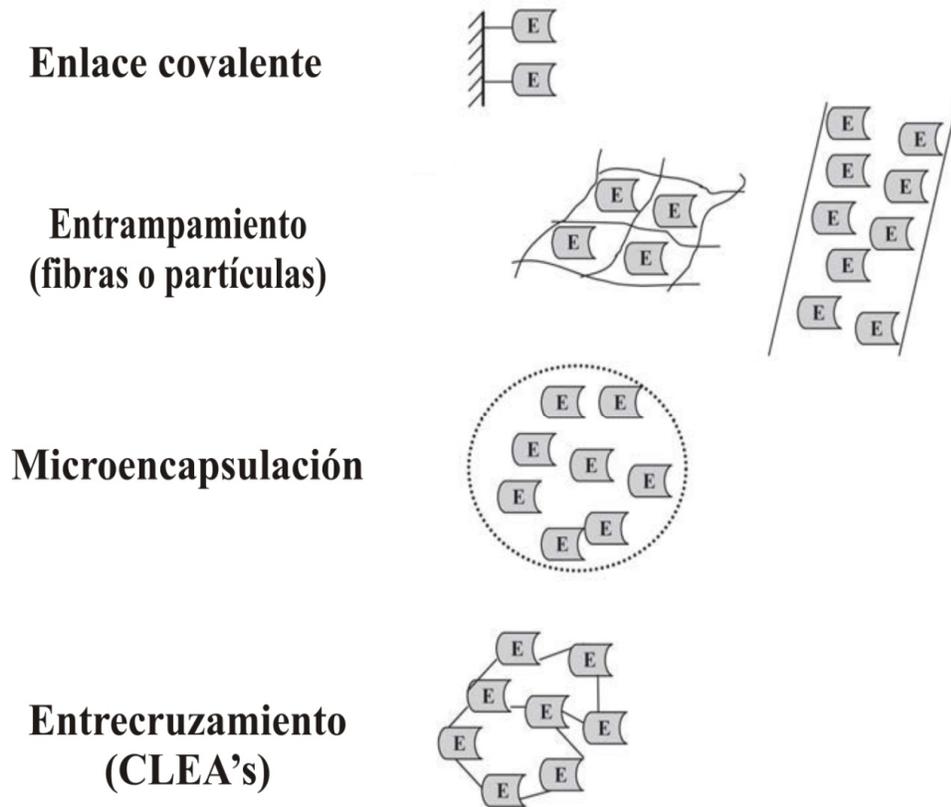


Figura 3.11. Métodos irreversibles para la inmovilización de enzimas. Extraído y adaptado de Guisán, 2006 (ed.).

Entre ellos, la inmovilización por enlaces covalentes es el más empleado, dado que la enzima tiene menos posibilidades de ser liberada a la solución luego del uso del biocatalizador, debido a la estabilidad de los enlaces formados. De hecho, esta técnica es empleada cuando se requiere una ausencia completa de la enzima en el producto.

Las interacciones covalentes en el biocatalizador se producen por reacción entre algún grupo funcional presente en los residuos aminoacídicos, usualmente los grupos amino presentes en los residuos de L-lisina y en el extremo amino terminal, y un grupo presente en la matriz.

A medida que el número de interacciones covalentes entre la enzima y el soporte aumenta, la estructura de la enzima resulta más rigidizada, lo que conlleva a una mayor estabilidad a los factores de inactivación enzimática (pH, temperatura, solventes orgánicos), aunque este efecto puede comprometer seriamente la actividad enzimática, dado que no permite el reacomodamiento adecuado de la enzima durante la reacción con el sustrato (Klibanov, 1979; 1982; 1983a,b; Gupta, 1991). En general, se pretende conseguir varias interacciones covalentes (2-3 es lo ideal) de manera de obtener biocatalizadores estables y más activos, además de no involucrar residuos de aminoácidos esenciales para la actividad catalítica.

