



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SISTEMAS  
INMOVILIZADOS DE LA ALDOSA REDUCTASA**

**TESIS presentada por:**

**TANIA MÉNDEZ PÉREZ**

**A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería  
Química como requisito parcial para obtener el grado de:**

**MAESTRA EN CIENCIAS EN**

**INGENIERÍA QUÍMICA**

**Asesora: Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga**

**Co-asesor: Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco**

**Morelia, Michoacán. Junio de 2018**




Impresión de Tesis  
Oficio número 296/2018.

Lic. Ulises Gutiérrez Vazquez  
Jefe del Departamento de Titulación de la  
U.M.S.N.H.  
Presente.-

Por este medio nos dirigimos a usted de la manera más atenta para notificarle que después de haberle dado seguimiento al desarrollo de la tesis: "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SISTEMAS INMOVILIZADOS DE LA ALDOSA REDUCTASA". Después de haber revisado el manuscrito que presentó de la alumna **Tania Méndez Pérez con matrícula 1505627K**, concluimos que cumple con los requisitos académicos y con lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado para el desarrollo de tesis.

Por lo anterior este Comité Tutorial da el aval para su impresión final.

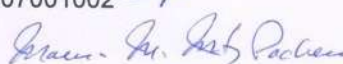
**Atentamente.**

  
Dr. José Ma. Ponce Ortega,  
Coordinador de la Maestría en Ciencias en  
Ingeniería Química.



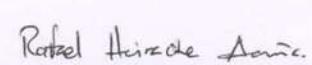
Morelia, Michoacán a 09 de mayo de 2018.


**Presidente o Asesor:** Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga 07001002 

**Coasesor:** Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco 94002061 

**Vocales:**

  
Dr. Horacio González Rodríguez 03003280

  
Dr. Rafael Huirache Acuña 11000201

  
Dr. Rafael Maya Yescas 04002040



**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

Facultad de Ingeniería Química / Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Francisco J. Mújica S/N / Col. Felicitas del Río / C.P. 58030 / Morelia, Michoacán / Tel. y Fax: 443. 327 3584 Ext. 1211  
<http://posgrado.fiq.umich.mx/>



Oficio número 295/2018.

**Asunto:** Liberación de adeudos.

A quien corresponda:

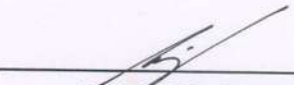
Por medio de la presente se **HACE CONSTAR** que la alumna **Tanía Méndez Pérez** con matrícula **1505627K**, no tiene adeudos académicos ni administrativos en la División de Estudios de Posgrados de la Facultad de Ingeniería Química.

Para los trámites que estime convenientes se extiende la presente en la ciudad de Morelia, Michoacán a los **ocho días del mes de mayo de dos mil dieciocho**.

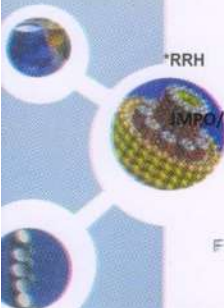
Atentamente.-



DIVISION DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO

  
Dr. José Ma. Ponce Ortega  
Coordinador de la Maestría en Ciencias en  
Ingeniería Química.

*por ausencia*



\*RRH

MPC/mcpa.



**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

Facultad de Ingeniería Química / Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Francisco J. Mújica S/N / Col. Felicitas del Río / C.P. 58030 / Morelia, Michoacán / Tel. y Fax: 443. 327 3584 Ext. 1211  
<http://posgrado.fiq.umich.mx/>

## CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	iii
ÍNDICE DE TABLAS .....	v
NOMENCLATURA .....	vii
RESUMEN .....	viii
ABSTRACT .....	ix
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 GENERALIDADES.....	10
1.1.1 XILITOL .....	10
1.1.2 DEMANDA Y CONSUMO NACIONAL E INTERNACIONAL DE XILITOL .....	12
1.1.3 APLICACIONES DEL XILITOL .....	14
1.2 JUSTIFICACIÓN .....	15
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	15
1.4 HIPÓTESIS .....	16
1.5 OBJETIVOS .....	16
1.5.1 OBJETIVO GENERAL .....	16
1.5.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	17
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO .....	18
2.1 MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE XILITOL .....	18
2.1.1 MÉTODO QUÍMICO .....	18
2.1.2 MÉTODO FERMENTATIVO .....	19
2.1.3 MÉTODO ENZIMÁTICO .....	21
2.2 VÍA DE LOS POLIOLES Y ENZIMA ALDOSA REDUCTASA .....	23
2.3 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA .....	25
2.4 SOPORTES PARA LA INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA .....	27
2.5 ANTECEDENTES DIRECTOS.....	28
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA.....	30
3.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	30
3.1.1 OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO ENRIQUECIDO DE LA ENZIMA ALDOSA REDUCTASA .....	31
3.1.2 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE LOWRY .....	33



3.1.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ALDOSA REDUCTASA (AR) .....	34
3.1.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SORBITOL DESHIDROGENASA (SDH).....	36
3.1.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6FDH) .....	37
3.1.6 ACTIVACIÓN DE LA ENZIMA AR.....	38
3.1.7 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS .....	39
3.1.8 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA Y CUANTIFICACIÓN DE XILITOL.....	42
CAPÍTULO 4. RESULTADOS .....	45
4.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENRIQUECIDO DE LA ENZIMA ALDOSA REDUCTASA.....	45
4.2 ESTABILIDAD DE LA ENZIMA AKR1B1 EN EL TIEMPO .....	47
4.3 ESTRATEGIA PARA LA PRODUCCIÓN DE XILITOL.....	48
4.4 MOTOR QUÍMICO DE REGENERACIÓN DE NADPH.....	50
4.5 ACTIVACIÓN DE LA ENZIMA AR .....	53
4.6 OBTENCIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DE LA ENZIMA AKR1B1 .....	55
4.7 INMOVILIZACIÓN DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO Y CUANTIFICACIÓN DE XILITOL EN LA MEZCLA DE REACCIÓN .....	60
CONCLUSIONES.....	62
BIBLIOGRAFÍA .....	63



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Ectructura 3D del xilitol	11
Figura 1.2 Demanda de azúcar, Jarabe de Maíz de Alta Fructosa (JMAF) y edulcorantes no calóricos en México.	13
Figura 1.3 Principales usos biotecnológicos del xilitol.	15
Figura 2.1. Producción de xilitol por hidrogenación química.	19
Figura 2.2 Proceso fermentativo de producción de xilitol a partir de material lignocelulósico.	20
Figura 2.3 Reacción enzimática para la producción de xilitol.	22
Figura 2.4 Principales enzimas en la vía de los polioles.	23
Figura 2.5 Enzimas de la vía de los polioles y sus productos con D-xilosa como sustrato.	23
Figura 2.6 Estructura general de las Aldo-ceto-reductasas (AKR)	24
Figura 2.7 Enzimas inmovilizadas por medio de atrapamiento.	26
Figura 3.1 Esquema de la estrategia experimental a seguir durante este proyecto.	31
Figura 3.2 Esquema de obtención de los extractos enzimáticos de cristalino de conejo y cerdo.	33
Figura 3.3 Curva de calibración para la determinación de cantidad de proteína.	34
Figura 3.4 Decremento de la absorbencia a 340 nm de la mezcla de reacción, que nos indica consumo de NADPH.	35
Figura 3.5 Gráfico representativo de la cinética enzimática descrita por Michaelis y Menten.	41
Figura 3.6 Gráfico representativo obtenido con la regresión de Lineweaver-Burk.	42
Figura 3.7 Esquema para la determinación de xilitol producido por el complejo enzimático inmovilizado.	43
Figura 4.1 Estabilidad de la enzima AKR extraída de cristalino de conejo en el tiempo	48



Figura 4.2 Esquema del motor químico de regeneración de NADPH formado por las enzimas Aldosa reductasa y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.	50
Figura 4.3 Gráficos obtenidos en la medición de actividad enzimática de G6FDH en el extracto enriquecido de cristalino de conejo.	51
Figura 4.4 Esquema de la estrategia para producir xilitol con extracto enzimático obtenido de cristalino de conejo.	55
Figura 4.5 Gráfico de Michaelis y Menten y B) Regresión de Lineweaver-Burk, donde se muestra la cinética de la enzima AKR sin y con interacción con G6FDH.	58



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Propiedades fisicoquímicas del xilitol.	11
Tabla 1.2 Resumen de los valores de importación de xilitol en México en los últimos años en dólares y pesos mexicanos.	13
Tabla 2.1. Microorganismos que se usan para la producción fermentativa de xilitol.	20
Tabla 2.2 Ventajas y desventajas de los métodos de producción de xilitol.	22
Tabla 2.3. Afinidad de la enzima Aldosa reductasa de cristalino de bovino a diferentes sustratos.	25
Tabla 2.4 Ventajas y desventajas de la inmovilización de enzimas.	26
Tabla 2.5 Propiedades soporte 1	27
Tabla 2.7 Propiedades soporte 2	28
Tabla 3.1 Cantidad y rendimiento de proteína obtenidos con distintas saturaciones de sulfato de amonio.	32
Tabla 3.2 Composición de las mezclas de reacción utilizadas para la medición de la actividad enzimática.	34
Tabla 3.3 Composición de las mezclas de reacción utilizadas para la medición de la actividad enzimática de SDH.	37
Tabla 3.4 Composición de las mezclas de reacción utilizadas para la medición de la actividad enzimática de G6FDH.	38
Tabla 3.5 Efecto de la diálisis en la actividad enzimática.	38
Tabla 3.6 <i>Efecto de iones cloruro y sulfato en la actividad de AR y ARL-1.</i>	39
Tabla 3.7 Composición de las mezclas de reacción para la medición de la actividad enzimática de AKR1B1 en interacción con G6FDH.	42
Tabla 3.8 Composición de las mezclas de reacción con las enzimas inmovilizadas.	44
Tabla 4.1 Comparación de identidad proteica de las enzimas AKR de los cristalinos de conejo, cerdo y bovino.	45



Tabla 4.2 Enriquecimiento proteico de la enzima Aldosa Reductasa de cristalinos de conejo y cerdo.	46
Tabla 4.3 Inhibición de las enzimas de la vía de los polioles.	49
Tabla 4.5 Estrategia para la producción de xilitol con bufer de citratos y TRIS.	52
Tabla 4.6 Activación de la enzima AKR1B1.	53
Tabla 4.7 Datos de velocidad obtenidos para la enzima AKR1B1 con xilosa como sustrato.	56
Tabla 4.8 Datos de velocidad obtenidos para la enzima AKR1B1 con xilosa como sustrato en interacción con G6FDH.	56
Tabla 4.9 Inmovilización del complejo enzimático en gel preparado por medio de reticulación con dextrano y epiclorhidrina.	60



## NOMENCLATURA

AR y AKR – Aldosa reductasa

SDH – Sorbitol deshidrogenasa

G6FDH – Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

XR – Xilosa reductasa

G6F – Glucosa-6-fosfato

U – Unidad enzimática

$\Delta \left( \frac{Abs}{min} \right)$  – Velocidad inicial de trabajo de la enzima

Vf – Volumen final de la mezcla de reacción (3 ml)

Vi – Volumen de extracto enzimático (60  $\mu$ l)

$\epsilon$  – coeficiente de extinción molar de NADPH (6.22  $mmol^{-1}cm^{-1}$ )

b – Espesor de la celda de medición (1 cm)

AE – Actividad específica

S – Sustrato

E – Enzima

P – Producto

ES – Complejo enzima-sustrato

$V_{m\acute{a}x}$  – Velocidad máxima de reacción

$K_m$  – Constante de Michaelis-Menten

[S] – Concentración de sustrato

$V_0$  – Velocidad inicial de reacción

EC – Extracto enzimático crudo

EE – Extracto enzimático enriquecido



# Evaluación de la actividad enzimática en sistemas inmovilizados de la aldosa reductasa.

Presenta: Tania Méndez Pérez

Dirigida por: Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga

Co-asesorada por: Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco

Lugar de desarrollo: Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química

## RESUMEN

El xilitol es un polialcohol de cinco carbonos derivado de la D-xilosa con propiedades como edulcorante no calórico y no cariogénico, que además previene la osteoporosis, arritmias cardíacas e infecciones respiratorias. Gracias a estas características, hay gran demanda de este producto en las industrias alimentaria y farmacéutica; lo que ha incrementado el interés en su producción, tanto en aumentarla como en reducir los altos costos corrientes, ya que actualmente la producción a gran escala se realiza por hidrogenación catalítica de la xilosa a presiones y temperaturas altas. En este proyecto se propone la producción mediante reacciones enzimáticas, que requieren menor severidad de proceso, presión ambiente y temperatura moderada. Para ello se inmovilizó a la enzima aldosa reductasa AKR1B1 (extraída de cristalino de conejo), en partículas de dextrano modificadas.

Una desventaja del proceso es que el extracto enzimático obtenido de cristalinos de conejo, enriquecido por medio de precipitación salina, además de contener a la enzima Aldosa reductasa también contiene Sorbitol deshidrogenasa (SDH) la cual participa en la vía de los polioles y oxida las moléculas de xilitol a moléculas de xilulosa. En consecuencia se estableció la estrategia de inhibir a la enzima SDH y así evitar la pérdida de xilitol, al mismo tiempo que se activa a la Aldosa reductasa. Esta estrategia consistió de adicionar la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en el sistema reacción-regeneración  $\text{NADP}^- + \text{H}^+$ ; y simultáneamente se evita adicionar continuamente uno de los reactivos más costosos.

**Palabras clave: xilitol, Aldosa reductasa, producción enzimática, inmovilización Oxido reductasa**



# Evaluation of enzymatic activity in systems of immobilized aldose-reductase.

By: Tania Méndez Pérez

Supervisor: Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga

Co-Advisor: Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco

Location: Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química

## ABSTRACT

Xylitol is a five-carbon polyalcohol derived from D-xylose with properties as non-caloric and non-cariogenic sweetener, additionally it prevents osteoporosis, cardiac arrhythmia and infections of the respiratory tract. Therefore, there has been an increased interest in its production, which has been insufficient due to the great costs it implies because of high pressures and temperatures required for big scale production by catalytic hydrogenation of xylose. In this project production of xylitol by enzymatic reactions, which require room pressure and moderate temperature is proposed. To this end, Aldose reductase enzyme AKR1B1 (extracted from rabbit lenses), was immobilized within modified dextran particles and polyacrylamide particles.

A handicap of this process is that the enzymatic extract from rabbit lenses, enriched by saline precipitation, additionally to the enzyme Aldose reductase, contains Sorbitol dehydrogenase (SDH), which is part of the polyol pathway and oxidizes xylitol molecules to xylulose ones. Consequently inhibiting the enzyme Sorbitol dehydrogenase was established as strategy to avoid loss of xylitol and at the same time activating the enzyme Aldose reductase. This strategy consisted of introduction of the enzyme Glucose-6-phosphate dehydrogenase, for the reaction-regeneration system  $\text{NADP}^+ + \text{H}^+$ ; meanwhile continuous addition of one of the most expensive reactants is avoided.



## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El xilitol es el producto de interés en este trabajo; se pretende establecer un método enzimático para su producción, el cual exhibirá ventajas sobre los métodos existentes de producción, entre ellas mejores rendimientos. Para esto, primeramente se verá la importancia comercial que tiene el xilitol y demás edulcorantes no calóricos, que debido a sus características endulzantes y los beneficios que aportan a la salud se colocan por encima de la sacarosa. Después, un resumen de los métodos actuales de producción de xilitol se presenta, con enfoque en el método enzimático, para el cual se estudia a las enzimas óxido reductasas, específicamente la familia de las aldosas reductasas (AR ó AKR). Posteriormente, la inmovilización enzimática se revisa ya que es la estrategia propuesta en este trabajo para mejorar la estabilidad de la enzima AR, entre otros beneficios que los soportes pueden aportarle a la enzima. Para completar esta investigación se analizan metodologías establecidas anteriormente, con las que se llega a una estrategia completa para la producción de xilitol con el extracto enzimático obtenido del cristalino de conejo. En los resultados se incluye la inhibición de la enzima SDH, la activación de AR y el uso de G6FDH como sistema reacción-regeneración de NADPH + H<sup>+</sup>; y los parámetros bioquímicos de la AR, la inmovilización del complejo enzimático y la cantidad de xilitol producido.

