

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).

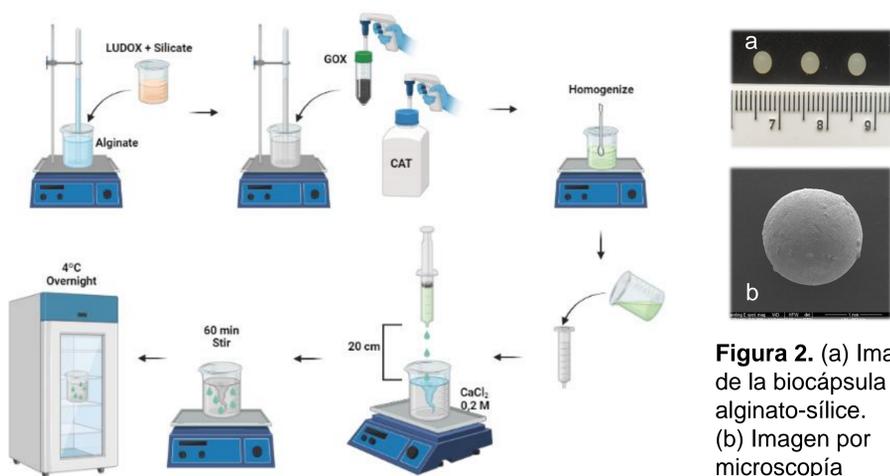


Figura 1. Protocolo de coinmovilización de GOX y CAT.

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.

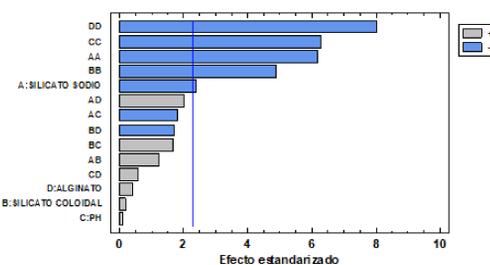


Figura 3 Diagrama de Pareto estandarizado, que muestra que el factor silicato de sodio, así como los cuadrados de los cuatro factores experimentales fueron significativos.

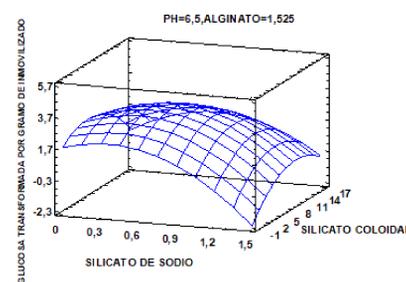


Figura 4 muestra la superficie de respuesta para la Cglucosa/peso en función de la concentración de silicato de sodio y silicato coloidal, donde se observa un valor óptimo para la inmovilización de la GOX a 0,49% de silicato de sodio, 7,38% de silicato coloidal, pH de 6,57 y 1,51% de alginato.

- 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.

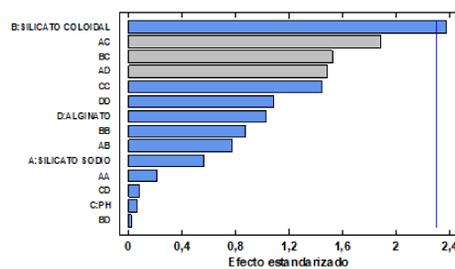


Figura 5 Diagrama de Pareto estandarizado para el peróxido de hidrógeno transformado por peso de inmovilizado donde se observa que sólo el factor silicato coloidal tuvo un efecto significativo y negativo en la actividad de la CAT. De este modo, al incrementarse la concentración de silicato coloidal la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