3.6.2.2.1. Métodos de activación del soporte

Para la inmovilización covalente de la enzima, es necesario que los soportes presenten grupos que sean susceptibles de reaccionar con los grupos funcionales presentes en los residuos de aminoácidos de la enzima. Dicha activación, puede dividirse en dos clases principales: aquellos donde la matriz es activada por adición de una función reactiva a un soporte y, aquellos donde la modificación del terminal del soporte es realizado mediante el agregado de una sustancia reactiva para producir un grupo activado (**Tabla 3.11**). Los procesos de activación se encuentran diseñados para generar grupos electrofílicos en el soporte que, subsecuentemente, serán atacados por los potentes grupos nucleofílicos de la enzima. Los principios básicos que controlan el acoplamiento covalente a las matrices son similares a aquellos empleados en la modificación química de las proteínas. Las reacciones más frecuentemente empleadas involucran las siguientes cadenas laterales de aminoácidos: L-lisina (grupo amino ϵ), L-cisteína (grupo tiol o disulfuro), ácidos glutámico y aspártico (grupo carboxilo), L-metionina (grupo tioéter), L-arginina (grupo guanidino), L-triptófano (grupo indol), L-tirosina (grupo fenol), L-histidina (grupo imidazol) y L-serina (grupo hidroxilo). Las reacciones covalentes más empleadas son aquellas que forman enlaces amida, éter, tioéter o carbamatos.

Tabla 3.11. Métodos de unión covalente de las enzimas.

Método de activación	Grupo reaccionante (con la matriz activada)
Cloruro de tresilo, cloruro de sulfonilo	Tiol, amino
Bromuro de cianógeno	Amino
Bisoxiranos (epóxidos)	Tiol, amino
Epiclorhidrina	tiol, amino
Glutaraldehído	Amino
Glicidol-glioxil	Amino
N-hidroxisuccinimidil éster	Amino

Asimismo, es importante aclarar que el aminoácido L-lisina, además de intervenir en numerosas reacciones químicas, es uno de los más abundantes teniendo en cuenta la composición aminoacídica media porcentual de la mayoría de las proteínas, y suele encontrarse expuesto a la superficie de la enzima, por lo que es factible de que reaccione sin perjudicar la actividad enzimática.

3.6.3. Efectos del proceso de inmovilización sobre la enzima

Como consecuencia del proceso de inmovilización, ciertas propiedades de la enzima, como actividad catalítica o estabilidad térmica, resultan alteradas con respecto a su contraparte soluble (Trevan, 1980; Hartmeier, 1988). Esta modificación puede ser causada por tanto cambios en la actividad intrínseca de la enzima inmovilizada como por el hecho de que la interacción entre la enzima inmovilizada y el sustrato acontece en un microambiente diferente al de la solución (efectos electrostáticos, hidrofílicos o

hidrofóbicos y de partición). Asimismo, esta alteración puede deberse a alteraciones en la conformación tridimensional provocada por la unión de la enzima a la matriz y/o por efectos estéricos. Además, la estabilidad operacional de la enzima también se ve aumentada, en particular en aquellos soportes donde la enzima es inmovilizada en forma covalente multipuntual (Blanco et al., 1989).

Por otro lado, también son evidenciadas restricciones difusionales, en particular cuando son empleados sustratos macromoleculares, lo que distorsiona el valor observado de actividad catalítica (Guisán et al., 1997).

3.6.4. Producción de D-tagatosa empleando un biocatalizador inmovilizado

Para producir D-tagatosa eficientemente, tanto la L-arabinosa isomerasa como las células que contengan la enzima deben estar inmovilizadas y, a continuación, dicho biocatalizador inmovilizado debe colocarse en un biorreactor para poder efectuar la producción industrial de D-tagatosa. En términos de productividad en relación a la biomasa como productividad específica, las células inmovilizadas se han mostrado como más eficientes que las enzimas inmovilizadas, es decir que, utilizando la misma masa de células, la producción de D-tagatosa por las células inmovilizadas es mayor que la de la enzima inmovilizada (Jung et al., 2005).

La menor producción de D-tagatosa de las enzimas inmovilizadas obtenidas de la misma masa celular es debido a la actividad disminuida resultante del proceso de purificación de la enzima. Por el contrario, el reactor con enzimas inmovilizadas puede emplearse con elevadas concentraciones de enzima, mientras que en el reactor de células inmovilizadas no pueden emplearse elevadas concentraciones celulares, debido a que las células inmovilizadas contienen altos niveles de otros materiales celulares, los cuales no poseen actividad productora de D-tagatosa y además, causan limitaciones o impedimentos estéricos (Jung et al., 2005). Como resultado, el reactor de enzima inmovilizada posee un mayor título de conversión a D-tagatosa, un mayor rendimiento de conversión y una mayor productividad volumétrica que el reactor de células inmovilizadas. Por ejemplo, la L-arabinosa isomerasa de *G. stearothermophilus*