### 1.1 GENERALIDADES

#### 1.1.1 XILITOL

El xilitol (Figura 1.1) es un alcohol de cinco carbonos, miembro de la familia de los polioles, derivado de la D-xilosa, es anticariogénico, no metabolizable por las bacterias y tiene propiedades beneficiosas para la salud, tanto bucal como sistémica (Panesso, *et al.*, 2012). El xilitol se encuentra de manera natural en las frutas como ciruelas amarillas, fresas, frambuesa y banano y en algunas legumbres como coliflor, lechuga, espinaca, zanahoria y cebolla, aunque en muy bajas concentraciones (menos de 9 mg/g), lo que hace que su extracción de dichas fuentes no sea práctica ni económica (Ooi *et al.*, 2002).





Figura 1.1 Estructura 3D del xilitol.

El xilitol se considera un endulzante libre de azúcar, su estructura dificulta su descomposición por microorganismos para extraer energía, debido a que posee un número impar de carbonos. Su poder endulzante es similar al de la sacarosa, pero solamente tiene 2/3 del valor calórico de ésta (Mussatto, 2012). Sus propiedades fisicoquímicas se conocen bien, siendo la mayoría compatibles con usos alimentarios y farmacéuticos (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Propiedades fisicoquímicas del xilitol. (Ur-Rehman *et al.*, 2015).

<i>Propiedad</i>	<i>Características</i>
Fórmula molecular	$C_5H_{12}O_5$
Peso molecular	152.15 g/mol
Apariencia	Polvo blanco, cristalino
Olor	Sin olor
Solubilidad a 20 °C	169 g / 100 g H <sub>2</sub> O
pH (en solución acuosa 10%)	5-7
Punto de ebullición (a 760 mmHg)	216 °C
Punto de fusión	93-94.5 °C
Densidad (a 15 °C)	1.50 g/L
Valor calórico 4.06 cal/g	16.88 J/g
Absorción de humedad (% en 4 días a 20-22 °C)	
A 60 % de humedad relativa	0.05
A 92 % de humedad relativa	90
Densidad (gravedad específica) en solución acuosa (20 °C)	
10 %	1.03
60 %	1.23



Calor de solución	Endotérmico, 36.61 cal/g
Viscosidad (cP a 20 °C)	
10 %	1.23
40 %	4.18
50 %	8.04
60 %	20.63
Dulzor relativo	Igual a la sacarosa, mayor que sorbitol y manitol
Rotación específica	Ópticamente inactivo

### 1.1.2 DEMANDA Y CONSUMO NACIONAL E INTERNACIONAL DE XILITOL

En la actualidad, la demanda de endulzantes a nivel mundial ha aumentado, de acuerdo a la Organización Internacional de Azúcar (OIA) en su manual sobre edulcorantes alternativos (MECAS, 2012) es el azúcar convencional el que domina el mercado, seguido de los edulcorantes de alta intensidad (EAI) y posteriormente el jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF). En la Figura 1.2 se muestra la demanda de azúcar, jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF) y edulcorantes no calóricos en nuestro país en el periodo de octubre de 2011 a octubre de 2017, según el Balance Nacional de Edulcorantes, y se observa que el interés por el grupo de edulcorantes no calóricos es superior al azúcar y al JMAF. Entre los endulzantes no calóricos destacan los polioles, grupo al que pertenece el xilitol, que adquieren relevancia en el mercado nacional de edulcorantes ya que los patrones de consumo se acentúan hacia productos alimenticios con bajos niveles de calóricos. El consumo de productos no calóricos en México crece a una tasa anual de 10.7 %, y en promedio ocupan el 5.5 %, y su nivel de consumo es de 2 898 miles de toneladas (Balance Nacional de Edulcorantes, 2017).



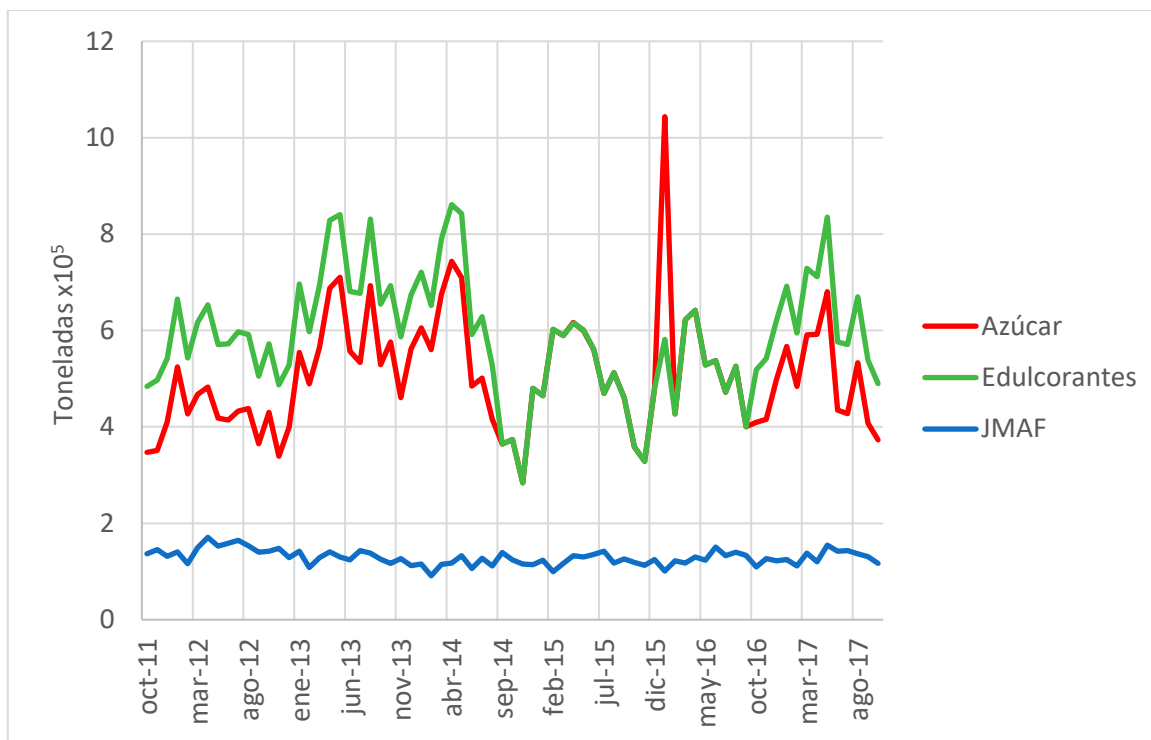


Figura 1.2 Demanda de azúcar, Jarabe de Maíz de Alta Fructosa (JMAF) y edulcorantes no calóricos en México (Balance Nacional de Edulcorantes, 2017).

En años recientes en México la importación de xilitol se incrementó (Tabla 1.2) y puede inferirse que la demanda también ha aumentado; caso contrario a las exportaciones ya que para el año de 2011 se reportan exportaciones de 4 005 Kg (con valor de USD 11 815), mientras que para los años subsecuentes no se reportan datos.

Tabla 1.2 Resumen de los valores de importación de xilitol en México en los últimos años en dólares y pesos mexicanos (valores tomados de la Balanza Comercial para Importaciones de Mercancías en México, INEGI).

Año	Importación		
	Kg	USD	Pesos
2013	801 816	2 731 554	34 705 464
2012	786 896	2 632 253	34 612 573
2011	783 960	2 328 260	28 976 825

En la tabla anterior podemos observar que la demanda de xilitol en nuestro país va en aumento año con año, por lo que podemos inferir que este aumento continuará y por lo tanto la producción de éste es una oportunidad que podemos aprovechar.



### 1.1.3 APLICACIONES DEL XILITOL

- Gomas de mascar: Es ampliamente usado como sustituto de azúcar en gomas de mascar, para prevenir el deterioro de los dientes y la boca seca (xerostomía).
- Confitería: Se usa como endulzante bajo en calorías para gomitas, mentas y dulces.
- Otros alimentos: El xilitol es usado como sustituto de azúcar en alimentos para personas con diabetes, o en productos de panadería.
- Productos de cuidado personal: Las aplicaciones del xilitol incluyen los productos de cuidado o higiene personal como pasta de dientes, tabletas de flúor o enjuagues bucales. Estas aplicaciones ayudan a prevenir el deterioro de los dientes.
- Otras aplicaciones: También hay aplicaciones farmacéuticas y nutraceuticas. Como medicamento el xilitol es usado para prevenir infecciones del oído medio (otitis media) en niños pequeños. La industria farmacéutica usa el xilitol como endulzante en sus productos. A veces es incluido en suplementos alimenticios como fuente de energía, y en una gran variedad de productos nutraceuticos como gomitas de vitaminas para niños y tabletas de vitaminas.



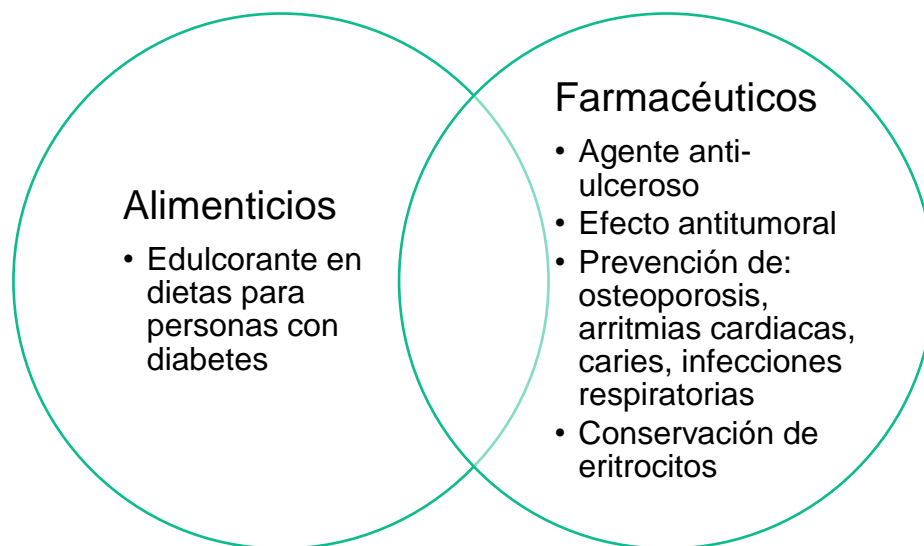


Figura 1.3 Principales usos biotecnológicos del xilitol (Modificado de Mussatto, 2012).

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

Debido a que el xilitol es un edulcorante que ha adquirido importancia en los sectores alimenticio y de la salud su demanda se incrementa y se satisface mediante importación, lo que ofrece una oportunidad de mercado. Se mencionó que su producción mediante el proceso químico tradicional es cara, debido a que se requieren condiciones de alta severidad como presiones y temperaturas elevadas. Así, es de interés proponer un proceso biotecnológico para la producción de xilitol. Una alternativa es usar a la enzima Aldosa reductasa inmovilizada para transformar la xilosa en xilitol por reacciones enzimáticas; sin embargo se tiene la desventaja de que hay presencia de Sorbitol deshidrogenasa, que transforma al xilitol en xilulosa. Por ello se requiere diseñar un proceso enzimático que elimine los obstáculos para la producción de xilitol.

## 1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción de xilitol por medio de enzimas óxido-reductasas se estudia como una alternativa potencialmente menos costosa y con mejores rendimientos comparada con la producción por medio de hidrogenación catalítica, método que se usa actualmente en la industria. Anteriormente en nuestro grupo de trabajo se utilizaron enzimas Aldosas



reductasas extraídas de cristalino de bovino, con las cuales se obtuvo una cantidad de xilitol que no se pudo cuantificar por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Además de que la enzima tuvo poca estabilidad en el tiempo y se dificultó la obtención de la fuente enzimática. En este trabajo se planteó la inmovilización de enzimas para mejorar la producción del xilitol en comparación con enzimas no inmovilizadas, ya que esta es una alternativa que nos ayuda a mantener la estabilidad de la enzima, nos da la oportunidad de reutilizarla entre otras características deseables para llegar a utilizar a las enzimas en un nivel industrial.

## 1.4 HIPÓTESIS

El complejo enzimático, que incluye a la Aldosa reductasa y Sorbitol deshidrogenasa de cristalino de conejo con adición de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, inmovilizado en soportes de dextrano modificado estabilizará las enzimas, se eliminará la escasez de cofactor, además de que se inhibirá a Sorbitol deshidrogenasa, así se obtendrán mejores rendimientos de xilitol que con métodos químicos o con enzimas libres.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer un método eficiente de producción de xilitol con enzima Aldosa reductasa extraída de cristalino de conejo, inmovilizada junto con un complejo enzimático que ayude a la estabilización y proporcione el cofactor que se requiere para llevar a cabo las reacciones enzimáticas.



### 1.5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer un proceso para la obtención de extracto enriquecido de la Aldosa reductasa por medio de precipitación salina.
2. Eliminar las interferencias para la producción de xilitol presentes en la mezcla de reacción enzimática, como la adición de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa e inhibición de Sorbitol deshidrogenasa.
3. Inmovilizar el complejo enzimático en los diferentes soportes y llevar a cabo reacciones por lotes con las mezclas de reacción establecidas.
4. Cuantificar la cantidad de xilitol obtenida y compararla con la obtenida por otros métodos reportados en literatura.



## CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE XILITOL

En la actualidad, la producción de xilitol a gran escala se realiza por hidrogenación catalítica de la xilosa a altas presiones y temperaturas. Además, de la costosa producción, se generan impurezas que dificultan la purificación y cristalización del producto final. Otra forma de obtención es a través de procesos biotecnológicos, los cuales son una alternativa de producción limpia, porque no generan subproductos tóxicos debido a su naturaleza específica (Vanegas *et al.*, 2004). Los métodos de producción de xilitol se pueden clasificar principalmente en tres, los cuales son: método químico (por medio de hidrogenación química), método fermentativo (por medio de microorganismos) y método biotecnológico (por medio de enzimas).

#### 2.1.1 MÉTODO QUÍMICO

La hidrogenación química es uno de los principales métodos industriales para la obtención del xilitol. Este método es empleado en Finlandia desde hace varias décadas donde la D-xilosa se reduce a xilitol con el uso de metales como catalizadores. El proceso se realiza a altas presiones y altas temperaturas, esto implica el uso de equipos sofisticados y costosos para su elaboración, además de los procesos de purificación necesarios, que hacen costosa su producción (Lima de Albuquerque, 2014).

El proceso por medio de la vía química se resume en los siguientes pasos:

- 1) Hidrólisis ácida del material rico en xilano.
- 2) Purificación del hidrolizado hasta obtener una solución de xilosa pura.
- 3) Hidrogenación catalítica de la xilosa pura a xilitol (en este punto se emplean diversos catalizadores, en la Figura 2.1 se emplea la aleación de Ni-Al<sub>2</sub>).
- 4) Purificación de la solución de xilitol obtenida.
- 5) Cristalización del xilitol.



