

IMPORTANCIA DEL AGUA EN LA BIOCATALISIS EN MEDIOS DE BAJA HUMEDAD: UNA REVISIÓN CRÍTICA

Carmina Montiel, Mauricio Mora, Sandra Pérez, Mariano García-Garibay^a, Eduardo Bárzana

Facultad de Química, Lab. E-314

UNAM, México D.F. 04510

Fax: 5622-5345

^aDepartamento de Biotecnología

UAM-Iztapalapa

México D.F.

*ebg@servidor.unam.mx

Palabras clave: Actividad acuosa, hidratación de proteínas, medio orgánico

Biocatálisis en medios orgánicos

El año próximo se cumplen los 20 primeros años del artículo publicado en Science (Zaks y Klibanov, 1984) y que es considerado el punto de partida de una nueva rama de la biotecnología conocida como "Biocatálisis en Medios no Acuosa". Su importancia parte de haber sido el primer estudio sistemático donde se demostró sin ambigüedades que, contra lo esperado, las enzimas eran capaces de ejercer su poder catalítico en solventes orgánicos con eficiencias no despreciables, si bien menores a las presentadas en medios acuosos. Sin embargo, en poco tiempo se detectaron otras ventajas compensatorias que volvieron sumamente atractivo el enfoque empleado por el grupo de Klibanov. En particular, destacaron como elementos distintivos de estos sistemas la capacidad de llevar a cabo reacciones de síntesis opuestas a las de hidrólisis (que no ocurrían por la falta de agua en el medio), una mayor estabilidad a la termoinactivación del catalizador, y, desde un punto de vista operativo, el que resultaba innecesario llevar a cabo la inmovilización de las enzimas en soportes por métodos complejos, como el atrapamiento en geles o la unión física a matrices sólidas.

En poco tiempo la biocatálisis en solventes orgánicos fue extendida a otros sistemas con niveles restringidos de humedad que incluyeron los fluidos supercríticos (y en particular el CO₂) (Hammond et al, 1986, Randolph et al., 1986), y las reacciones mediadas por enzimas para sustratos gaseosos (Barzana et al., 1987 y 1989). Como consecuencia el número de grupos en todo el mundo que se adentraron en este campo, así como el número de publicaciones científicas que generaron, creció de manera exponencial durante los 10 años posteriores, según se puede observar en la Figura 1.

El papel del agua

Desde los primeros trabajos de Klibanov (Zaks y Klibanov, 1984 y 1985) resultó claro que el agua representaba un componente crítico para una catálisis efectiva. Así, se reconocía que el agua participa en todas las interacciones no covalentes que mantienen a la proteína en su conformación nativa además de funcionar como lubricante de la dinámica molecular necesaria (Zaks, 1991). Sin embargo el gran descubrimiento fue el determinar que el agua jugaba un papel dual y opuesto: por una parte era un potente promotor

de la velocidad de reacción, y por el otro actuaba como un peligroso inactivador, especialmente a temperaturas superiores a la óptima para la enzima. Aún más, este doble efecto ocurría en una ventana de concentraciones de agua muy estrechas. Por ejemplo, el efecto benéfico se observaba en un pequeño margen de humedad del orden de 0.2-1.5%. Contrariamente en un medio totalmente anhidro o a niveles de agua superiores a 5% no se observaba la reacción.

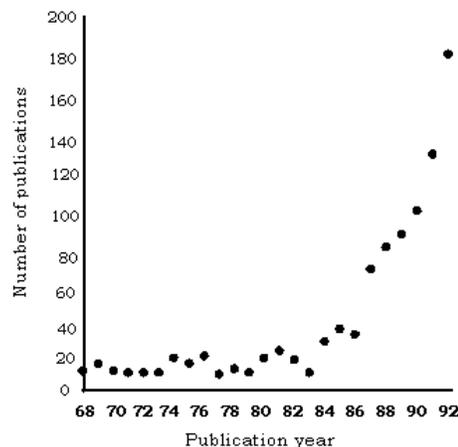


Figura 1. Publicaciones relacionadas con el uso de enzimas en medios no acuosos (Sih et al., 1996)

Estas observaciones llevaron a recomendar que los solventes o medios de reacción hidrofóbicos fueran primeramente saturados con agua en antelación al inicio de la reacción.