inmovilizada por entrapamiento con alginato ha producido D-tagatosa con una productividad de $1.296 \text{ g l}^{-1} \text{ día}^{-1}$, la mayor productividad informada hasta el día de la fecha (Ryu et al., 2003). En cambio, un biorreactor de células de *E. coli* inmovilizadas en alginato y expresando de forma recombinante la L-arabinosa isomerasa de *G. stearothermophilus*, obtuvo una productividad de $70 \text{ g l}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (Jung et al., 2005), mientras que, las células de *E. coli* inmovilizadas y que expresan la L-arabinosa isomerasa de *Thermotoga neapolitana*, arrojaron una productividad de $98 \text{ g l}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (Hong et al., 2007). Mediante la manipulación genética de la secuencia aminoacídica, Rhimi et al., (2009a), consiguieron disminuir el pH óptimo de reacción, obteniendo simultáneamente un rendimiento de conversión del 47% a 70°C , similar al de la enzima nativa proveniente del *G. stearothermophilus* US100, aunque a pH 7,5. Además, Zhang et al., (2011a) han utilizado células de *E. coli* donde la enzima L-arabinosa isomerasa de *B. licheniformis* ha sido expresada en forma recombinante obteniendo una productividad de $56,7 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a 400 g l^{-1} de L-arabinosa luego de 7 ciclos repetidos para la producción de L-ribulosa reteniendo el 89% del rendimiento inicial luego de 33 días de reacción.

Además, Liang et al., (2012) han inmovilizado la enzima L-arabinosa isomerasa de *Thermoanaerobacter mathranii* en alginato de calcio obteniendo un rendimiento de reacción de 43,9% en relación a un 38% de la enzima libre en condiciones optimizadas de pH y temperatura. Previamente, Jørgensen et al., (2004) habían utilizado la misma enzima aunque dispuesta como un agregado enzimático entrecruzado con glutaraldehído para la conversión secuencial de D-lactosa a D-tagatosa utilizando β -galactosidasa, D-glucosa isomerasa y la mencionada enzima, obteniéndose un rendimiento de conversión del 42% luego de 2 días a 65°C y empleando una concentración de lactosa de 300 g l^{-1} . Asimismo, en dicho trabajo se analizó la estabilidad de la enzima luego de su utilización durante 5 ciclos de conversión sucesivos, comprobándose su estabilidad en esas condiciones. Asimismo, Oh et al., (2001) inmovilizaron en partículas de alginato de calcio entrecruzadas con glutaraldehído, la enzima proveniente de *E. coli* W3110 y luego las colocaron en un reactor de lecho empacado, obteniendo una productividad de 30 g de D-tagatosa $\text{l}^{-1} \text{ día}^{-1}$ a partir de 100 g l^{-1} de D-galactosa durante 8 días.

La enzima L-arabinosa isomerasa de *G. stearothermophilus* fue expresada en *B. subtilis* y en *E. coli* e inmovilizada en 2 mg chitopearls, partículas esféricas comerciales de quitosano entrecruzadas y preactivadas, obteniéndose una productividad mayor en el extracto de *B. subtilis* (4,3 g de D-tagatosa l⁻¹ a 69,4 mg l⁻¹ h⁻¹) que en *E. coli* (2,9 g de D-tagatosa l⁻¹ a 46,8 mg l⁻¹ h⁻¹) a partir de 10 g l⁻¹ de D-galactosa durante 62 horas. De esta manera, la producción fue un 48% mayor en *B. subtilis* que en *E. coli* (Cheon et al., 2008).

Asimismo, Zhang et al., (2010a,b), utilizando la enzima L-arabinosa isomerasa de *B. licheniformis* para producir L-ribulosa, intermediario de la síntesis de nucleótidos a partir de L-arabinosa, inmovilizaron la enzima por entrampamiento en quitosano y alginato. Además, fueron ensayadas las matrices Eupergit C (soporte obtenido a partir de la bisacrilamida y el metacrilato), agarosa activada por CNBr y carboximetilceluloasa empleando unión covalente, obteniéndose los mejores resultados con Eupergit C (carga de enzima: 4 mg g⁻¹ de soporte; eficiencia de inmovilización del 83,7% y recuperación de la actividad del 93,3%). Asimismo, luego de la optimización del proceso, la eficiencia fue incrementada al 86,4% de la actividad de la enzima libre y la actividad retenida fue del 95,1% luego del proceso de producción semicontinuo de L-ribulosa (8 ciclos), cuando la misma fue inmovilizada en el soporte comercial Eupergit C.