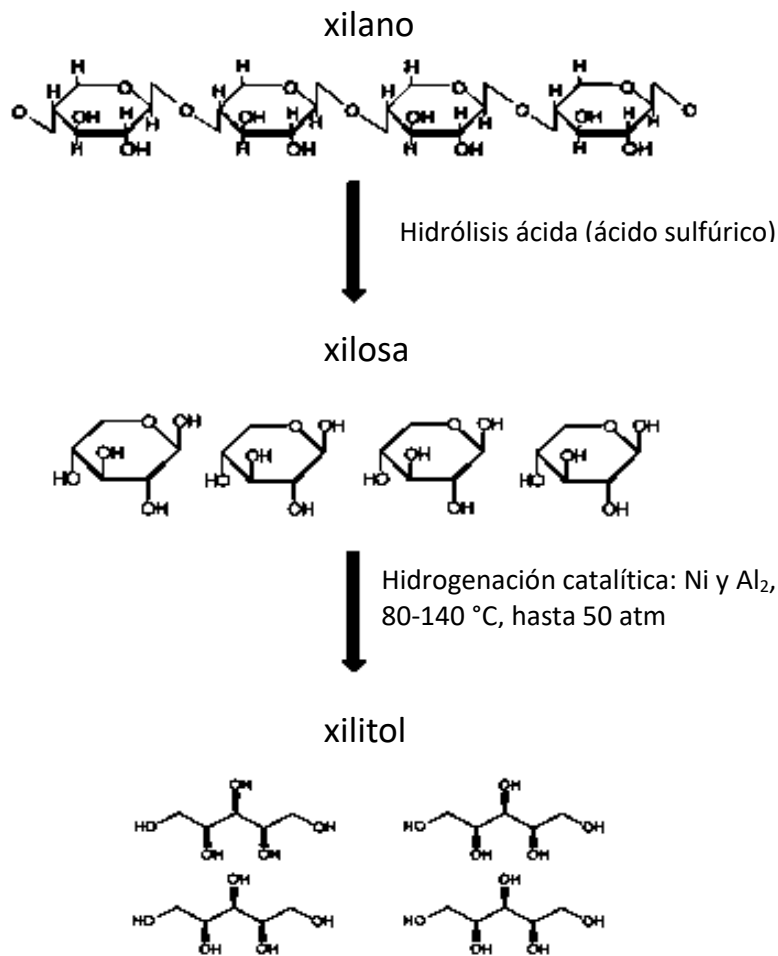


Figura 2.1. Producción de xilitol por hidrogenación química (modificado de Lima de Albuquerque, 2014).

### 2.1.2 MÉTODO FERMENTATIVO

Actualmente los estudios para encontrar nuevas alternativas se enfocan a la producción de xilitol mediante fermentación microbiana de xilosa; principalmente levaduras, de entre las cuales las que destacan son del género *Candida*, pues son las que dan mayores rendimientos. Sin embargo, en la actualidad aún se realizan diversos estudios dedicados exclusivamente a aislar cepas productoras de xilitol (Vanegas *et al.*, 2004).

El proceso fermentativo con microorganismos (Figura 2.2) parte de residuos hemicelulósicos, similar al proceso de hidrogenación química. Las hemicelulosas se



hidrolizan para convertirse en azúcares fermentables; pero simultáneamente liberan otros compuestos que en ocasiones resultan tóxicos para los microorganismos que se emplean para la fermentación, inhiben su crecimiento y por lo tanto la producción de xilitol. Algunos de estos compuestos tóxicos son ácidos alifáticos, furfural, hidroximetilfurfural, compuestos fenólicos y vainillina. Los inhibidores presentes o formados por los hidrolizados pueden limitar el consumo de la fuente de carbono y detener el proceso de fermentación, es por esto que se le da un tratamiento al hidrolizado. Los principales microorganismos usados para la producción de xilitol son los hongos, según se destaca en la Tabla 2.1.

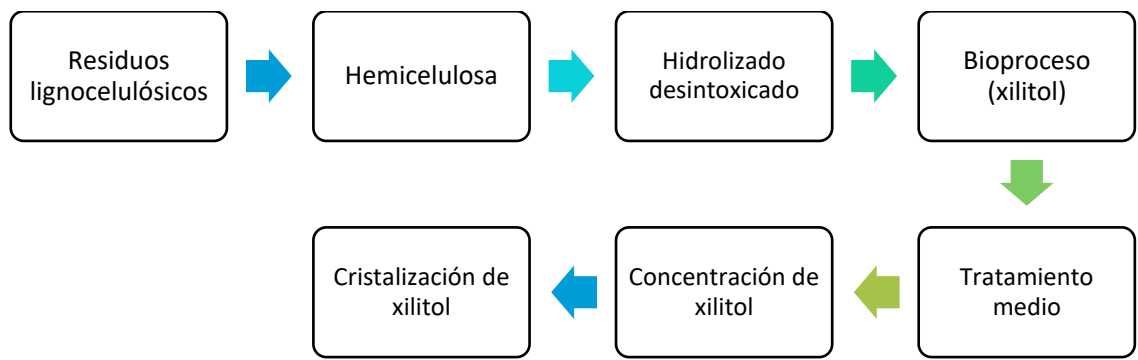


Figura 2.2 Proceso fermentativo de producción de xilitol a partir de material lignocelulósico (Modificado de Lima de Albuquerque, 2014).

Tabla 2.1. Microorganismos que se usan para la producción fermentativa de xilitol (Chen *et al.*, 2010; Sampaio *et al.*, 2003; Ghindea *et al.*, 2010; Sasaki, *et al.*, 2012).

Hongos		Bacterias
Levaduras	Filamentosos	
<i>Petromyces albertensis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>
<i>Candida boidinii</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	<i>Enterobacter liquifaciens</i>
<i>C. maltosa</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>C. moggi</i>	<i>P. expansum</i>	
<i>C. tropicalis HXP2</i>	<i>P. griseoroseum</i>	
<i>Debaromyces hansenii UFV-170</i>	<i>P. roqueforti</i>	
<i>Hansenula polymorpha</i>	<i>P. purpurogenum</i>	



<i>Pachysolen tannophilus</i>	<i>P. janthinellum</i>	
<i>Pichia caribica</i>	<i>P. chrysogenum</i>	
<i>C. guilliermondii FTI-20037118</i>	<i>P. italicum</i>	
<i>C. intermedia</i>	<i>P. crustosum</i>	

### 2.1.3 MÉTODO ENZIMÁTICO

El proceso enzimático es una alternativa biotecnológica reciente, cuya característica principal es que alcanza 100% de conversión de los azúcares a xilitol. Esto es de suma importancia ya que durante el proceso fermentativo no se aprovecha todo el azúcar pues parte de la xilosa se emplea para el crecimiento celular de los microorganismos.

Este proceso consiste básicamente en la reducción de la xilosa a xilitol por medio de una enzima óxido-reductora asistida por la coenzima NADPH + H<sup>+</sup> en su forma reducida (De Freitas Branco *et al.*, 2012). En este proceso las enzimas son el catalizador que mejora la producción, se obtienen mejores rendimientos, pero se requiere de un control más preciso para evitar reacciones posteriores indeseadas.

Las enzimas son obtenidas generalmente de microorganismos, y la enzima Xilosa reductasa (XR) es considerada clave en la producción de xilitol. En décadas recientes se han explorado estrategias de ingeniería metabólica para modificar a ésta enzima en los microorganismos y obtener una mayor producción de xilitol (Venkateswar *et al.*, 2016). Otra enzima óxido reductora capaz de producir xilitol a partir de D-xilosa es la Aldosa reductasa (AR), cuya reacción se esquematiza en la Figura 2.3.



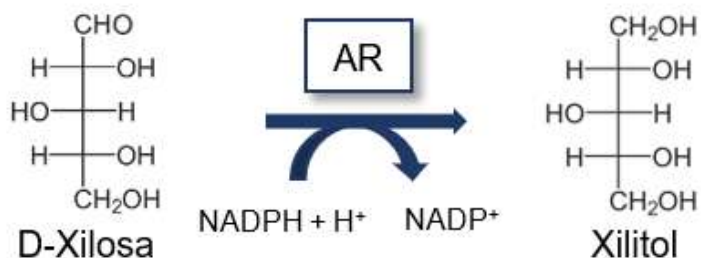


Figura 2.3 Reacción enzimática para la producción de xilitol.

Realizando la comparación de las ventajas y las desventajas de cada uno de los principales métodos existentes para la producción de xilitol (Tabla 2.2), se puede notar que por el método químico se reportan rendimientos del 50% al 60%, por el método fermentativo con cepas silvestres microbianas se reportan rendimientos del 65% al 85%, mientras que con métodos enzimáticos se reportan rendimientos hasta del 96% (Rafiqul y Sakinah, 2013). Por las ventajas que exhibe el método enzimático, con los mejores rendimientos reportados, en este proyecto se utilizará un enzima oxido-reductasa que use como sustrato a la xilosa para la producción de xilitol.

Tabla 2.2 Ventajas y desventajas de los métodos de producción de xilitol (Modificado de De Freitas Branco *et al.*, 2012).

Tipo de proceso	Ventajas	Desventajas
<b>Químico</b>	Optimizado	Instalación costosa
	Proceso más aplicado	
<b>Fermentativo</b>	Costo reducido	Productividad reducida
	Sustentable	
<b>Enzimático</b>	Sustentable	Carencia de infraestructura
	Máxima eficiencia	
	Especificidad	
	Generación de subproductos reducida	



## 2.2 VÍA DE LOS POLIOLES Y ENZIMA ALDOSA REDUCTASA

La vía de los polioles es una cadena de reacciones conformada por 2 enzimas, Aldosa reductasa (AR) y Sorbitol deshidrogenasa (SDH). La AR cataliza la reducción del exceso de aldehídos como glucosa con NADPH como cofactor y la SDH oxida al intermediario, con NAD<sup>+</sup> como cofactor. Esta vía sirve para detoxificar a los organismos de aldehídos. En las Figuras a continuación se observan las representaciones de las enzimas de la vía de los polioles, y las moléculas que forman al usar D-glucosa (Figura 2.4) y D-xilosa (Figura 2.5) como sustrato.

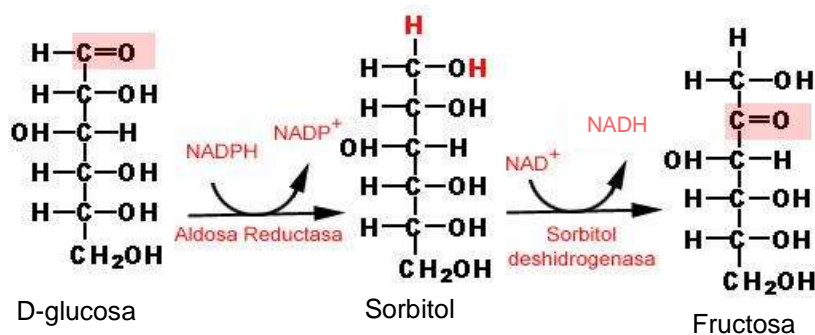


Figura 2.4 Enzimas en la vía de los polioles y sus productos con D-glucosa como sustrato.

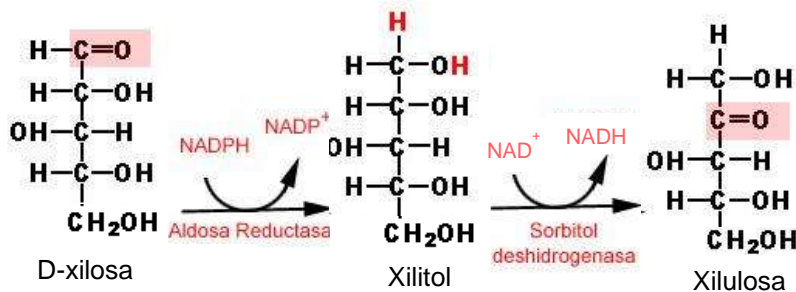


Figura 2.5 Enzimas de la vía de los polioles y sus productos con D-xilosa como sustrato.

La enzima Aldosa reductasa (EC 1.1.1.21) pertenece a la superfamilia de las aldose reductasas (AKR), es NADPH + H<sup>+</sup> dependiente para catalizar reducción de azúcares. Al contar con más de 150 enzimas, ésta superfamilia está identificada en una amplia variedad de organismos incluyendo eucariotes y procariotes. Basados en la



identidad de las secuencias de las proteínas éstas se clasifican en 15 familias, y algunas familias contienen múltiples subfamilias. Su característica principal es que contienen 320 residuos de aminoácidos que forman una estructura de 8 láminas alfa unidas a 8 hélices beta (Figura 2.6) (Mindnich y Penning, 2009).

La enzima Aldosa reductasa (EC 1.1.1.21) enzima se encuentra en algunos microorganismos y es importante en el metabolismo microbiano que cataliza a la xilosa (aldosa) y la transforma en xilitol (polialcohol) con ayuda de la coenzima NADPH como donante de electrones. Su peso molecular varía de 30-70 kDa dependiendo del microorganismo que lo produce (De Freitas *et al.*, 2011).

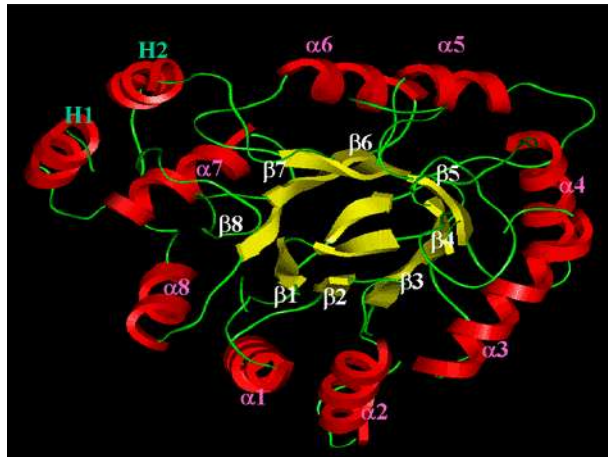


Figura 2.6 Estructura general de las Aldo-ceto-reductasas (AKR)

Esta enzima (EC 1.1.1.21) se puede encontrar en distintos órganos animales como son hígado, intestinos, riñones, músculo, cristalino, entre otros. Es de especial interés la enzima existente en los cristalinos ya que es abundante en esta estructura y la obtención de un extracto enzimático de éste es sencillo debido a que la estructura del cristalino está formada por células alargadas llamadas cristalinas que carecen de orgánulos y son transparentes. Otra de las ventajas de la enzima AR es que tiene afinidad por distintos sustratos, entre estos la xilosa. En la Tabla 2.3 podemos ver algunos de los sustratos de la enzima AR con sus respectivas constantes de Michaelis-Menten, las cuales nos indican la afinidad de la enzima por el sustrato (mientras más pequeña es esta constante hay mayor afinidad). Los valores de  $K_m$  de los aldehídos tienden a incrementar con el tamaño de la cadena de éstos (Hayman y Kinoshita, 1965).



Tabla 2.3. Afinidad de la enzima Aldosa reductasa de cristalino de bovino a diferentes sustratos (Hayman y Kinoshita, 1965).

Sustrato	Km ( $\times 10^{-2}$ M)
DL-Gliceraldehído	0.003
D-Eritrosa	0.04
D-Xilosa	0.5
D-Ribosa	0.7
D-Glucosa	7

Las enzimas con las que se trabajará son la AKR1B1 y AKR1B6, extraídas de cristalinos de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) y cerdo (*Sus scrofa*), respectivamente.

### 2.3 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA

En la actualidad, la industria requiere gran cantidad de enzimas con el fin de obtener productos con mejores características y menor costo. Las enzimas se pueden obtener de fuentes renovables y son completamente biodegradables, aunado a esto, pueden ser operadas a condiciones moderadas, con equipos simples y completamente controlados. Estas características reducen el impacto ambiental, el costo energético y la generación de residuos (Homaei *et al.*, 2013). Por ello, en laboratorios alrededor del mundo se busca la implementación de procedimientos que aumenten la estabilidad de las enzimas y permitan su reutilización.

