

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE COINMOVILIZACIÓN DE LAS ENZIMAS GLUCOSA OXIDASA Y CATALASA EN UNA MATRIZ MIXTA DE SÍLICE Y ALGINATO PARA LA REDUCCIÓN DEL CONTENIDO DE GLUCOSA EN MOSTOS



Josefina Vila Crespo¹, David del Bosque², José M. Rodríguez Nogales², Encarnación Fernández Fernández², Violeta Ruipérez Prádanos¹

¹ Área de Microbiología, ETS de Ingenierías Agrarias, Universidad de Valladolid. Avda. Madrid 50, 34004 Palencia, España
² Dpto. Ingeniería Agrícola y Forestal, Área de Tecnología de Alimentos, Universidad de Valladolid, Campus de Palencia. ETS de Ingenierías Agrarias. Avda. Madrid 50, 34004 Palencia, España.
e-mail: josefinamaria.vila@uva.es



Resumen

Con el propósito de reducir el contenido de glucosa en mostos, nuestro objetivo fue optimizar la coinmovilización de las enzimas glucosa oxidasa (GOX) y catalasa (CAT) mediante un protocolo de inmovilización por atrapamiento en biocápsulas mixtas de sílice y alginato. Para ello, se realizó un diseño de superficie de respuesta con 4 factores (% de silicato de sodio, % de silicato coloidal, pH y % de alginato), midiendo la concentración de glucosa transformada por peso de inmovilizado, para evaluar la actividad de la GOX, y la concentración de peróxido de hidrógeno transformado por peso de inmovilizado para evaluar la actividad de la CAT.

Introducción

El calentamiento global está generando un mayor desequilibrio entre la maduración tecnológica y fenólica de las uvas. Una mayor temperatura conduce a un incremento de la concentración de azúcares en las bayas que genera un mayor contenido de etanol en el vino resultante. Para hacer frente a este problema, se están investigando diferentes estrategias. Una posible estrategia es el uso del sistema enzimático glucosa oxidasa-catalasa (GOX-CAT) inmovilizado en materiales compatibles con la vinificación para disminuir los niveles de glucosa en el mosto (Ruiz et al., 2018).

La GOX (EC 1.1.3.4) cataliza la oxidación de la β -D-glucosa en presencia de oxígeno a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. La CAT (EC 1.11.1.6) degrada el peróxido de hidrógeno, protegiendo la inactivación de la GOX y regenerando O₂ para la GOX en su microentorno (Dubey et al., 2017). Como materiales de inmovilización compatible con la vinificación se han estudiado los geles mixtos de sílice-alginato (Simó et al., 2017).

Materiales y métodos

Las enzimas utilizadas para la coinmovilización fueron la GOX (Gluzyme® Mono, Novozymes®) y la CAT (Catazyme® Novozymes®)

La concentración de ambas enzimas en la matriz híbrida de inmovilización fue de 300 U/ml.

Las biocápsulas se obtuvieron tras gotear la mezcla de matriz-enzimas sobre una solución de cloruro de calcio 0,2 M (Figura 1 y 2).