Antecedentes de otras disciplinas

Sin embargo, el empirismo de las metodologías de hidratación de solventes rápidamente llevó a la búsqueda de explicaciones, modelos y mecanismos. Y mucho de esto estaba disponible en modelos y experiencias de otras disciplinas y áreas del conocimiento científico. Por ejemplo, la hidratación progresiva de proteínas se venía estudiando desde los años 70's (Kuntz y Kauzman, 1974) con el mayor rigor científico y teniendo como incentivo su relevancia práctica en la preparación de productos para consumo humano y pecuario, como vacunas, hormonas, otros medicamentos y alimentos en general. A este respecto,

destaca el impecable trabajo pionero de Rupley y Careri (1983) que permitió establecer los niveles mínimos de hidratación de la lisozima del huevo para alcanzar una estructura molecular activa. Asimismo, mediante sondas de resonancia se demostró una estrecha correlación entre los 3 componentes de la catálisis: hidratación, movimientos moleculares y sitio activo.

Otro concepto bastante conocido y empleado por ese tiempo por los químicos y tecnólogos de alimentos fue el de la actividad acuosa (A_w). Curiosamente, parecía que los enzimólogos encontraron en este parámetro termodinámico la respuesta a muchas de sus observaciones. Su importancia es notoria aún hoy en día si se cuenta el gran número de reportes y publicaciones donde se estudian los efectos y comportamientos de enzimas en función de la A_w . (Prior, 1979; Scott, 1957; Troller and Christian, 1978).

El A_w se representa por la siguiente ecuación:

$$A_w = \gamma_w x_w = p/p_0$$

donde γ_w es el coeficiente de actividad del agua, x_w es la fracción mol del agua en la mezcla o solución, p es la presión parcial del agua en la muestra donde se realiza la medición y p_0 es la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura (o sea que la actividad acuosa es equivalente a la humedad relativa de equilibrio manejada en tablas psicrométricas, que normalmente se expresa como porcentaje). La siguiente tabla expresa las A_w típicas de productos alimentarios así como la manera de obtener cámaras equilibradas a una A_w fija con soluciones saturadas de sales.

Producto	γ_w	x_w	A_w
Solución saturada de LiCl	0.19	0.57	0.11
Solución saturada de MgCl ₂	0.83	0.40	0.33
Solución saturada de SrCl ₂	1.03	0.69	0.71
Solución saturada de BaCl ₂	1.18	0.76	0.90
Pan	-	35	0.96
Queso	-	37	0.97
Frutas secas (e.g. pasitas)	-	18	0.76
Carne cruda	-	60	0.98
Pasta seca	-	12	0.50
Pasta cocida	-	72	0.97
Conservas (e.g. jalea)	-	28	0.88

Tabla 1. Valores representativos de diferentes productos alimentarios y sales saturadas representativas (tomado de Chaplin, 2003)

En general, el A_w ha sido y es considerado un parámetro crítico para el control del deterioro de productos alimentarios causados por microorganismos. Por ejemplo, las bacterias tienden a ser inhibidas en su crecimiento a valores menores a 0.9 (equivalente a una solución al 43% w/w de sacarosa), mientras que los hongos mantienen viabilidad a estos

niveles. Se supone que un A_w de 0.6 es el límite para el crecimiento de microorganismos, sin embargo las esporas pueden mantenerse en latencia a estas condiciones. El uso empírico de bajas A_w 's para la conservación de los alimentos explica el uso ancestral de los métodos de secado, salado o confitado con sacarosa. Por lo mismo y en contraparte, los sistemas de producción biotecnológica en fase sólida (Viniegra-González et al, 2003), o las aplicaciones de la biotecnología ambiental para la degradación de vapores y gases indeseables ocurre mediante un control preciso del A_w en los bioreactores a niveles altos que maximicen el metabolismo microbiano (García Peña et al., 2001).