En un trabajo posterior, Zhang et al., (2011a) han inmovilizado la enzima L-arabinosa isomerasa proveniente de *B. licheniformis* en partículas de vidrio (nanopartículas de sílice modificada) mesoporosas derivatizadas con aminopropilo (BG-1, BG-3, BG-4 y BG-5) las cuales poseen diferentes grados de porosidad (de mayor a menor, respectivamente), de grupos amino y de área superficial. De aquí, se observó que la cantidad de enzima inmovilizada es directamente proporcional a la cantidad de grupos amino superficiales e inversamente proporcional a la reducción del tamaño de la partícula (mayor área superficial). De las mismas, el derivado inmovilizado en la partícula BG-3 resultó tener un incremento del 145% de la actividad de la enzima libre a 4 mg de enzima por gramo de soporte.

Para que la aplicación industrial de esta enzima sea posible, la estabilización de la enzima L-arabinosa isomerasa, resulta esencial. En un trabajo realizado por Jebors et al., (2011) se ha comprobado que con el agregado de dos supramoléculas sintéticas a una concentración de 1mM, denominadas Noria y NoriaPG (compuestos fenólicos sintetizados a partir de la condensación catalizada por ácido del glutaraldehído con el resorcinol), se ha conseguido incrementar la estabilidad de la enzima a temperaturas mayores y pH menores que sus óptimos para la enzima, aunque sin alterar dichos parámetros, lo que indicaría su influencia estricta sobre la estabilidad y no sobre la actividad. De todas maneras, el mecanismo por el cual realiza dicha acción, aún es desconocido.

Adicionalmente, también pueden encontrarse estudios, aunque con poco éxito, sobre el proceso de inmovilización de la enzima por entrapado en geles de quitosano y alginato de calcio (Kim et al., 2003b; Rhimi et al., 2007b; Liang et al., 2012).

Finalmente, es importante mencionar que el glutaraldehído, junto con la polietilenimina, han sido empleados oportunamente en la obtención de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEA®s) de la enzima L-arabinosa isomerasa (Jørgensen et al., 2004; Cowan y Fernández-LaFuente, 2011) siendo, el de Jørgensen, el único trabajo reportado en la actualidad, el que fue empleado el agente activante glutaraldehído. Oh et al., (2001) también emplearon la técnica de entrapamiento en alginato de sodio con el agregado de glutaraldehído, utilizando diferentes concentraciones de alginato de sodio y de glutaraldehído luego del entrapado de la enzima, encontrando que la relación de inmovilización ideal es de 4% (*m/v*) de alginato y 0,2% (*v/v*) de glutaraldehído.

3.6.5. Comparación de la producción de D-tagatosa

Un resumen de la producción de D-tagatosa a partir de la D-galactosa por diversas L-arabinosa isomerasas y células conteniendo la enzima, se muestra en la **Tabla 3.12**. El contenido de los productos de la reacción de isomerización, se encuentra determinado por la temperatura a la que es llevada a cabo la reacción, ya que el equilibrio de dicha reacción es desplazado hacia el producto, D-tagatosa, al aumentar la

temperatura. Los niveles más altos de producción de D-tagatosa reportados son de 230 g l⁻¹ de D-tagatosa a partir de 500 g l⁻¹ de D-galactosa empleando la enzima inmovilizada de *G. stearothermophilus* contenida en un biorreactor continuo de lecho empacado con reciclo siendo la productividad informada, de 230 g l⁻¹ día⁻¹ (Kim et al., 2003a). En el modo continuo utilizando la enzima inmovilizada, se produjeron 145 g l⁻¹ de D-tagatosa a partir de 300 g l⁻¹ de D-galactosa con una productividad de D-tagatosa promedio de 1.296 g l⁻¹ día⁻¹, la mayor productividad informada hasta la actualidad (Ryu et al., 2003); la misma fue 5,6 veces superior a la correspondiente al biorreactor en modo continuo con reciclo. Dicho aumento de productividad puede deberse a la utilización de 1,5 veces más cantidad de enzima y al modo continuo de reacción, como así también a la operación del reactor bajo condiciones optimizadas tales como tamaño del lecho, relación largo/diámetro del reactor, tasa de dilución, cantidad de enzima total empleada y concentración de sustrato.