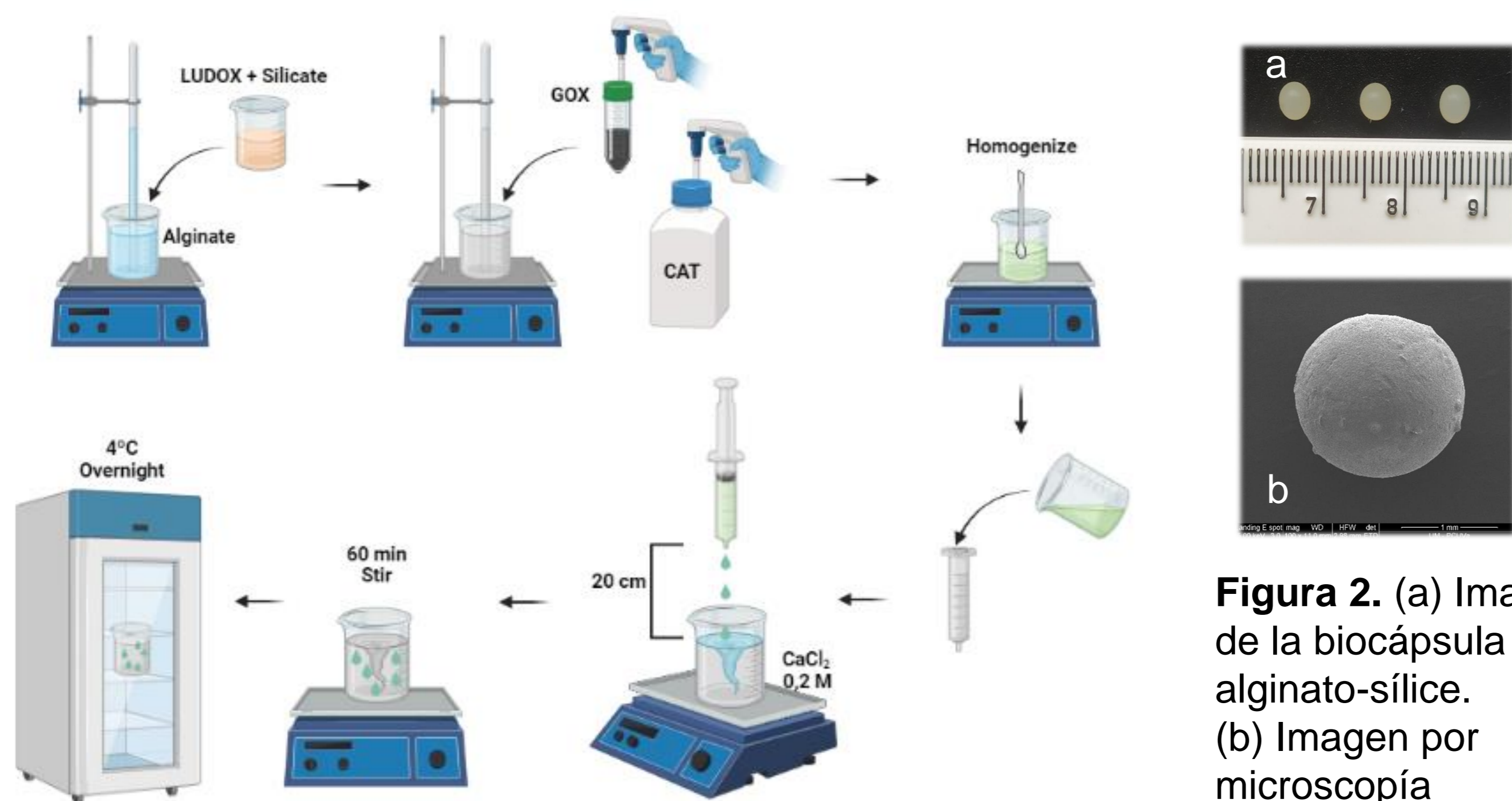


Figura 1. Protocolo de coinmovilización de GOX y CAT.

La optimización de la coinmovilización se llevó a cabo mediante un diseño de superficie de respuesta (compuesto reducido de Draper-y-Lin), con 4 factores, silicato de sodio (0,0-1,3%), silicato coloidal (0,0-15,1), pH (5,0-8,1) y alginato (1,0-2,1%), que generó 23 tipos de biocápsulas.

De cada una de estas variantes, se evaluó su capacidad para reducir la concentración de glucosa a partir de una solución inicial de β -D-glucosa 20 mM en tampón acetato a pH 5,1 tras 90 min, como su capacidad para reducir la concentración de H₂O₂ a partir de una solución de H₂O₂ al 0,05% en tampón fosfato a pH 7,0 durante 2 min.

Ambos ensayos se realizaron a 25°C y en agitación a 150 rpm. La medición de glucosa se llevó a cabo mediante un kit enzimático y la medida de peróxido de hidrógeno se realizó mediante medición a 240 nm.

Agradecimientos: Los autores agradecen a la empresa Novozymes por el suministro de las enzimas.

Resultados

De los resultados de las 23 variantes de biocápsulas se obtuvo un modelo ajustado ($\alpha = 0,05$) para dos variables respuesta;

- La concentración de glucosa transformada por peso de inmovilizado (**Cglucosa/peso**) para evaluar la actividad de la GOX, donde el estadístico R² indicó que el modelo empleado fue adecuado, ya que se consiguió explicar el 95,88% de la variabilidad de los datos.