Por el lado de productos alimentarios semisólidos, no solo los microorganismos pueden causar cambios indeseables. Por ejemplo reacciones enzimáticas como la lipólisis o las reacciones de oscurecimiento ocurren a A_w 's bajas. De hecho, en los casos citados el deterioro enzimático se incrementa al disminuir el nivel de hidratación. Por otra parte, es de sobra conocido que los sistemas enzimáticos resisten mejor la termoinactivación en condiciones de baja humedad, siendo capaces de expresarse una vez que son expuestos a mayor humedad y enfrentados a sus sustratos (Richardson y Hyslop, 1985). Esto es el caso de las semillas, las esporas o las plantas de los desiertos. Interesantemente, algunos seres vivos emplean recursos biosintéticos (azúcares, polioles, etc.) para abatir la A_w de su ambiente y con ello resistir condiciones ambientales extremas. Estas enseñanzas de la naturaleza son usadas con frecuencia para conservar cepas microbianas o preparados de proteínas con actividad biológica en soluciones de glicerol, trehalosa, o compuestos hidrofílicos equivalentes.

A pesar de que existía un conocimiento preliminar pero bien sustentado y documentado sobre la hidratación de proteínas, y en particular de enzimas, y del papel unificador que ofrecía el empleo del parámetro actividad acuosa desarrollado por los tecnólogos de alimentos, la nueva enzimología en medios restringidos de agua no parece haber dado el justo reconocimiento a dicho trabajo pionero. Quizá la nueva contribución más importante fue extender dichos conceptos a los solventes orgánicos, material que por razones obvias no había sido de interés alimentario. Los métodos empleados para alcanzar un determinado A_w fueron, sin embargo idénticos a los conocidos (i.e. equilibrio de fases en sistemas cerrados tipo desecador). En particular los trabajos de Halling permitieron hacer cálculos predictivos importantes para todo tipo de solventes incluidos los hidrofílicos (Bell, et al., 1995).

La estructura del agua y sus consecuencias.

Hasta años recientes al hablar del agua en medios orgánicos se pensaba en una dispersión molecular verdadera. Para el caso de medios hidrofílicos estos estabilizaban a las moléculas de agua mediante fuerzas de dispersión del tipo de los puentes de hidrógeno, mientras que en medio hidrofóbicos ocurrían fuerzas difusas que permitían la

inserción de pequeños paquetes de agua en lo que conformaba un especie de suspensión molecular estable. Sin embargo, avances recientes han permitido demostrar que el agua es una molécula extraordinaria con una enorme capacidad de agregarse en formas diferentes y ordenadas que minimizan la energía de los sistemas donde se sitúan. En particular los trabajos de difracción de rayos X llevados a cabo por diversos grupos han determinado que dichos arreglos ordenados pueden alcanzar estructuras de icosaedros con 3 nm de diámetro y conformados por 280 moléculas (20 unidades en forma de tetraedros con 14 moléculas cada una) (Chaplin, 2003). Este modelo se presenta en la figura 2. De hecho, cada una de estas 280 moléculas del icosaedro forma parte de una variedad de subestructuras donde cada molécula de agua participa en 4 puentes de hidrógeno: 2 como donador y 2 como aceptor (Chaplin, 2000). Aún más, la cavidad interior de este conglomerado de agua estructurada puede alojar o encapsular un soluto de tamaño adecuado.

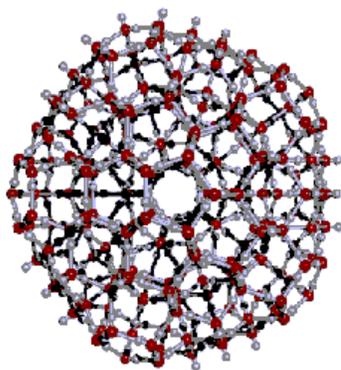


Figura 2. Modelo de agua estructurada en forma de icosaedro (Chaplin, 2000)

Se propone que dicha estructura fluctúa entre una forma expandida y otra colapsada, cuyo equilibrio está dictado por la presencia de otros componentes en el medio y de acuerdo a la ecuación siguiente:



Donde ES presenta una menor densidad que CS, lo que afecta de manera fundamental una diversidad de propiedades como la capacidad de solubilización, tensión superficial, etc. Por ejemplo, esta teoría explica el comportamiento de la serie de Hofmeister como precipitantes o solubilizantes de proteínas en función del efecto estabilizador que sobre alguna de las estructuras planteadas (ES o CS) presenta el ión en cuestión. Sin duda, el avance que en los próximos tiempos tenga este conocimiento del agua estructurada en medios orgánicos permitirá explicar con mejor detalle los efectos asociados a la actividad acuosa en la catálisis enzimática. En este sentido es relevante y gratificante apreciar el trabajo conjunto de físicos, químicos y biólogos para alcanzar estos objetivos.