En definitiva, el mayor rendimiento de conversión de D-tagatosa reportado a la actualidad, 68% a 85°C, se obtiene de la biocatálisis llevada a cabo por la L-arabinosa isomerasa de *Thermotoga neapolitana* partiendo de 1,8 g l⁻¹ de D-galactosa (Kim et al., 2002) sin el agregado de ninguna sustancia que incremente la conversión a través del desplazamiento del equilibrio de conversión.

Tabla 3.12. Producción de D-tagatosa a partir de D-galactosa por diferentes L-arabinosa isomerasas.

Enzima (células)	Prod.	Tpo. (días)	T (°C)	D-gal (g l ⁻¹)	Product. (g l ⁻¹ día ⁻¹)	Conv (%)	Refs.
L-AI de <i>G. thermodenitrificans</i>	Batch ^B	1	60	500	370	74	Lim et al., (2007)
<i>T. neapolitana</i>	Batch	0,83	80	1,8	1,02	68,0	Kim et al.,

							(2002)
<i>B. longum</i> (<i>L. lactis</i>)	Batch ^B (10 × 24 h)	10	41	300	185	62	Salonen et al., (2012b)
<i>A. flavithermus</i>	Batch ^B	0,0583	95	0,9	9,26	60	Li et al., (2011)
L-AI mutante de <i>G. thermodenitrificans</i>	Batch	0,21	65	1,8	4,97	58	Oh et al., (2006b)
L-AI de <i>T. marítima</i>	Batch	0,25	80	18	40,3	56	Lee et al., (2004)
L-AI de <i>L. fermentum</i> (<i>L. fermentum</i> ^I)	Cont ^{B,P}	1	65	9	4,95	55	Xu et al., (2012)
<i>L. fermentum</i> L-AI (<i>L. fermentum</i> ^I)	Batch ^B (8 × 24 h)	8	65	9	39,6	55	Xu et al., (2012)
L-AI de <i>Thermus</i> sp.	Batch	3	60	1	0,18	54	Kim et al., (2003b)
L-AI mutante de <i>G. stearothermophilus</i> (Gali152) expresada en	Cont ^P	7	60	100	319	50	Kim et al., (2003a)

<i>E. coli</i> ¹							
L-AI de <i>A. cellulolytics</i>	Batch	0,5	75	9	9	50	Cheng et al., (2010a)
L-AI de <i>G. stearothermophilus</i> ¹	Cont ^P	15	60	300	1.296	48,3	Ryu et al., (2003)
L-AI de <i>G. stearothermophilus</i>	Batch	0,29	70	0,9	1,49	48	Rhimi y Bejar, (2006)
L-AI de <i>G. thermodenitrificans</i>	Batch	0,21	65	1,8	4,11	48	Kim y Oh, (2005)
L-AI mutante de <i>G. stearothermophilus</i> (Gali152) expresada en <i>E. coli</i> ¹	Batch ^P (6 × 24 h)	6	60	500	230	46	Kim et al., (2003a)
L-AI de <i>T. neapolitana</i> ¹	Batch ^S	5	70	300	27,6	46	Lim et al., (2008)
L-AI de <i>G. thermodenitrificans</i>	Batch	0,21	65	1,8	3,94	46	Oh et al., (2006b)

L-AI mutante de L-AI de <i>G. stearothermophilus</i>	Batch	0,41	60	1,8	1,98	45	Kim et al., (2006)
bL-AI de <i>G. stearothermophilus</i> (<i>B. subtilis</i>) ¹	Batch	2,6	60	10	1,66	43	Cheon et al., (2008)
L-AI de <i>T. mathranii</i> ¹	Batch	2	65	300	63	42	Jørgensen et al., (2004)
L-AI de <i>L. plantarum</i>	Batch	4	35	100	9,75	39	Zhang et al., (2007)
<i>G. stearothermophilus</i>	Batch	0,25	60	1,8	2,74	38	Lee et al., (2005a)
L-AI de <i>B. longum</i>	Batch	6	35	300	18	36	Salonen et al., (2012a)
L-AI de <i>G. stearothermophilus</i> US 100	Batch	0,5	65	9	6,5	36	Cheng et al., (2010a)
L-AI de <i>L. sakei</i> 23K	Batch	0,29	40	9	11,2	36	Rhimi et al., (2010)
<i>E. coli</i>	Batch	7	35	50	28,8	35,4	Roh et al.,