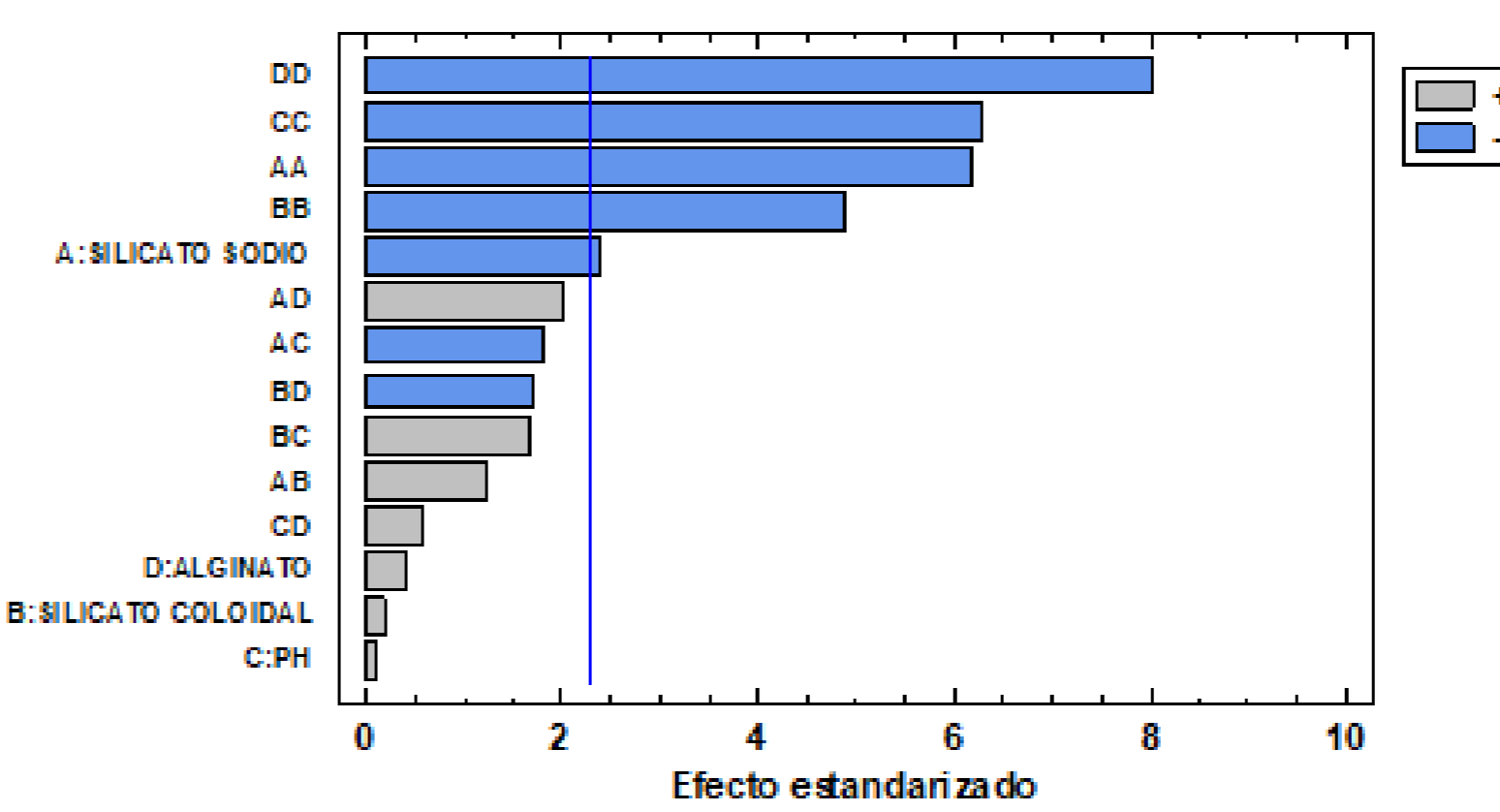


Figura 3 Diagrama de Pareto estandarizado, que muestra que el factor silicato de sodio, así como los cuadrados de los cuatro factores experimentales fueron significativos.