Reacciones a altas temperaturas

Estudios previos del grupo de investigación han demostrado que es factible llevar a cabo la síntesis de glicósidos con actividad surfactante a 90°C mediada por una glicosidasa hipertermofílica (ver figura 3) y que la reacción es función directa del contenido de agua en el sistema (García Garibay et al., 2000a).

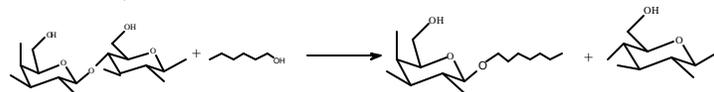


Figura 3. Reacción de transglicosidación de lactosa

Por otro lado, a partir del método de Bell fue factible demostrar que la isoterma de adsorción en función de la actividad acuosa para una β -galactosidasa de *E. coli*. (García Garibay et al., 2000b) fue similar a la obtenida para lisozima reportada previamente (Rupley et al., 1972). Los resultados en sistemas a altas temperaturas permitían observar que la enzima presentaba una rapidez de conversión inicial alta que decaía al poco tiempo, por lo que se estudio el comportamiento del agua en el sistema con más detalle. De lo anterior se pudo observar que la distribución de las “partículas” de agua se modifica lentamente a lo largo del tiempo de reacción, lo que acarrea variaciones importantes en la cinética del proceso. En otras palabras, la hidratación (y separación de fases posterior) resultó ser cinéticamente estable pero termodinámicamente inestable. Esto se puede observar en la figura 4.

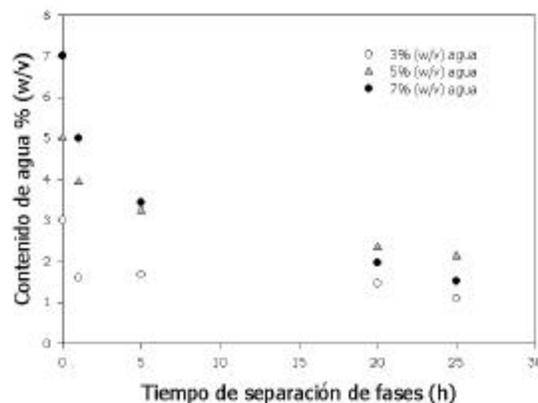


Figura 4. Separación del agua en heptanol a 90°C

Mediante un monitoreo constante de la reacción en este medio y en presencia de diferentes sustancias que estabilizan al agua en dispersión (cosolventes y surfactantes) se observaron diferencias en la agregación de pequeñas partículas, si bien su impacto no fue notable en la rapidez de la reacción. Estudios adicionales parecen sugerir que en paralelo a la segregación del agua ocurren reacciones de Maillard que inactivan a la enzima (resultados no presentados). Es necesario profundizar en estos estudios para conocer el paso limitante de la reacción que previene el mantenimiento de una actividad sostenida.

Estudios paralelos orientados a la hidrólisis enzimática de ésteres industriales de luteína han demostrado, contra lo

esperado, que la actividad enzimática (de hidrólisis) se ve disminuida según se incrementa la actividad acuosa del sistema. Bajo los modelos descritos, es posible que la forma inmovilizada de esta lipasa desestabilice las formas agregadas de agua que son esenciales para la catálisis, y que estas son suficientes a bajas A_w como para aportar el reactivo necesario para la hidrólisis, así como el agua de hidratación necesaria para la catálisis enzimática.