							(2000a)
<i>E. coli</i> ¹	Cont ^P	8	37	100	30	30	Oh et al., (2001)
L-AI de <i>B. stearothermophilus</i> US 100*	Cont ^P	-	65	10	72	30	Rhimi et al., (2007a)
L-AI de <i>T. mathranii</i> ¹	Cont ^P	-	70	18	45,6	43,9	Liang et al., (2012)
L-AI de <i>L. plantarum</i> NC8	Batch	0,25	60	25	29,83	30	Chouayek h et al., (2007)
L-AI de <i>G. stearothermophilus (E. coli)</i> ¹	Batch	2,6	60	10	1,12	29	Cheon et al., (2008)
L-AI de <i>G. stearothermophilus</i>	Batch	0,41	60	1,8	1,25	28,5	Kim et al., (2006b)
L-AI de <i>T. neapolitana</i> expresada en <i>E. coli</i> ¹	Cont ^P	0,5	70	180	95,3	27,2	Hong et al., (2007)
<i>E. coli</i>	Batch	5	37	1	0,054	27	Roh et al., (2000b)
L-AI de <i>T. mathranii</i> ¹	Cont ^P	-	75	18	240	23,3	Liang et al., (2012)

L-AI de <i>E. coli</i> ^I	Batch (3 × 48 h)	6	30	500	50	20	Kim et al., (2001b)
L-AI mutante de <i>G. stearothermophilus</i> (Gali152) expresada en <i>E. coli</i> ^I	Cont ^P	20	60	300	69,6	19,5	Jung et al., (2005)
L-AI de <i>G. stearothermophilus</i> (<i>B. subtilis</i>)	Batch	2,6	60	10	0,21	5,6	Cheon et al., (2008)
L-AI de <i>G. stearothermophilus</i> (<i>E. coli</i>)	Batch	2,6	60	10	0,12	3,2	Cheon et al., (2008)

^I Enzima o células inmovilizadas

^B En buffer borato

^P Biorreactor de lecho empacado

^S Reactor de tanque agitado con control de pH

* En producción simultánea de D-fructosa usando D-glucosa isomerasa

En el trabajo descrito por Salonen et al., (2012b) se logró obtener casi una conversión cuantitativa de D-tagatosa (92%) a partir de 20 g l⁻¹ de D-galactosa a 37°C y en presencia de altas concentraciones de borato (580 mM, pH 7,95) usando células en reposo de *L. lactis* expresando la enzima L-arabinosa isomerasa de *B. longum* siendo,

hasta la actualidad, el mayor rendimiento reportado. Asimismo, la conversión con la enzima libre empleando las mismas condiciones fue muy cercana (89%). Por otro lado, sin borato, los rendimientos cayeron a 44% (células) y 49% (enzima libre), respectivamente. De esta manera, como los rendimientos de equilibrio entre las células y la enzima libre son similares, el mecanismo de selectividad diferencial dado por la membrana celular (en este caso, la membrana impediría el ingreso del producto favoreciendo la conversión del sustrato y desplazando el equilibrio de la reacción) no se aplica en este caso, tal como ha sido descrito por Kim et al., (2008c) empleando células de *E. coli*.

Se ha observado que la adición de borato propicia un mayor rendimiento de conversión en relación a un sistema libre sin borato; sin embargo, este efecto es mucho más marcado al emplear células que enzimas libres, debido a que concentraciones extremas de esta sal (y cualquier sal), provocan un efecto inhibitorio de la enzima que puede ser evitado al utilizar células.

A pesar de que la **Tabla 3.12** muestra las productividades obtenidas empleando diferentes enzimas, condiciones y estrategias, estos resultados no son comparables directamente, debido a que las condiciones de reacción (concentración de enzima y sustrato, temperatura, modo y condiciones de operación) varían en los diferentes estudios. Sin embargo, los estudios que muestran la mayor productividad volumétrica descritos por Ryu et al., (2003), Kim y Oh, (2005) y Lim et al., (2007) han empleados altas concentraciones puras de enzima, mayores a $5,1 \text{ g l}^{-1}$, lo que hace que el proceso de producción de D-tagatosa esté lejos de ser económico.

En síntesis, estas limitaciones del proceso hacen indispensables la búsqueda de nuevas fuentes de enzima, el desarrollo de nuevos biocatalizadores conteniendo o la enzima o las células inmovilizadas que sean altamente activos, estables y reutilizables a partir de soportes comerciales o sintetizados *de novo* y, finalmente, la utilización de los mismos en reactores enzimáticos (tanque agitado, de membrana, de lecho empacado o fluidizado) para lograr producciones del cetoazúcar acordes a su introducción y aplicación comercial.