La inmovilización combina la actividad elevada y específica de las biomoléculas activas, como las enzimas o anticuerpos, con la estabilidad química y mecánica del soporte. El método de inmovilización consiste en mantener la biomolécula unida o atrapada en un soporte físico, y así conservar su actividad catalítica y permitir el flujo de sustratos y productos (Fajardo-Ochoa *et al.*, 2011). En la Tabla 2.4 se resumen ventajas y desventajas a considerar de la inmovilización enzimática.



Tabla 2.4 Ventajas y desventajas de la inmovilización de enzimas (modificado de Fajardo-Ochoa *et al.* 2011).

Ventajas	Desventajas
Uso continuo	Actividad enzimática se afecta por la interacción soporte-enzima
Reutilización de las enzimas	La velocidad de reacción se afecta por la velocidad de difusión
Tenemos control de concentraciones de enzima que se usan	
Mejor estabilidad y actividad enzimática en función de pH y temperatura	

Diferentes métodos de inmovilización de enzimas existen, que de acuerdo a Sheldon y van Pelt (2013) se clasifican principalmente en tres grupos:

1. Unión a un soporte: esta unión puede ser física (como interacciones hidrofóbicas o de van der Waals), de naturaleza iónica o covalente.
2. Entrecruzamiento: con la formación de agregados o cristales de enzimas.
3. Atrapamiento: por medio de la inclusión de la enzima en una red polimérica (Figura 2.7).

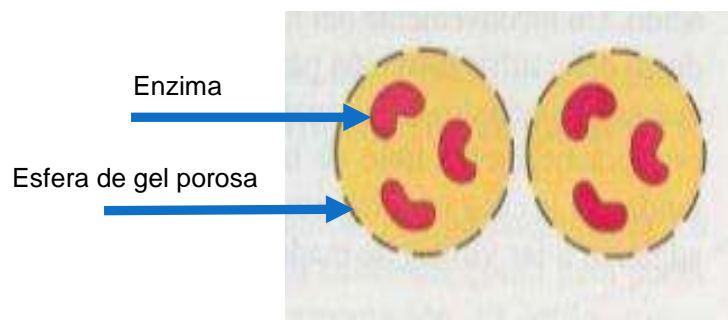


Figura 2.7 Enzimas inmovilizadas por medio de atrapamiento (Fajardo-Ochoa, *et al.* 2011).



El método de atrapamiento se usó en éste trabajo y está basado en la inclusión de las enzimas dentro de una red polimérica (soporte) que permite al sustrato y a los productos pasar a través del soporte y retener las enzimas sin estar enlazadas a la matriz o soporte (O'Driscoll, 1976). La matriz de gel puede ser de origen natural o inorgánico (Sheldon y van Pelt, 2013):

- Naturales: Estos principalmente son insolubles en agua, como la celulosa, el almidón, la agarosa y la quitosana, además también pueden ser usadas proteínas como colágeno y albúmina.
- Inorgánicos: Alúmina, sílica, zeolitas, y sílicas mesoporosas como MCM-41 y SBA-15.

## 2.4 SOPORTES PARA LA INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA

Para inmovilizar nuestra enzima utilizaremos tres soportes conocidos y comerciales, hechos de distintos materiales, escogidos de acuerdo al tamaño de moléculas que pueden excluir, y se compararon sus desempeños. A continuación, se presentan algunas Tablas donde se indican las propiedades de cada uno de estos soportes.

1. Gel preparado por medio de reticulación con dextrano y epíclorhidrina (Tabla 2.5). Los dextranos son carbohidratos poliméricos naturales hidrofílicos, sin carga, solubles en agua, forman hidrogeles altamente hidratados y muestran poca interacción no específica con proteínas (Piehler *et al.*, 1999).

Tabla 2.5 Propiedades soporte 1

Propiedad	Datos
Tamaño de partícula seca	40-120 $\mu\text{m}$
Tamaño de partícula hidratada	90-280 $\mu\text{m}$
Estabilidad pH	2-10
Rango de separación	3-80 kDa



Estabilidad a temperatura	120 °C en autoclave
---------------------------	---------------------

2. Gel preparado por medio de reticulación de alil dextrano y N-N' metilenbisacrilamida (Tabla 2.7).

Es un gel rígido y químicamente estable, cuya naturaleza hidrofílica minimiza las interacciones no específicas con las proteínas.

Tabla 2.7 Propiedades soporte 2

Propiedad	Datos
Tamaño de partícula (media)	50 $\mu\text{m}$
Estabilidad pH	3-11
Rango de separación	1-100 kDa
Estabilidad Temperatura	121 °C en autoclave

## 2.5 ANTECEDENTES DIRECTOS

Dentro de nuestro grupo de trabajo ya se ha estudiado la enzima aldosa reductasa AKR1B5, obtenida de cristalinos de bovino (*Bos taurus*) y se encontró que las variables con mayor influencia sobre la actividad enzimática del extracto obtenido de cristalinos de bovino fueron la temperatura, el pH y en menor medida la concentración inicial de sustrato.

La temperatura óptima para un mayor consumo de xilosa es la región cercana a 50 °C con un pH de 6.5. Mientras que para la actividad enzimática específica la zona se encuentra en la temperatura de 55 °C y un pH entre 7 - 7.5 (Morales-Cabral, 2016).

La cantidad de xilitol que se produjo en los diferentes ensayos enzimáticos no se cuantificó porque la concentración inicial de xilosa fue pequeña y la sensibilidad del instrumento de medición (HPLC) no la alcanzó a cuantificar. Creemos que se obtuvo una cantidad de xilitol menor a la esperada debido a que el extracto enzimático contiene a la



enzima Sorbitol deshidrogenasa, capaz de reducir el xilitol a xilulosa, cuya actividad no se inhibió.

Por otro lado, debido a la dificultad que se tuvo para obtener los cristalinicos de bovino se sugirió la búsqueda de una fuente enzimática diferente.



## CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

### 3.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para la realización de este proyecto se siguió la estrategia experimental presentada a continuación:

1. Realización de un análisis comparativo de las identidades proteicas de la enzima AR de las diferentes fuentes enzimáticas disponibles.
2. Establecimiento de la metodología para la obtención de un extracto enzimático enriquecido de la enzima AR.
3. Medición de la actividad enzimática de los extractos de las diferentes fuentes de SDH.
4. Activación de la enzima AR con sulfato de amonio.
5. Inhibición de la enzima SDH con ácido salicílico.
6. Implementación del motor químico de regeneración de NADPH con el uso de la enzima G6FDH.
7. Determinación de los parámetros bioquímicos ( $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$ ) de la enzima AR con y sin interacción con la enzima G6FDH.
8. Inmovilización del complejo enzimático en los soportes de dextrano modificados.
9. Cuantificación y comparación de xilitol producido con el complejo enzimático inmovilizado.

En la figura 3.1 se muestra un diagrama donde se resume la metodología seguida para la producción de xilitol con el complejo enzimático por medio de inmovilización.



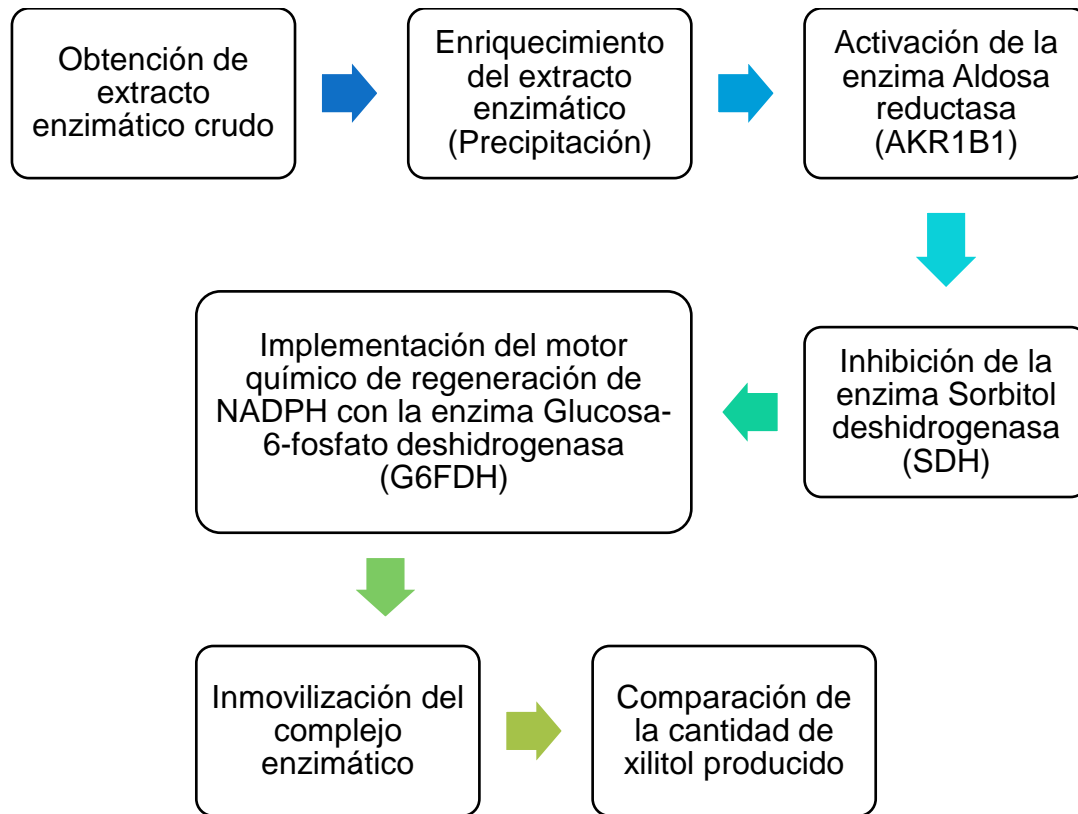


Figura 3.1 Esquema de la estrategia experimental a seguir durante este proyecto.

### 3.1.1 OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO ENRIQUECIDO DE LA ENZIMA ALDOSA REDUCTASA

Para la obtención de un extracto enzimático enriquecido de enzima se siguió la técnica desarrollada por Hayman y Kinoshita en 1965. Primero, el cristalino se extrae del ojo enucleado con ayuda de un bisturí y se almacena en una disolución de búfer de fosfatos 0.1 M y 2-mercaptoetanol 1 mM en proporción 1:1 v/v y se mantiene en congelación hasta el momento de su uso. Después, los cristalinos se descongelan y se homogeneizan con un homogeneizador Potter-Elvehjem en presencia de 1 ml de búfer de fosfatos y 10 µl de coctel inhibidor de proteasas. El extracto obtenido se centrifuga a 4 500 rpm por 45 min y se desecha el material insoluble, aquí obtenemos un extracto crudo de la enzima Aldosa reductasa. Posteriormente para obtener un extracto enzimático enriquecido se le adiciona sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para precipitar a las enzimas que nos interesan y eliminar



otras enzimas y proteínas que se encuentren en el extracto, basados en el fundamento de que a concentraciones altas de sales las enzimas se agregan debido a la neutralización de las cargas en la superficie de éstas. Usamos una saturación del 40 % (p/v) ya que a esta concentración obtenemos una mayor cantidad de proteína y un mayor rendimiento de extracto de acuerdo a los datos obtenidos por Morales-Cabral en 2016, mostrados en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Cantidad y rendimiento de proteína obtenidos con distintas saturaciones de sulfato de amonio (Morales-Cabral, 2016).

Saturación con Sulfato de amonio (%)	Volumen (ml)	Rendimiento (%)	Proteína (mg/ml)
0	---	100	14.97
40	12.5	32.47	17.77
50	1.5	3.89	1.85
75	3	7.79	2.98

Después de la adición del sulfato de amonio el extracto se agita por una hora, se vuelve a centrifugar a 4 500 rpm por 30 min, se desecha el sobrenadante, el precipitado se dializa en búfer de fosfatos de potasio 0.1 M a pH 6.8 durante 24 h, en las que se hacen 2 cambios de búfer. Todo el proceso anterior se lleva a cabo en presencia de hielo a 4 °C aproximadamente para evitar la degradación de la enzima.





Figura 3.2 Esquema de obtención de los extractos enzimáticos de cristalino de conejo y cerdo.

### 3.1.2 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE LOWRY

Para determinar la cantidad de proteína en una muestra se utiliza el método de cuantificación de proteínas desarrollado por Lowry en 1951. Éste es un método colorimétrico en el que a la muestra problema se le añade un reactivo que contiene iones de  $\text{Cu}^{+2}$  y en medio alcalino se unen a proteínas formando complejos con los átomos de N en los enlaces peptídicos y provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción, en la que se reduce el reactivo de Folin-Ciocalteu, también en medio básico, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, con el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que cuando se reduce por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de proteína. Las muestras se leen en espectrofotómetro a 640 nm.

La siguiente ecuación de la recta se obtuvo:  $y = 11.51x + 0.0601$  con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.9935, lo cual nos indica que el 99 % de los datos se aproximan a una línea recta. La curva se muestra en la gráfica 3.3.



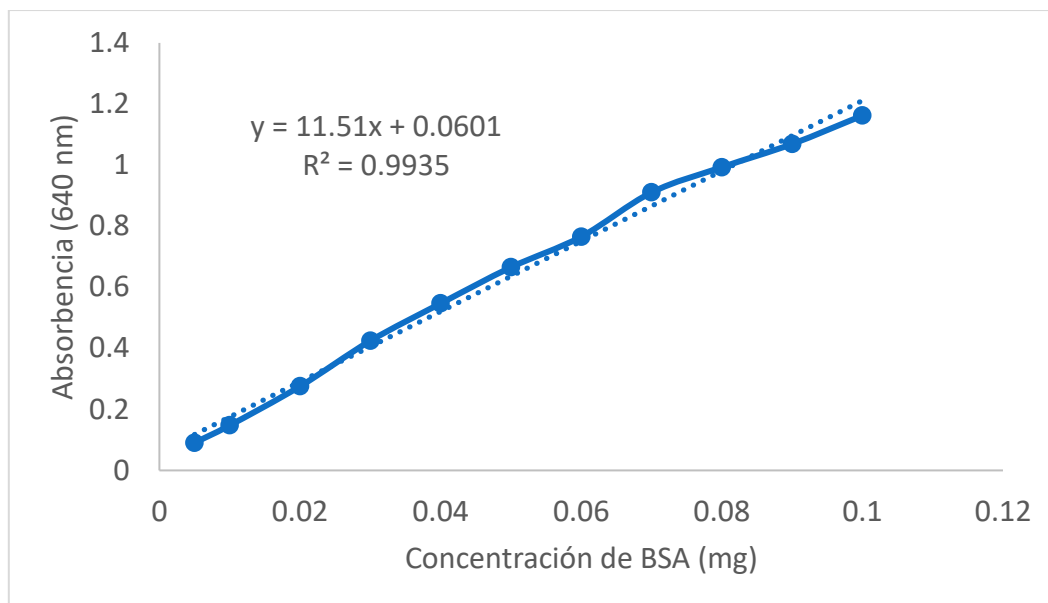


Figura 3.3 Curva de calibración para la determinación de cantidad de proteína.

### 3.1.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ALDOSA REDUCTASA (AR)

El método para la determinación de actividad de la enzima Aldosa reductasa (AR) se basa en la medición del consumo de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato NADPH, el cual es proporcional a la actividad de la enzima. La unidad internacional de actividad enzimática (U) se define como el cambio de absorbencia de 0.001 unidades por minuto, este cambio se mide con un espectrofotómetro a 340 nm, durante 2 min con la enzima y un inhibidor ya establecido de la Aldosa reductasa llamado Naringenina. La mezcla de reacción que se utiliza se presenta en la tabla 3.2. El volumen final de todas las mezclas de reacción es de 3 ml y la reacción se inicia con la adición de NADPH.