Conclusiones

La actividad acuosa (A_w) ha sido empleada a partir de los 90's como el parámetro crítico que determina la cantidad de agua disponible para que ocurra una reacción enzimática en medios de bajo contenido de agua. Este parámetro termodinámico fue desarrollado en los 60's por científicos dedicados a la conservación de alimentos y ha probado ser universal como regulador de la expresión de actividades biológicas diversas (enzimas o crecimiento microbiano). Nuestros resultados muestran, sin embargo, que independientemente del equilibrio termodinámico pueden existir microambientes dinámicos que juegan un papel importante en el curso de la reacción. Resulta por lo tanto de interés el conjuntar las experiencias de la enzimología en solventes orgánicos con los nuevos conceptos de estructuración del agua. Las nuevas técnicas analíticas de difracción de rayos X y resonancia magnética permitirán conocer a nivel microscópico los eventos ocurrientes durante la hidratación de enzimas al igual que durante la reacción. Este conocimiento será de particular relevancia según vayan progresando las reacciones de interés industrial que resulten de la explotación de nuevas enzimas hipertermofílicas que, por su robustez y resistencia al deterioro, aproximan cada vez más la catálisis enzimática a la catálisis heterogénea de los procesos químicos y petroquímicos.

Agradecimiento

Partes de este trabajo han sido financiadas por los proyectos CONACYT 38583-B y DGAPA-UNAM IN243602, así como las becas de posgrado otorgadas a los autores Montiel y Mora .

Bibliografía

- Bázquez, E., Karel, M. y Klíbanov, A.M. (1987). Enzyme catalyzed gas phase reactions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 15, 25-34.
- Bázquez, E., Karel, M. Y Klíbanov, A.M. (1989). Enzymatic oxidation of ethanol in the gaseous phase. *Biotechnol. Bioeng.* 34, 1178-1185.
- Bell, G., Halling, P., Moore, B., Partridge, J., y Rees, D. (Biocatalyst behavior in low-water systems. *TIBTECH* 13, 468-473.
- Chaplin, A. F. (2003). www.sbu.ac.uk/water/index.html
- Chaplin, A. F. (2000). A proposal for the structuring of water, *Biophys. Chem.* 83, 211-221. y
- García-Garibay, M., López-Munguía, A. y Bázquez, E. (2000a). Alcoholysis and reverse hydrolysis reactions in organic one-phase

system with a hyperthermophilic β -glycosidase. *Biotechnol. Bioeng.* 69, 627-632.

- García Garibay, M., López Munguía, A. and Bázquez, E. (2000b). Effect β -galactosidase hydration on alcoholysis reaction in organic one-phase system. *Biotechnol. Bioeng.* 70, 647-653.

- García-Pena E.I, Hernández S., Favela-Torres E., Auria R, Revah, S. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 76, 61-69.

- Hammond, D.A., Karel, M., Klíbanov, A.M. y Krukonis, V.J. (1985). Enzymatic reactions in supercritical gases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 11, 393-400.

- Kuntz, I.D., y Kauzmann, W. (1974). Hydration of proteins and polypeptides. *Advan. Protein Chem.* 28, 239-345.

- Labuza, T.P. (1968). Sorption phenomena in foods. *Food Technol.* 22(3), 15-24.

- Prior, B.A. (1979). Measurement of water activity in food: a review. *J. Food Protection* 42, 668-674.

- Randolph, T.W., Clark, D.S., Blanch, H.W. y Prausnitz, J.M. (1985). Enzymatic catalysis in a supercritical fluid. *Biotechnol. Lett.* 7, 325-328.

- Richardson, T. y Hyslop, D. (1985). Enzymes. En: *Food Chemistry*. Fennema, O.R. M. Dekker, New York. 372-476.

- Rupley, J.A., Gratton, E. y Careri, G. (1983) Water and globular proteins. *Trends Biochem. Sci.* 8, 18-22.

- Scott, W.J. (1957). Water relations of food spoilage microorganisms. *Advan. Food Res.* 7, 83-127.

- Sih, C.J., Girdaukas, G., Chen, C.S. y Sih, J.C. 1996. "Enzymatic resolutions of alcohols, esters and nitrogen-containing compounds". Capítulo 10, en *Enzymatic Reactions in Organic Media*. A.M.P Koskinen y A.M. Klíbanov, Ed. Blackie, Glasgow.

- Troller, J.A. y Christian, J.H.B. (1978). Water activity and food. Academic Press, New York.

- Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar C.N, Romero-Gómez SD, Díaz-Godínez G, Augur C (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem Eng J.* 13, 157-167.

- Zaks, A. (1991). Enzymes in organic solvents. Capítulo 8, en *Biocatalysts for Industry*. Dordick, J. Ed. Plenum, New York.

- Zaks, A. y A.M. Klíbanov. (1984). Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science*, 224, 1249-1251.