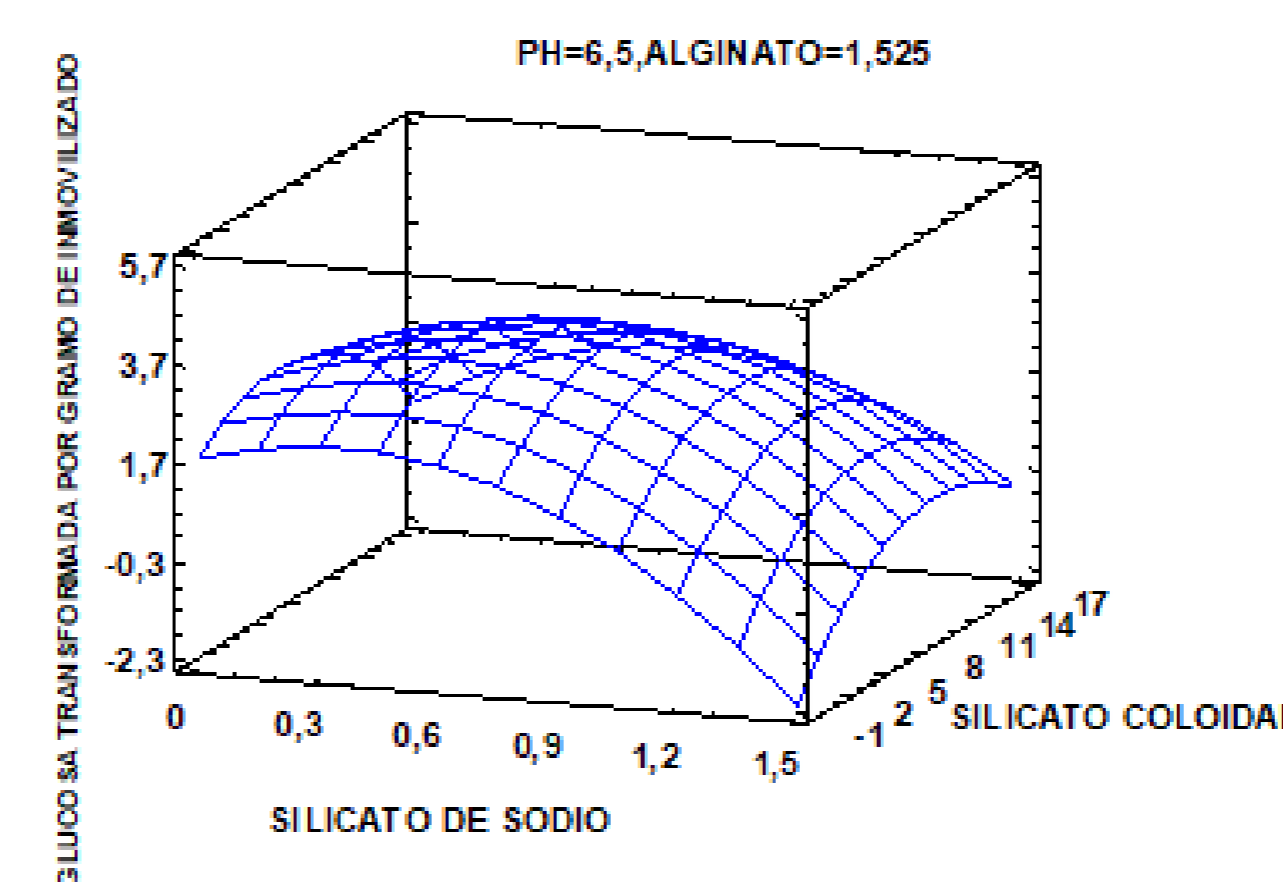


Figura 4 muestra la superficie de respuesta para la Cglucosa/peso en función de la concentración de silicato de sodio y silicato coloidal, donde se observa un valor óptimo para la inmovilización de la GOX a 0,49% de silicato de sodio, 7,38% de silicato coloidal, pH de 6,57 y 1,51% de alginato.

- La concentración de peróxido de hidrógeno transformado por peso de inmovilizado (**Cperóxido/peso**) para evaluar la actividad de la CAT donde el modelo mostró un valor del estadístico R² de 84,57%, algo inferior al obtenido para la primera variable respuesta.