Tabla 3.2 Composición de las mezclas de reacción utilizadas para la medición de la actividad enzimática de AR (Morales-Cabral, 2016).

Reactivos	Concentración (mM)	Control*	Blanco 1*	Muestra*	Blanco 2*
Búfer de fosfatos de potasio	100	2535	2835	2535	2835



2-mercaptoetanol	1	15	15	15	15
DMSO		30	30	----	----
Naringenina (inhibidor)	1	----	----	30	30
Extracto de enzima		60	60	60	60
Xilosa (sustrato)	1	300	----	300	----
NADPH	0.2	60	60	60	60

\*Cantidades en microlitros (μl).

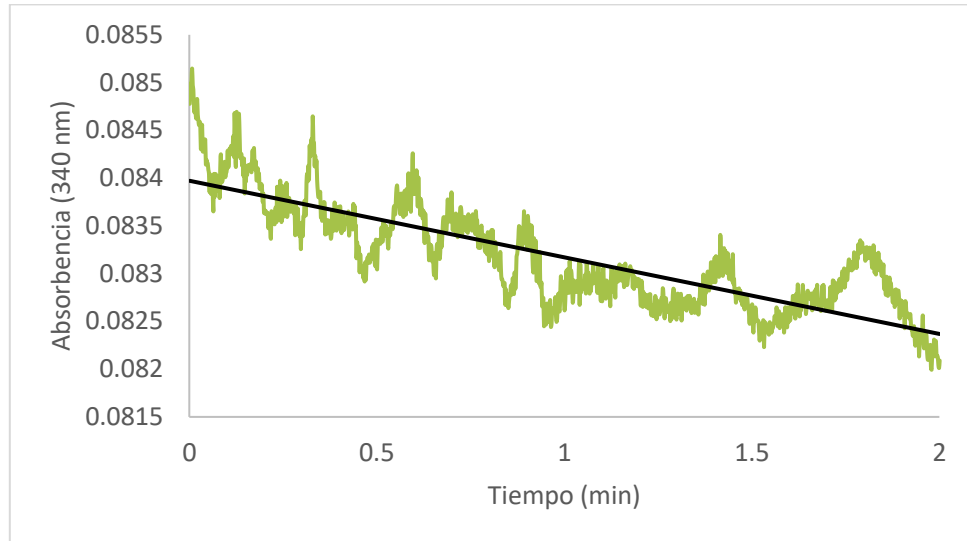


Figura 3.4 Decremento de la absorbancia a 340 nm de la mezcla de reacción, que nos indica consumo de NADPH.

La actividad se calculó con la pendiente de la curva absorbancia vs tiempo obtenida con la lectura en el espectrofotómetro, cuyo valor se sustituyó en la siguiente fórmula:

$$U = \frac{\Delta \left( \frac{Abs}{min} \right) * Vf}{Vi * \epsilon * b} \quad \text{Ec 3.1}$$



Donde:

$\Delta \left( \frac{Abs}{min} \right)$  = Velocidad inicial de trabajo de la enzima (pendiente de la curva)

$V_f$  = Volumen final de la mezcla de reacción (3 ml)

$V_i$  = Volumen de extracto enzimático (60  $\mu$ l)

$\varepsilon$  = Coeficiente de extinción molar de NADPH (6.22  $\text{mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

$b$  = Espesor de la celda de medición (1 cm)

La Unidad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1  $\mu$ mol de sustrato en un minuto de reacción, bajo condiciones previamente establecidas.

Después podemos calcular la actividad específica al dividir las unidades enzimáticas entre los mg de proteína usados como se muestra en la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{U}{mg \text{ de proteína}} \quad \text{Ec. 3.2}$$

#### 3.1.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SORBITOL DESHIDROGENASA (SDH)

La determinación de actividad de Sorbitol Deshidrogenasa (SDH) se basa en la medición del consumo de  $\text{NAD}^+$ , el cual es proporcional a la actividad de la enzima. Éste decremento se mide espectrofotométricamente a 340 nm durante 2 minutos y con la pendiente obtenida se calcula la actividad enzimática. Para la comprobación de que se está trabajando con la enzima SDH usamos ácido salicílico como inhibidor.

Las mezclas de reacción se realizaron de acuerdo a la tabla 9.3, el volumen final de todas las mezclas es de 3 ml.



Tabla 3.3 Composición de las mezclas de reacción utilizadas para la medición de la actividad enzimática de SDH (modificado de Aslan H.E. *et al.*, 2017).

Reactivos	Concentración (Mm)	Control*	Blanco 1*	Muestra*	Blanco 2*
Búfer de fosfatos de potasio	100	2535	2835	2535	2835
2-mercaptoetanol	1	15	15	15	15
Agua		30	30	----	----
Ácido Salicílico (inhibidor)	74	----	----	30	30
Extracto de enzima		60	60	60	60
D-sorbitol (sustrato)	10	300	----	300	----
NAD <sup>+</sup>	47	60	60	60	60

\*Cantidades en microlitros ( $\mu$ l).

Se utilizan las mismas ecuaciones para calcular U y AE que en el apartado anterior.

### 3.1.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6FDH)

El método para la determinación de actividad de la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6FDH) se basa en la medición de la aparición de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato NADPH, ya que la enzima utiliza al NADP<sup>+</sup> como coenzima. La reducción del NADP<sup>+</sup> se cuantifica espectrofotométricamente a 340 nm durante 3 minutos de reacción. 2-Desoxi-d-glucosa se usó como inhibidor de G6FDH, para comprobar que se está trabajando con esta enzima. En estos ensayos el sustrato se agrega a los 20 segundos de iniciar la lectura en el espectrofotómetro. Al igual que en las mediciones de actividad enzimática anteriores tomamos la pendiente obtenida y la sustituimos en las fórmulas de actividad enzimática (U) y actividad específica (AE). En la siguiente tabla se muestran las composiciones de las mezclas de reacción utilizadas.



Tabla 3.4 Composición de las mezclas de reacción utilizadas para la medición de la actividad enzimática de G6FDH (modificado de Worthington Enzyme Manual, 1993).

Reactivos	Concentración (mM)	Control*	Blanco 1*	Muestra*	Blanco 2*
Búfer de citratos	5	850	900	800	850
Inhibidor (2-desoxi-d-glucosa)	0.1	----	----	50	50
Extracto de enzima		50	50	50	50
Sustrato (Glucosa-6-fosfato)	1.52	50	----	50	----
NADP <sup>+</sup>	0.42	50	50	50	50

\*Cantidades en microlitros ( $\mu$ l).

### 3.1.6 ACTIVACIÓN DE LA ENZIMA AR

La activación de la enzima ARK y la inhibición de la SDH es la estrategia en la producción de xilitol con el uso de un extracto crudo en este trabajo. Varios reportes de sustancias que activan a la enzima AKR se han publicado. De los activadores descritos están principalmente sales de sulfato, que tienen diferentes niveles de activación que depende del origen de cada enzima y de la sal usada. En las tablas 3.5 y 3.6 se presentan resultados de activación reportados por Jedziniak *et al.* en 1971 y por Deliang *et al.* en 1998.

Tabla 3.5 Efecto de la diálisis en la actividad enzimática (Jedziniak *et al.*, 1971).

Muestra	Actividad específica, LiSO <sub>4</sub>		Actividad residual, LiSO <sub>4</sub>		Estimulación del LiSO <sub>4</sub>
	(-)	(+)	(-)	(+)	
Prediálisis	2 787	7 348			2.64
Postdiálisis	726	1 064	26.1	14.5	1.47



Postdiálisis + mercaptoetanol	4 493	7 973	161.2	108.5	1.77
-------------------------------	-------	-------	-------	-------	------

Tabla 3.6 *Efecto de iones cloruro y sulfato en la actividad de AR y ARL-1*. Reducción de D-Gliceraldehído por AR y ARL-1 se hicieron de acuerdo a las condiciones descritas en la sección “Materiales y métodos” excepto por la adición de las sales como se indica. La actividad enzimática de AR y ARL-1 sin iones cloruro y sulfato se indican como 100 %, y la actividad en presencia de los iones se expresa como porcentaje de la actividad enzimática en la ausencia de iones (Deliang *et al.*, 1998).

Sal [0.3 M]	Actividad relativa (%)	
	AR	ALR-1
Control	100	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	192.7	110.5
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	227.7	102.6
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	171.4	101.4
NH <sub>4</sub> Cl	93.1	125.3
NaCl	81.9	105.8

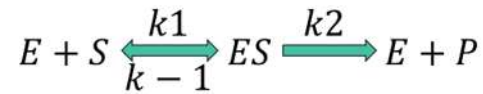
Los autores le atribuyen este efecto de activación al ion sulfato ya que encontraron que los compuestos sulfhídricos protegen y estabilizan a la enzima. De las sales mostradas se decidió trabajar con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ya que son las que se encontraban disponibles.

### 3.1.7 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Para determinar la  $K_m$  y la  $V_{m\acute{a}x}$  de la enzima AKR1B1 utilizamos el modelo de Michaelis y Menten (1913), el cual explica la mayoría de las reacciones catalizadas por enzimas. En este modelo la enzima se une al sustrato y forma el complejo enzima-



sustrato (ES), que posteriormente se rompe para liberar el producto y la enzima se regenera.



Donde:

$S$  = Sustrato

$E$  = Enzima

$P$  = Producto

$ES$  = Complejo enzima-sustrato

$k1, k2$  y  $k - 1$  = Constantes de la velocidad de reacción

La ecuación de Michaelis y Menten describe como varía la velocidad de reacción con la concentración de sustrato:

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ec. 3.3}$$

Donde:

$[S]$  = Concentración de sustrato

$V_0$  = Velocidad inicial de reacción

$V_{max}$  = Velocidad máxima de reacción

$K_m$  = Constante de Michaelis-Menten



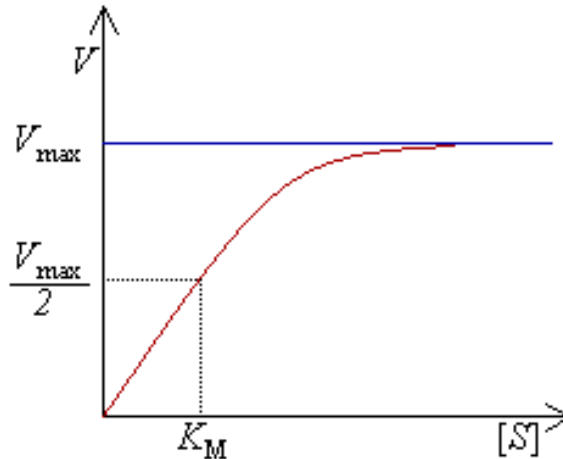


Figura 3.5 Gráfico representativo de la cinética enzimática descrita por Michaelis y Menten.

Posteriormente la ecuación de Michaelis y Menten se transformó en la regresión de Lineweaver-Burke, que es una herramienta gráfica que nos facilita el cálculo de los parámetros bioquímicos, en la que se toma el recíproco tanto de las concentraciones y las velocidades de reacción obtenidas para obtener una línea recta cuya intersección con el eje de las abscisas es igual a  $-1/K_m$  y el intercepto con el eje de las ordenadas es igual a  $1/V_{máx}$  (Lineweaver y Burk, 1934). En la obtención de los datos para ésta ecuación se mide la velocidad inicial de reacción espectrofotométricamente a 340 nm y en la mezcla de reacción cambiamos solamente la concentración del sustrato.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{máx}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}} \quad \text{Ec. 3.4}$$



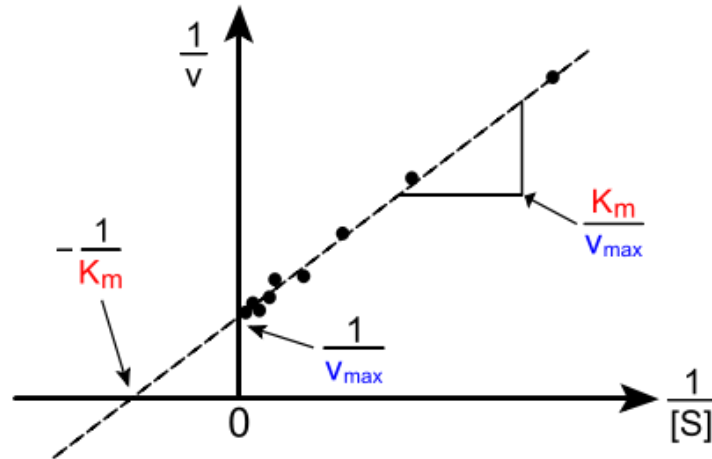


Figura 3.6 Gráfico representativo obtenido con la regresión de Lineweaver-Burk.

Tabla 3.7 Composición de las mezclas de reacción para la medición de la actividad enzimática de AKR1B1 en interacción con G6FDH.

Reactivos	Concentración (mM)	Control*	Blanco 1*	Muestra*	Blanco 2*
Búfer de citratos	5	2519	2819	2219	2519
2-mercaptoetanol	1	15	15	15	15
Ácido salicílico (inhibidor)	74	30	30	30	30
G6FDH		16	16	16	16
Extracto de enzima		60	60	60	60
Glucosa 6 fosfato	1.52	---	---	300	300
Xilosa (sustrato)	1	300	----	300	----
NADPH	0.2	60	60	60	60

\*Cantidades en microlitros ( $\mu$ l).

### 3.1.8 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA Y CUANTIFICACIÓN DE XILITOL

La inmovilización de las enzimas se llevó a cabo con el principio de la cromatografía de exclusión molecular, con la cual se separan las moléculas de acuerdo a su tamaño, por lo que las moléculas que tienen un tamaño mayor al límite de exclusión (tamaño mínimo que debe poseer una molécula para incluirse) de la resina eluyen de la columna. Mientras las moléculas dentro del límite quedan en el soporte.



Para la preparación de la columna se tomaron 45 ml de resina (prehidratada), se empacaron en una columna de cromatografía marca Kimax de 22 x 500 mm y se equilibraron las con 45 ml de búfer de citratos 55 mM a pH de 7 y a 4 °C, este lavado se realizó 3 veces. Al fondo de la columna previamente se le colocó un filtro de celulosa con tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  y una cama algodón para evitar la salida de la resina.

Después de equilibrar la columna se agrega la mezcla del complejo enzimático (5.3 ml) y se eluye con 45 ml de búfer a 4 °C.

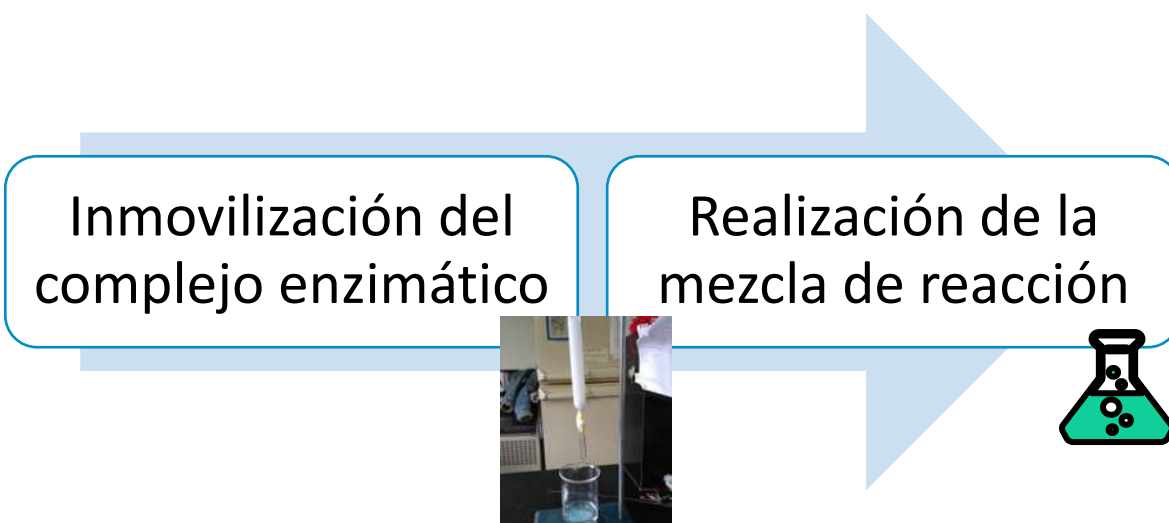


Figura 3.7 Esquema para la determinación de xilitol producido por el complejo enzimático inmovilizado.

Se realizaron mezclas de reacción con un volumen final de 100 ml en matraces Erlenmeyer de 250 ml en un agitador orbital a una velocidad de 150 rpm y a 25 °C. Las mezclas de reacción se describen en la Tabla 3.8.

Cada mezcla se dejó reaccionar por 1 h, después se detuvo la agitación y la mezcla se dejó reposar por 30 min para que la enzima inmovilizada se precipitara. La mezcla de reacción se recuperó y la enzima inmovilizada se dejó en el matraz. A esto se le llamó un ciclo de reacción. Con cada uno de los soportes se llevó a cabo la reacción por triplicado y se realizaron tres ciclos.



Tabla 3.8 Composición de las mezclas de reacción con las enzimas inmovilizadas.

Reactivos	Concentración (mM)	Volumen (ml)
Búfer de citratos	5	60.5
2-mercaptoetanol	1	0.5
Ácido salicílico	74	1
Sulfato de amonio	300	1
Enzimas inmovilizadas	-	15
Glucosa-6-fosfato	1.52	10
Xilosa	21	10
NADPH	0.2	2

Las mezclas resultantes se liofilizaron para concentrarlas.



## CAPÍTULO 4. RESULTADOS

### 4.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENRIQUECIDO DE LA ENZIMA ALDOSA REDUCTASA

Un estudio previo de nuestro equipo de trabajo se realizó con la enzima Aldosa Reductasa de cristalino de bovino (AKR1B5) (Morales-Cabral, 2016). Pero debido a la poca disponibilidad de ésta fuente enzimática se buscaron otras fuentes alternativas y accesibles. Para ello, nos apoyó la posta de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Quienes nos facilitaron la obtención de cristalinos de conejo y cerdo. Un análisis de la identidad proteica se procedió a hacer, se realizó entre las secuencias de aminoácidos de los péptidos que conforman las enzimas de cerdo, conejo, bovino con la enzima AKR1B1 de cristalino de humano, que se usó como referencia. Los resultados se encuentran en la Tabla 4.1.

Como se observa, las tres enzimas tienen identidades proteicas parecidas a la enzima Aldosa reductasa que se encuentra en el cristalino humano. Por lo cual se infiere que todas ellas son capaces de producir xilitol. La identidad de la enzima de conejo con la de humano se destacó entre las otras dos y se seleccionó como fuente de enzima AR al conejo.

Tabla 4.1 Comparación de identidad proteica de las enzimas AKR de los cristalinos de conejo, cerdo y bovino.

Enzima	Identidad (%) <sup>*</sup>	Posiciones de aminoácidos idénticas
AKR1B1 (conejo)	88.9	281/316
AKR1B6 (cerdo)	86.7	274/316
AKR1B5 (bovino)	86.4	273/315

<sup>\*</sup>comparadas con AKR1B1 de cristalino de humano en uniprot.org

En la Tabla 4.2 se muestran los datos que se obtuvieron con el enriquecimiento del extracto enzimático tanto de cristalinos de conejo como de cerdo mediante



precipitación salina. El enriquecimiento se realizó con la adición de sulfato de amonio. En el extracto enriquecido observamos una mayor cantidad de proteína, una mayor actividad específica e inhibición. Al hacer análisis estadístico de comparación de medias simple con t de Student,  $p = 0.05$  una diferencia estadística se encontró en la cantidad de proteína del extracto enriquecido de cristalino de conejo comparada con el extracto crudo. Con esto concluimos que la saturación del extracto enzimático con 40 % (p/v) de sulfato de amonio es una estrategia adecuada para su enriquecimiento y eliminar proteínas que no son de interés y que pueden causar interferencia durante el análisis de actividad enzimática.

Los experimentos posteriores se realizaron con el extracto enzimático enriquecido obtenido de cristalino de conejo debido a que la AR que contiene es la que muestra una mayor identidad proteica con la enzima del cristalino de humano, además de que el volumen de extracto enzimático que se obtiene de cristalinos de conejo es mayor que el volumen de extracto de cristalinos de cerdo.

Tabla 4.2 Enriquecimiento de la enzima Aldosa Reductasa en el extracto proteínico de cristalinos de conejo y cerdo.

Fuente de enzima	Tipo de extracto	Cantidad de proteína (mg/ml)	Factor de enriquecimiento	Actividad específica (U/mg prot.)	+Inhibición (%)
Conejo	Crudo	15.70 ± 1.2	1	1.91 ± 0.32	50.83 ± 8.5
	Enriquecido	19.04 ± 0.8*	1.67	2.44 ± 0.16	61.41 ± 6.6
Cerdo	Crudo	11.78 ± 0.8	1	2.17 ± 0.38	42.55 ± 5.0
	Enriquecido	14 ± 1.4	1.18	2.55 ± 0.41	61.67 ± 1.3

Los datos son promedio de  $n = 3$ , por duplicado. \*t Student,  $p = 0.05$

+Inhibidor: Naringenina 1 mM (Morales-Cabral, 2016)

Factor de enriquecimiento = actividad específica del extracto enriquecido (EE) / actividad específica del extracto crudo (EC)



En 1981 Jedziniak y colaboradores realizaron ensayos de actividad enzimática con cristalinos de conejo, becerro y humano. El d-gliceraldehído se utilizó como sustrato. Las actividades específicas que se encontraron fueron 0.15 U para los cristalinos de conejo, 0.012 U para cristalinos de becerro y 0.015 U para cristalinos de humano. En la tabla 2.3 se presentó la afinidad de la enzima de cristalino de bovino y observamos que el gliceraldehído es el sustrato para el que se tiene una mayor afinidad y es por esto que se Jedziniak *et al.* obtienen actividades específicas más grandes que las que obtuvimos al usar xilosa como sustrato. Además, en todos sus ensayos usaron sulfato de litio 0.4 M y como se observó en la tabla 3.6, ésta sal es un activador de AR, lo cual ayuda a la enzima a ser más estable y por lo tanto tiene una mayor actividad.

Por otro lado, G. Branlant en 1982 y J. Reymann *et al.* en 1992 trabajaron con cristalinos de cerdo, usaron xilosa como sustrato y llevaron sus ensayos a cabo a 30 °C. Reymann utilizó el extracto crudo y obtuvo una AE de 0.0004 U. Mientras que Branlant enriqueció su extracto enzimático con 35-70 % de sulfato de amonio y obtuvo una AE de 0.0008 U. Ambas actividades son menores a las que obtuvimos en este trabajo: 5 veces menor para el extracto crudo y 3 veces menor para el extracto enriquecido, aproximadamente. Esta diferencia en la AE puede deberse a que en nuestra mezcla de reacción agregamos 2-mercaptoetanol, que de acuerdo a los resultados de Jedziniak *et al.* en 1971, tiene un efecto protector en la enzima, por lo que la estabiliza y aumenta su actividad. Además, las diferentes temperaturas a las que se llevaron a cabo los ensayos también tienen influencia en la AE como lo demostró Morales-Cabral en 2016, que realizó ensayos con la enzima AKR1B5 de cristalino de bovino a diferentes temperaturas y determinó que la temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en la AE.

## 4.2 ESTABILIDAD DE LA ENZIMA AKR1B1 EN EL TIEMPO

En el estudio que se realizó anteriormente en nuestro grupo de trabajo por Morales-Cabral en 2016 se obtuvo un extracto enzimático de AR de cristalino de bovino, el cual en un mes de almacenamiento perdió más del 70 % de su actividad enzimática, solamente le restó el 23.06 % de actividad enzimática.



El extracto obtenido en este trabajo mostró una estabilidad sobresaliente. Se hicieron pruebas de actividad enzimática con un extracto elaborado en junio del 2017 y se repitió la prueba en abril del 2018. La actividad enzimática obtenida en junio del 2017 se tomó como el 100 %. El resultado de la prueba de actividad que se realizó en abril (diez meses después de la extracción, Figura 4.1) nos mostró que el 90 % de la actividad enzimática se mantuvo, lo cual nos indica que la AR extraída de cristalino de conejo es más estable en el tiempo que la AR extraída de cristalino de bovino y las condiciones de almacenamiento del extracto (-4 °C) son las adecuadas.

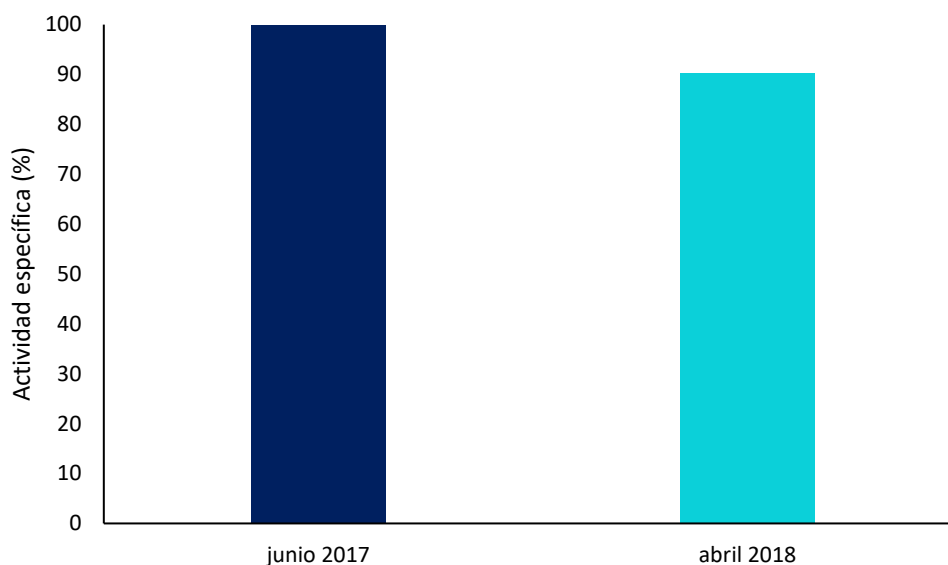


Figura 4.1 Estabilidad de la enzima AKR extraída de cristalino de conejo en el tiempo.

### 4.3 ESTRATEGIA PARA LA PRODUCCIÓN DE XILITOL

En el extracto enzimático encontramos que existe la enzima Sorbitol deshidrogenasa (SDH). Otra enzima que es parte de la vía de los polioles y puede reducir el xilitol a xilulosa (Figura 2.5). Potencialmente, esto es una causa de un menor rendimiento de xilitol por lo que se debe eliminar este factor de interferencia, mediante la inhibición de la enzima SDH mientras al mismo tiempo activamos a la enzima AKR1B1. En la Tabla 4.3 se muestran la inhibición de las enzimas en la vía de los polioles con los



inhibidores reportados en la literatura (Naringenina para AR y Ácido salicílico para SDH), además observamos el efecto que tiene cada inhibidor en la enzima contraria.

Tabla 4.3 Inhibición de las enzimas de la vía de los polioles.

Inhibidor	Enzima	Actividad específica (U/mg prot.)	Inhibición (%)
AKR1B1	Control	2.44 ± 0.16	0
	Naringenina	0.92 ± 0.14	61.4
	Ácido salicílico	1.38 ± 0.05	43.4
SDH	Control	1.82 ± 0.02	0
	Naringenina	1.38 ± 0.05	24.2
	Ácido salicílico	0.41 ± 0.02	77.5

Los datos son promedio de n = 3, por duplicado  
Búfer de fosfatos 100 mM a pH 6.8

La Naringenina inhibe a la enzima AR de una forma competitiva, es decir, que el inhibidor se une a la enzima en el mismo sitio que el sustrato, por lo tanto, hay competencia entre inhibidor y el sustrato (Morales-Cabral, 2016). Por otro lado, el ácido salicílico sabemos que tiene una inhibición no competitiva en la SDH, esto quiere decir que el inhibidor y el sustrato se unen a la enzima en sitios distintos (Aslan *et al.*, 2017).

Con los datos de la Tabla 4.3 podemos comprobar la existencia de ambas enzimas en nuestro extracto enzimático.



#### 4.4 MOTOR QUÍMICO DE REGENERACIÓN DE NADPH

El NADPH + H<sup>+</sup> también es un factor limitante en la producción de xilitol, además de ser el reactivo más costoso de la reacción por lo que realizamos un experimento para buscar la posible existencia de la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6FDH) cuya coenzima es el NADP<sup>+</sup>, con lo que se lograría obtener un motor químico de regeneración de NADPH, ver la Figura 4.2. Esta enzima es el primer paso de la vía de las pentosas fosfato, en esta vía se genera NADPH + H<sup>+</sup> y carbohidratos importantes en el metabolismo primario los cuales son necesarios para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos.

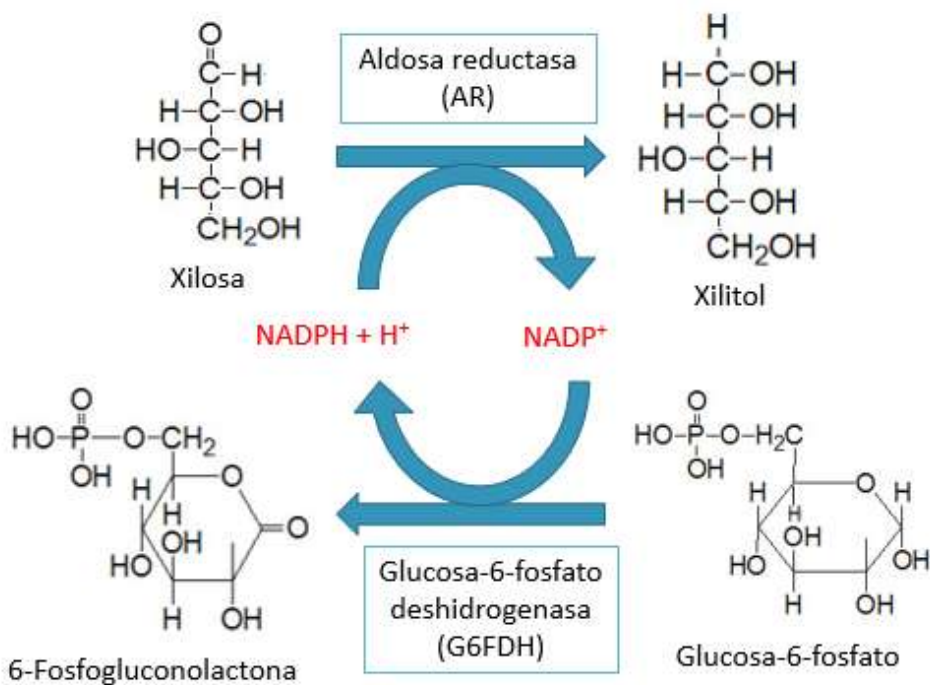


Figura 4.2 Esquema del motor químico de regeneración de NADPH formado por las enzimas Aldosa reductasa y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Tanto el extracto crudo como el enriquecido se ensayaron para determinar la presencia de la G6FDH. La observación fue que esta enzima no precipita a 40% de sulfato de amonio, por lo que no se detecta su actividad enzimática en el extracto



enriquecido, ver Figura 4.3. Dado esto, la enzima G6FDH exógena se tiene que adicionar a la mezcla de reacción.