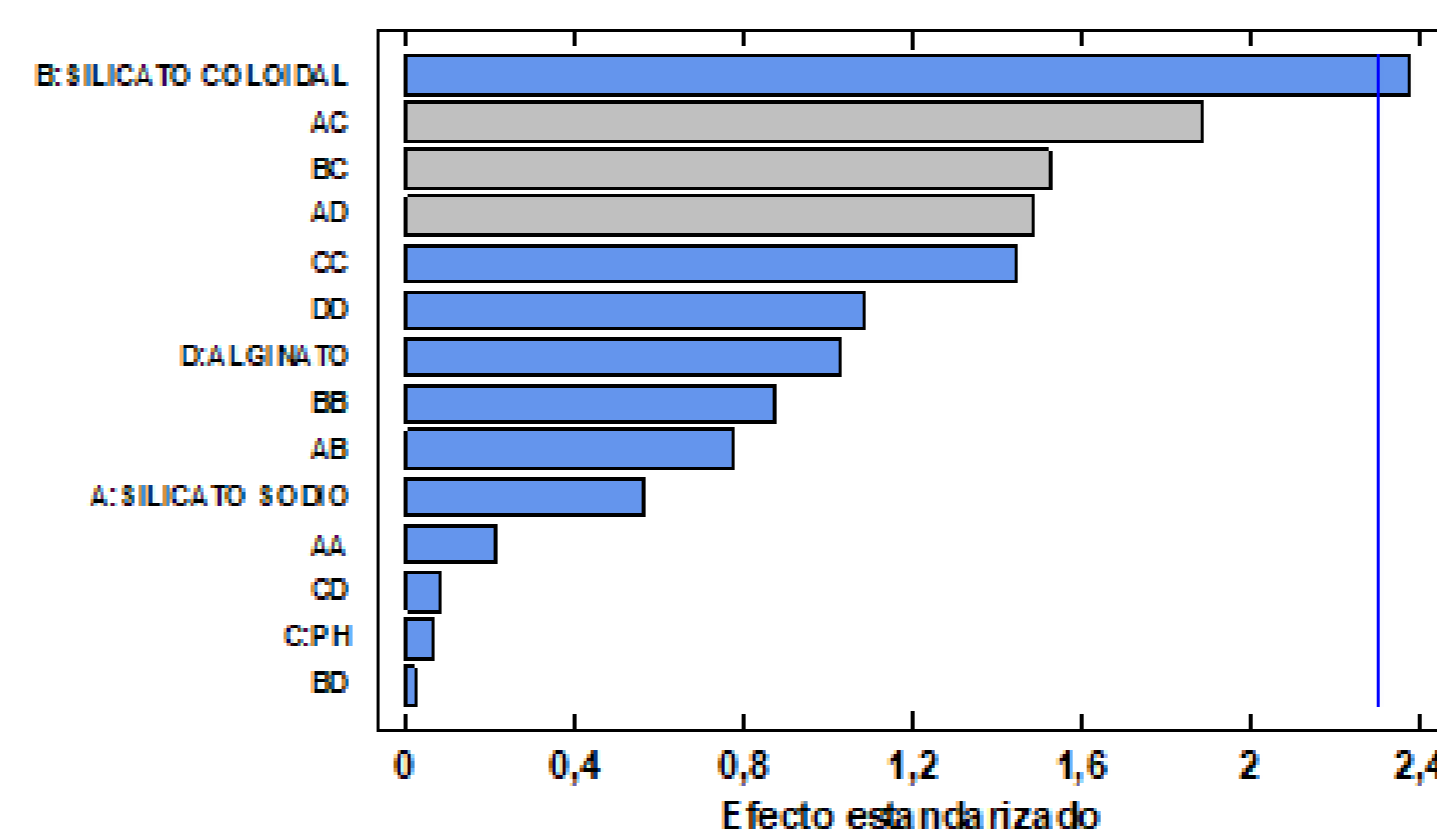


Figura 5 Diagrama de Pareto estandarizado para el peróxido de hidrógeno transformado por peso de inmovilizado donde se observa que sólo el factor silicato coloidal tuvo un efecto significativo y negativo en la actividad de la CAT. De este modo, al incrementarse la concentración de silicato coloidal la Cperóxido/peso disminuye.

Conclusiones

El resultado de nuestro trabajo muestra tanto la capacidad real de coinmovilizar el sistema enzimático GOX-CAT por atrapamiento en biocápsulas de sílice-alginato, así como las variables que influyen en el proceso de coinmovilización de estas enzimas.

En base a estos resultados y con el objetivo primario de maximizar la transformación de la glucosa, se han seleccionado las condiciones óptimas de inmovilización de la GOX para coinmovilizar ambas enzimas.

Bibliografía

Dubey, M. K., Zehra, A., Aamir, M., Meena, M., Ahirwal, L., Singh, S., Shukla, S., Upadhyay, R. S., Bueno-Mari, R., & Bajpai, V. K. (2017). Improvement strategies, cost effective production, and potential applications of fungal glucose oxidase (GOD): current updates. *Frontiers in Microbiology*, 8(Jun), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01032>

Ruiz, E., Busto, M. D., Ramos-Gómez, S., Palacios, D., Pilar-Izquierdo, M. C., & Ortega, N. (2018). Encapsulation of glucose oxidase in alginate hollow beads to reduce the fermentable sugars in simulated musts. *Food Bioscience*, 24, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.06.004>

Simó, G., Vila-Crespo, J., Fernández-Fernández, E., Ruipérez, V., & Rodríguez-Nogales, J. M. (2017). Highly efficient malolactic fermentation of red wine using encapsulated bacteria in a robust biocomposite of silica-alginate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(25), 5188–5197. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01210>