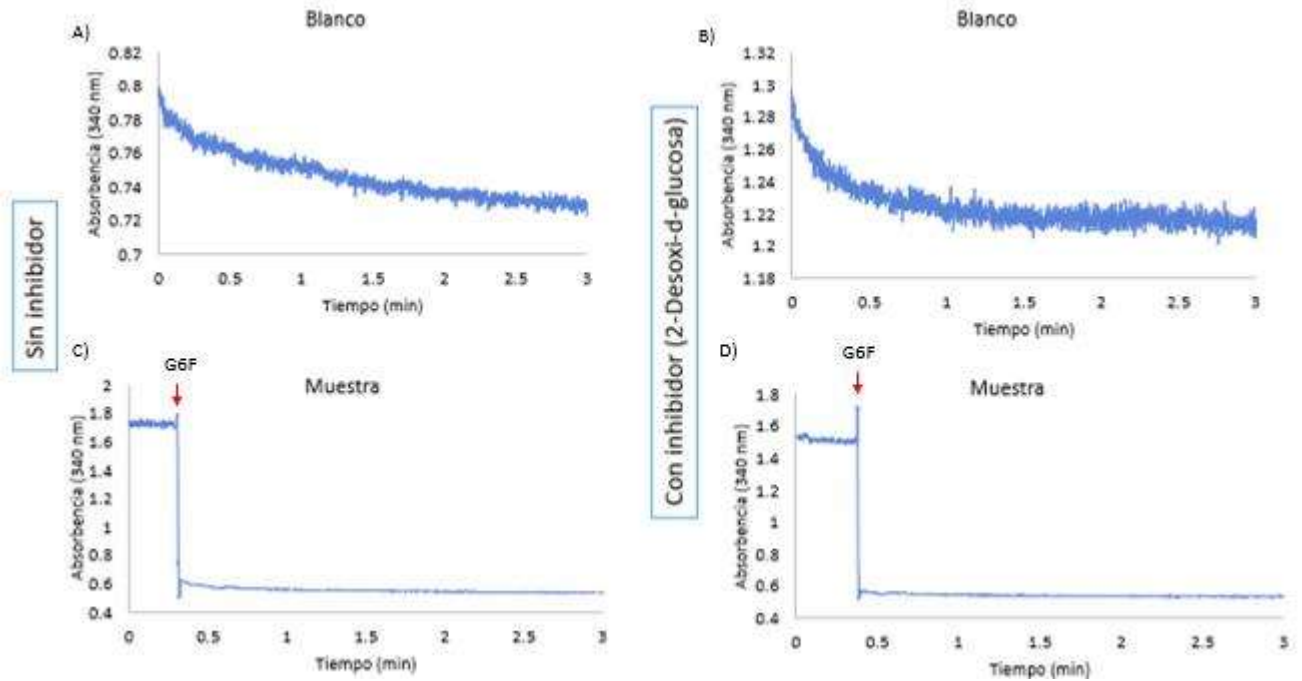


Figura 4.3 Extracto enriquecido (EE) de cristalino de conejo sin G6FDH. A) Control sin sustrato y sin inhibidor, B) Control con sustrato y con inhibidor, C) Muestra con sustrato y sin inhibidor, D) Muestra con sustrato y con inhibidor.

En la Figura 4.3 podemos observar la ausencia de actividad de la enzima G6FDH en el extracto enzimático enriquecido de cristalino de conejo, en las gráficas de los paneles C) y D) se observa un cambio brusco en la absorbancia debido a que el sustrato (Glucosa-6-fosfato) se adiciona a los 20 segundos de iniciar la lectura, pero después observamos que no hay pendiente, es decir, no hay actividad de la enzima.

Corroboramos que la enzima G6FDH precipita a concentraciones mayores de sulfato de amonio con estudios previos de esta enzima. Marks en 1961 purificó la G6FDH de eritrocitos humanos, para obtener cristales de la enzima, primero precipitó su extracto enzimático con 35 % de sulfato de amonio, desechó el precipitado y saturó el sobrenadante a 55 %, con lo que obtuvo una fracción purificada con AE de 3 320 U. En 1961 Noltmann obtuvo la misma enzima de *Saccharomyces cerevisiae* y saturó su extracto con sulfato de amonio en concentraciones de 48 a 78 %. Es por esto que



podemos inferir que la enzima no precipitó al 40 % de sulfato de amonio utilizado en nuestra metodología y por lo tanto se quedó en el sobrenadante que desechamos al obtener el extracto enzimático enriquecido de AR.

La enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se adquirió de la empresa Sigma-Aldrich (Glucose-6-phosphate dehydrogenase from baker's yeast *S. cerevisiae*), y para su uso se cambió el búfer con el que se realizaron los ensayos enzimáticos debido a que el fabricante indicó que esta enzima es inhibida por búfer de fosfatos. Se realizaron pruebas con 2 tipos de amortiguador: búfer de citratos 5 mM a pH 7 y búfer TRIS 55 mM a pH 7. El primero es el búfer recomendado por el proveedor de la enzima G6FDH, y el segundo es el amortiguador que se encontró en protocolos de nuestro laboratorio donde se trabajó con esta misma enzima. Los resultados obtenidos de inhibición de las enzimas de la vía de los polioles con el cambio de búfer se muestran en la tabla 4.5, donde observamos que con búfer de citratos la enzima SDH pudo ser inhibida un 72.2 %, mientras que encontramos un efecto contrario con búfer TRIS, en el que el ácido salicílico activó a la enzima un 60.6 %, para esta observación aún no encontramos una explicación.

Tabla 4.5 Efecto del búfer en la actividad de las enzimas de la vía de los polioles.

Búfer	Enzima	Inhibidor	Actividad específica (U/mg prot.)	Inhibición/activación (%)
Fosfatos	Control	--	2.44 ± 0.16	--
	AKR1B1	Naringenina	0.92 ± 0.14	61.4
	Control	--	1.82 ± 0.02	--
	SDH	Ác. salicílico	0.41 ± 0.02	77.5
Citratos	Control	--	2.78 ± 0.16	--
	AKR1B1	Naringenina	2.40 ± 0.17	13.7
	Control	--	2.41 ± 0.37	--
	SDH	Ác. salicílico	0.67 ± 0.03	72.2



TRIS	Control	--	$2.84 \pm 0.16$	--
	AKR1B1	Naringenina	$0.98 \pm 0.03$	65.5
	Control	--	$1.27 \pm 0.03$	--
	SDH	Ác. salicílico	$2.04 \pm 0.11$	-60.6

Los datos son promedio de  $n = 3$ , por duplicado

Los valores negativos indican activación de las enzimas

Búfer de fosfatos 100 mM a pH 6.8

Búfer de citratos 5 mM a pH 7

Búfer TRIS 55 mM a pH 7

#### 4.5 ACTIVACIÓN DE LA ENZIMA AR

En la Tabla 4.6 se muestra el efecto que tuvieron las sales elegidas (sulfato de amonio y de sodio) para la activación de la enzima Aldosa reductasa, donde podemos observar que el sulfato de amonio tuvo efecto activador en esta enzima con los búfer de fosfatos y citratos, además también obtenemos activación con sulfato de sodio en búfer TRIS. Posteriormente, un ensayo se realizó para observar el efecto sulfato de amonio en la enzima SDH y se obtuvo una inhibición de 59.3 %, lo cual es un efecto deseable en este caso. Debido a estos resultados y a que con búfer de citratos se inhibió a la enzima SDH con ácido salicílico se concluyó que el mejor amortiguador fue el de citratos 5 mM a pH 7 para los ensayos posteriores.

Tabla 4.6 Efecto de las sales sulfatadas en la enzima AKR1B1.

Activador [300 mM]	Búfer	Actividad específica (U/mg prot.)	Activación/ Inhibición (%)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Búfer de fosfatos	$2.68 \pm 0.06$	9.8
	Búfer de citratos	$4.47 \pm 0.03$	60.79
	Búfer TRIS	$1.17 \pm 0.03$	-57.91
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	Búfer de fosfatos	$1.91 \pm 0.17$	-21.72



	Búfer de citratos	2.50 ± 0.12	-10.07
	Búfer TRIS	5.20 ± 0.15	83.10

Los datos son promedio de n = 3, por duplicado

Los valores negativos indican inhibición de las enzimas

Búfer de fosfatos 100 mM a pH 6.8

Búfer de citratos 5 mM a pH 7

Búfer TRIS 55 mM a pH 7

En los resultados de activación de la enzima AR (Tablas 3.5 y 3.6) presentados en la metodología observamos que la activación de la enzima depende su origen. Además de la sal usada y de acuerdo a nuestros resultados, conocemos que depende del búfer con el que se trabaja ya que con la misma concentración del sulfato el efecto es diferente. De acuerdo a Petrash, *et al.* en 1992, en ésta activación está involucrada la cisteína 298, que es parte del sitio de especificidad del centro activo en las AKR, su oxidación acelera la catálisis, ya que previene el cierre completo del sitio donde se une la coenzima, de ésta forma el NADP<sup>+</sup> se libera con mayor facilidad y por lo tanto aumenta la velocidad de reacción. Ésta liberación de la coenzima oxidada es el paso limitante en la catálisis de la enzima (Barski *et al.*, 2008).

En la Figura 4.4 se muestra un esquema completo de la estrategia implementada para la producción de xilitol con extracto enzimático enriquecido de cristalino de conejo, que incluye la inhibición de SDH, activación de AKR y uso de G6FDH como motor químico de regeneración de NADPH.



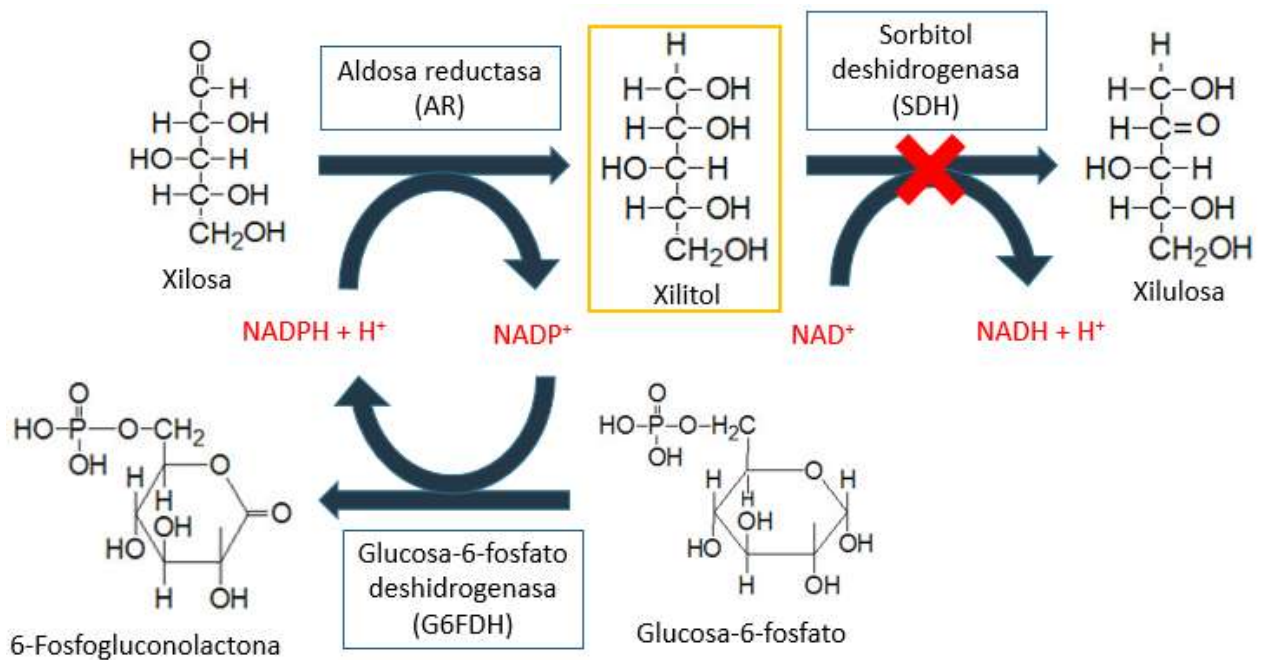


Figura 4.4 Esquema de la estrategia para producir xilitol con extracto enzimático obtenido de cristalino de conejo.

#### 4.6 OBTENCIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DE LA ENZIMA AKR1B1

Los parámetros bioquímicos de la enzima AKR1B1 se calcularon con el uso de la cinética descrita por Michaelis y Menten. Distintas concentraciones iniciales de sustrato se usaron y posteriormente se realizó una gráfica de Lineweaver-Burk, en la que se toma el recíproco tanto de las concentraciones y las velocidades de reacción obtenidas para crear una línea recta cuya intersección con el eje de las abscisas es igual a  $-1/K_m$  y el intercepto con el eje de las ordenadas es igual a  $1/V_{m\acute{a}x}$ .

La  $K_m$  se define como la concentración de sustrato a la que la velocidad de reacción es la mitad de su valor máximo, un valor pequeño de  $K_m$  indica mayor afinidad de la enzima con el sustrato y el valor de  $V_{m\acute{a}x}$  corresponde a la condición en la que todas las moléculas de enzima están saturadas con sustrato. Mediciones de la velocidad de reacción se hicieron con diferentes concentraciones de xilosa.

Para la enzima AKR1B1 sin interacción con la enzima G6FDH se obtuvieron los datos experimentales mostrados en la Tabla 4.7.



Tabla 4.7 Datos de velocidad obtenidos para la enzima AKR1B1 con xilosa como sustrato.

Concentración de sustrato (mM)	Velocidad de reacción ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )
0.01	$2.42 \pm 0.11$
0.1	$4.06 \pm 0.23$
0.5	$4.08 \pm 0.16$

Con la ecuación obtenida en el gráfico de Lineweaver-Burk ( $y = 0.0018x + 0.2351$   $R^2 = 0.9956$ ) podemos obtener los parámetros  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  de la enzima, que se muestran a continuación:

$$K_m = 0.0076 \text{ mM}$$

$$V_{m\acute{a}x} = 4.25 \mu\text{mol}/\text{min}$$

Posteriormente se sacaron los mismos parámetros para la enzima AKR1B1 en interacción con la enzima G6FDH. Los datos obtenidos experimentalmente se muestran en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8 Datos de velocidad obtenidos para la enzima AKR1B1 con xilosa como sustrato en interacción con G6FDH.

Concentración de sustrato (mM)	Velocidad de reacción ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )
0.005	$1.11 \pm 0.04$
0.01	$2.05 \pm 0.15$
0.03	$3.39 \pm 0.06$
0.05	$3.88 \pm 0.07$

Con la ecuación obtenida en el gráfico de Lineweaver-Burk ( $y = 0.0036x + 0.1697$   $R^2 = 0.9914$ ) podemos obtener los parámetros  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  de la enzima AKR1B1 cuando se encuentra en interacción con la enzima G6FDH, que se muestran a continuación:



$$K_m = 0.021 \text{ mM}$$

$$V_{\text{máx}} = 5.89 \text{ } \mu\text{mol/min}$$

En la base de datos BRENDA Comprehensive Enzyme Information System se reportan valores de  $K_m$  de Aldosas reductasas de diferentes orígenes, entre los que destaca la AR de humano, que con d-xilosa como sustrato tiene valores de  $K_m$  que van de 5.04 a 7.4 mM y como podemos observar, éstos valores son comparables a los que obtuvimos en nuestros resultados.

La constante de Michaelis y Menten cuando es grande nos indica que la enzima tiene menor afinidad por el sustrato. El valor de  $K_m$  de la Aldosa reductasa que obtuvimos es alto debido a que la enzima en estado basal solamente metaboliza una pequeña cantidad de aldehídos, ya que su función es de destoxificación, y reduce una mayor cantidad de aldehídos cuando éstos se encuentran en exceso.



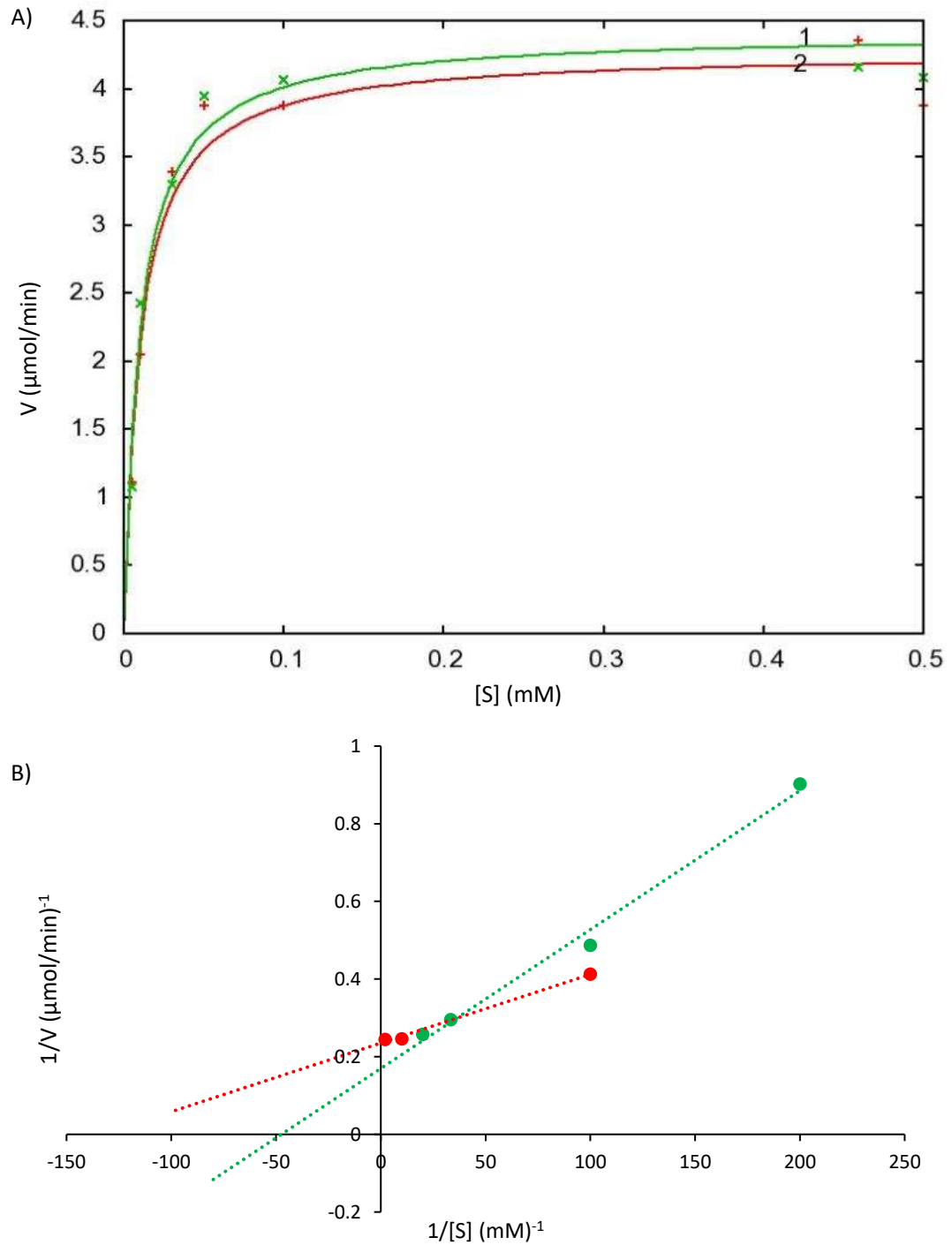


Figura 4.5 A) Gráfico de Michaelis y Menten y B) Regresión de Lineweaver-Burk, donde se muestra la cinética de la enzima AKR sin interacción con G6FDH — y con interacción con G6FDH —



En el panel B de la Figura 4.5 observamos se muestran las regresiones de Lineweaver-Burk en las que podemos observar más claramente la diferencia en la velocidad de reacción cuando la AKR1B1 se encuentra sola comparada a cuando se encuentra en interacción con G6FDH, con esto comprobamos que el motor de regeneración de NADPH + H<sup>+</sup> propuesto funciona, por esto la enzima AKR1B1 tiene una mayor disponibilidad de coenzima para realizar su función y su velocidad máxima aumenta.

Diferentes métodos existen para la regeneración y retención de cofactores que son necesarios para muchas enzimas de interés en la industria, el que demuestra mejores resultados es la regeneración por medio de enzimas. Además, esta regeneración del cofactor abarata la producción enzimática ya que añadir los cofactores en cantidades estequiométricas es costoso debido a su complejidad e inestabilidad (Wichmann y Vasick-Racki, 2005). La enzima G6FDH es adecuada para la regeneración de NADPH + H<sup>+</sup> en nuestro sistema, ya que observamos que ambas enzimas pueden trabajar en conjunto. Además, G6FDH no utiliza a xilosa como sustrato.

Con todos los datos obtenidos al aplicar la estrategia propuesta podemos sugerir las siguientes condiciones para la producción de xilitol:

- Amortiguador: de citratos 5 mM a pH 7
- Activador de AKR1B1: sulfato de amonio 300 mM
- Concentración de xilosa: 21 mM
- Inhibidor de SDH: ácido salicílico 74 mM
- Unidades de enzima G6FDH: 0.147 U
- Concentración de glucosa-6-fosfato: 1.52 mM



#### 4.7 INMOVILIZACIÓN DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO Y CUANTIFICACIÓN DE XILITOL EN LA MEZCLA DE REACCIÓN

El complejo enzimático se inmovilizó como se describe en la metodología y se midió la cantidad de proteína en cada fracción eluida de la columna (cada fracción de aproximadamente 6 ml) además de la actividad de la enzima AKR1B1.

En la Tabla 4.9 se muestran los datos obtenidos y podemos observar que en las fracciones 3 a la 9 no hay actividad enzimática comparados con la actividad de los extractos enzimáticos crudo (EC) y enriquecido (EE) de la misma enzima, por lo que inferimos que la enzima se quedó en el soporte de inmovilización, sin embargo, a partir de la fracción 10 observamos que la actividad enzimática es comparable a los controles (EC y EE), esto nos indica que la enzima empezó a eluir con la fase móvil a partir de esa fracción. Dados estos resultados, para la inmovilización enzimática debemos usar solamente 45 ml de búfer como fase móvil.

Tabla 4.9 Inmovilización del complejo enzimático en gel preparado por medio de reticulación con dextrano y epíclorhidrina.

Alícuota	Proteína (mg/ml)	U ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	AE (U/mg proteína)
EC	15.70	28.47	1.92
EE	19.04	40.85	2.44
3	2.77	0.27	0.76
4	6.76	0.08	0.55
5	5.07	0.11	0.55
6	3.16	0.02	0.07
7	1.39	0.20	0.27
8	0.78	0.00	0.00
9	0.42	1.30	0.55
10	0.25	10.88	2.75



11	0.12	20.37	2.41
12	0.15	17.64	2.68



## CONCLUSIONES

El extracto enzimático enriquecido de Aldosa reductasa que se obtuvo de cristalino de conejo, con la adición de la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa formó un motor químico para la regeneración de la coenzima NADPH + H<sup>+</sup>. Con esto se aumentó la V<sub>máx</sub> de la enzima AR. Éste complejo enzimático se pudo inmovilizar en partículas de dextrano modificadas para la producción de xilitol.



## BIBLIOGRAFÍA

Aslan H. E., Beydemir E. (2017) Phenolic compounds: The inhibition effect on polyol pathway enzymes. *Chemico-Biological Interactions*. 266, 47-55

Balance Nacional de Edulcorantes (2017) INEGI. Información obtenida del portal del INEGI en enero del 2018

Barski O. A., Tipparaju S. M., Bhatnagar A. (2008) The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metabolism Reviews*. 40(4), 553-624

Branlant G. (1982) Properties of an Aldose Reductase from Pig Lens Comparative Studies of an Aldehyde Reductase from Pig Lens. *European Journal of Biochemistry*. 129, 99-104

Chen X., Jiang Z. H., Chen S. y Qin W. (2010) Microbial and bioconversion production of d-xylitol and its detection and application. *International Journal of Biological Sciences*. 6, 834-44

De Freitas Branco R., Chandel K. A. y Da Silva S. S. (2012) Chapter 8 Enzymatic production of xylitol: Current status and future perspectives. *D-xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization*. (p.p.193-202). Londres:Springer.

De Freitas Branco R., Dos Santos J. C. y Da Silva S. S. (2011) A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: Xylitol enzymatic production. *Biomass and Bioenergy*. 35, 3241-3246

Deliang C., Sheung T. F. y Stephen S. M. C. (1998) Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (19), 11429-11435

Fajardo-Ochoa R., Osuna-Castro J. A., Escalante-Minakata P. e Ibarra-Junquera V. (2011) Inmovilización de células y enzimas. *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 3(6), 42-56



- Ghindea R., Csutak O., Stoica I., Tanase I., Tassu V. (2010) Production of xylitol by yeasts. *Romanian Biotechnological Letters*. 15(3), 5217–5222
- Hayman S. y Kinoshita J. H. (1965) Isolation and properties of lens aldose reductase. *The Journal of Biological Chemistry*. 240(2), 877-882
- Homaei A. A., Sariri R., Vianello F., Stevanato R. (2013) Enzyme immobilization: An update. *Journal of Chemical Biology*. 6(4), 185-205
- Industry Experts (2014) *Xylitol, A global market overview*. Estados Unidos de Norte América. Research and markets
- Jedziniak J. A., Chylack L. T., Cheng H., Gillis M. K., Kalustian A. A., Tung W. H. (1981) The sorbitol pathway in the human lens: aldose reductase and polyol dehydrogenase. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 20(3), 314-326
- Jedziniak J. A. y Kinoshita J. H. (1971) Activators and inhibitors of lens aldose reductase. *Investigative Ophthalmology*. 10(5), 357-366
- Lima de Albuquerque T., da Silva Jr. I. J., Ribeiro de Macedo G., Ponte Rocha M. V. (2014) Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review, *Process Biochemistry*. 49, 1779–1789
- Lineweaver, H., Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*. 56 (3), 658–666
- Lowry H. O., Rosebrough J. N., Farr A. L., Randall J. R. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*
- Marks P. A., Szeinberg A., Banks J. (1961) Erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase of normal and mutant human subjects. *The Journal of Biological Chemistry*. 236(1), 10-17
- Mayolo-Deloisa K., Martínez L. M. y Rito-Palomares M. (2012) Chromatographic techniques and their application to studies of conformational changes, stability and refolding of proteins. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 11(3)



Michaelis, L., y Menten, M. L. (1913) The kinetics of the inversion effect. *Biochemische Zeitschrift*. 49, 333-369

Mindnich R. D. y Penning T. M. (2009) Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: Genomics and annotation. *Human Genomics*. 3(4), 362-370

Morales-Cabral, M. G. (2016) Obtención de un método enzimático para la producción de xilitol con una enzima oxido reductasa de origen no microbiano. Tesis de maestría. UMSHN

Mussatto S. I., Chapter 14 Application of Xylitol in Food Formulations and Benefits for Health (2012) En Da Silva S. S. y Chandel Kumar A. (Editores) *D-Xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization*. (p.p.309-322). Londres:Springer

Noltmann E. A., Gubler C. J., Kuby S. A. (1961) Glucose 6-phosphate dehydrogenase (Zwischenferment) I. Isolation of the crystalline enzyme from yeast. *The Journal of Biological Chemistry*. 236(5), 1225-1230

O'Driscoll, K. F. (1976) Techniques of enzyme entrapment in gels. *Methods in Enzymology*, volume XLIV, (Mosbach K., ed), Academic Press, New York, NY, pp. 169-183

Ooi B., Le T. y Markuszewski B. (2002) The effects of glucose on the yeast conversion of xylose into xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida tropicalis*. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 1(3)

Organización Internacional del Azúcar (2012) Edulcorantes alternativos en un contexto de altos precios del azúcar, MECAS

Panesso-Suescún E. A., Calle-Arroyave M. C., Meneses-Gómez E. J. (2012) Xylitol and oral health: uses and possibilities in caries and periodontal disease in populations "PEPE". *University and Health*. 14(2)



Petrash J. M., Harter T. M., Devine S. C., Olins P. O., Bhatnagar A. Liu S., Srivastava S. K. (1992) Involvement of cysteine residues in catalysis and inhibition of human aldose reductase. *The Journal of Biological Chemistry*. 267(34), 24833-24840

Piebler J., Brecht A., Hehl K., Gauglitz G. (1999) Protein interactions in covalently attached dextran layers. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 13, 325-336

Pizarro C., Fernández-Torroba M. A., Benito C., González-Sáiz J. M. (1997) Optimization by experimental design of polyacrylamide gel composition as support for enzyme immobilization by entrapment. *Biotechnology and Bioengineering*. 3(5), 497-506

Rafiqul I. S. M. y Sakinah A. M. M. (2013) Processes for the production of xylitol – A review, *Food Reviews International*. 29(2), 127-156

Reymann J. M., Rondeau J. M., Barth P., Jaquinod M., Van Dorselaer A., Biellmann J. F. (1992) Purification and electrospray mass spectrometry of aldose reductase from pig lens. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1122, 1-5

Sampaio F. C., da Silveira W. B., Chaves-Alves V. M., Passos F. M. L., Coelho J. L. C. (2003) Screening of filamentous fungi for production of xylitol from D-xylose. *Brazilian Journal of Microbiology*. 34, 325–328

Miho S., Masayuki I. y Hideaki Y. (2012) Chapter 5 Microorganisms for Xylitol Production: Focus on Strain Improvement. En Silva, Silvio Silvério y Chandel, Kumar Anuj. (Editores) (2012) *D-Xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization*. (p.p.109-128). Londres:Springer

Secretaría de Economía (2012) *Análisis de la situación económica, tecnológica y de política comercial del sector edulcorantes en México*. México

Sheldon R. A. y van Pelt S. (2013) Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*. 42, 6223-6235



Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. *BRENDA The comprehensive enzyme information system*, consultado en marzo del 2018 <https://www.brenda-enzymes.org/>

Uniprot Consortium. *The Uniprot Knowledgebase*, consultado en mayo del 2017 <http://www.uniprot.org/uniprot/>

Ur-Rehman S., Mushtaq Z., Zahoor T., Jamil A., Anjum-Murtaza M. (2015) Xylitol: A review on bioproduction, application, health benefits, and related safety issues, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 55(11), 1514-1528

Vanegas-Córdoba I. A., Yepes-Pérez M. del S., Ruiz-Villadiego O. S. (2004) Producción de xilitol a partir de levaduras nativas colombianas, *Revista Colombiana de Biotecnología*. 4(2), 31-36

Venkateswar R. L., Goli J. K., Gentela J., Koti S. (2016) Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. *Bioresource Technology*. 213, 299-310

Wichmann R. y Vasic-Racki D. (2005) Cofactor Regeneration at the Lab Scale. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. 92, 225-260

Worthington Enzyme Manual (1993) Worthington, K. y Worthington, V. *Worthington Biochemical Corporation*, consultado en julio del 2017 <http://www.worthington-biochem.com/ZF/assay.html>

