

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA INMOVILIZACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE α -AMILASA

Sabariz Alves, Lucía Belén – Vazquez Montalbetti, María Emilia – Chevarría, Gastón Alejandro
Estudiantes de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Villa
María. E-mail: luciasabariz@hotmail.com – emi_v11@hotmail.com – gaston_che27@hotmail.com

TUTORAS: Dra. Montenegro, Mariana Angélica – Ing. Vanden Braber, Noelia

Resumen

Con objeto de estudiar el comportamiento cinético de la enzima α -amilasa libre e inmovilizada se realizó la hidrólisis de una solución de almidón y se midió la velocidad de reacción siguiendo la variación de concentración de almidón, por reacción con yodo en solución de yoduro de potasio. La inmovilización se realizó en perlas de quitosano. Los parámetros cinéticos resultaron los siguientes: K_M de 1,712 g/L y $V_{MÁX}$ de 0,00851 g/L.s para la enzima libre mientras que para la enzima inmovilizada, K_M de 12,34 g/L y $V_{MÁX}$ de 0,00087 g/L.s. Los valores de actividad enzimática obtenidos para la enzima libre e inmovilizada fueron de 1,8661 y 0,0547 g alm/g enz·min, respectivamente. Debido a la simplicidad del método y buenos rendimientos obtenidos, el quitosano resulta una matriz potencial para la inmovilización de α -amilasa a escala industrial.

Palabras clave: α – amilasa, Inmovilización, Quitosano, Actividad enzimática.

1. Introducción

El almidón es la forma principal de reservas de carbohidratos en los vegetales. Consiste de una mezcla de dos polisacáridos: amilosa y amilopectina, ambos polímeros de α -D-Glucosa. Las moléculas de amilosa consisten típicamente de 200 a 20000 unidades de glucosa unidas por enlaces α – 1,4 que se despliegan en forma de hélice en una estructura lineal. La amilopectina se distingue de la amilosa por ser muy ramificada. Cadenas laterales cortas conteniendo aproximadamente 30 unidades de glucosa se unen con enlaces α – 1,6 cada veinte o treinta unidades de glucosa a lo largo de las cadenas principales¹.

El almidón puede desdoblarse en una variedad de monosacáridos mediante la hidrólisis enzimática por acción de un grupo de enzimas denominadas *amilasas*. Existen dos tipos principales de amilasas: α y β , que se diferencian por el modo de ataque sobre el sustrato. La α - *amilasa* corresponde a una *endoenzima*, ya que actúa sobre los enlaces α (1-4) glucosídicos, formando oligosacáridos, pero no puede desdoblar las uniones α (1-6) de la amilopectina. La β - *amilasa* es una "*exoenzima*" que tampoco puede desdoblar los enlaces α (1-6) de la amilopectina. Por esta razón las moléculas de amilopectina solo pueden ser hidrolizadas parcialmente por esta enzima quedando restos de un peso molecular bastante elevado².

Las enzimas pueden usarse libres en solución, o pueden ser inmovilizadas en un soporte insoluble por diferentes métodos como: atrapamiento, adsorción en superficie, unión por enlaces iónicos o covalentes. Las principales ventajas del uso de enzimas inmovilizadas sobre las enzimas libres son, una mayor facilidad de separación de reactantes, mínima pérdida de la enzima con los productos permitiendo su reutilización en varios ciclos de reacción y la posibilidad de controlar mejor los tiempos de reacción³.

Uno de los soportes utilizados para inmovilización de enzimas es el quitosano, un polisacárido compuesto de unidades glucosamina unidas por enlaces α -1,4 que se obtiene por desacetilación de la quitina con un tratamiento drástico alcalino. Es ideal para tal fin debido a sus características como hidrofilia, biocompatibilidad, biodegradabilidad y propiedades antibacterianas. La inmovilización de enzimas en el quitosano se puede lograr por medio de la reacción de glutaraldehído entre los grupos amino libres de quitosano y la molécula de enzima para formar enlaces covalentes⁴.

Para estudiar la cinética de las reacciones enzimáticas se emplea el modelo de Michaelis – Menten (Ec. 1).

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

donde V es la velocidad inicial (g almidón degradado / L.s), $V_{MÁX}$ es la velocidad máxima alcanzable con la concentración dada de enzima, [S] es la concentración de almidón inicial (g/L), y K_M es la de constante Michaelis – Menten que describe la afinidad de la enzimas por el sustrato⁵.

Para una mejor interpretación de los datos experimentales, es costumbre utilizar la ecuación de Lineweaver-Burk (Ec. 2), que corresponde a la gráfica doble recíproca de la ecuación de Michaelis – Menten⁵.

$$\frac{1}{[V]} = \frac{1}{v_{max}} - \frac{K_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (2)$$

La actividad enzimática se define como la cantidad de sustrato degradado por unidad de masa de enzima y por unidad de tiempo (Ec. 3).

$$UA = \frac{[S]_o - [S]}{E_o \cdot (t - t_o)} \quad (3)$$

donde $[S]_o$ es la concentración inicial de sustrato (g/L), [S] la concentración de sustrato en el tiempo t, E_o la concentración de enzima (g/L) y (t - t_o) el tiempo de reacción (s)⁶.

2. Materiales y Métodos

2.1 Reactivos y equipamiento.

Para las determinaciones se utilizaron los siguientes reactivos: Enzima α -amilasa Spezyme Alpha Enzyme de Genencor. Almidón, Yodo, Ácido clorhídrico, Hidróxido de potasio y Sal sódica de EDTA de Anedra. Yoduro de Potasio, Acetato de Sodio, Cloruro de Sodio y Sulfato cúprico pentahidrato de Cicarelli. Quitosano peso molecular medio de Fluka. Albúmina de suero bovina de Sigma. Glutaraldehido al 50% de Hubei Xinjing New Material Co LTD China

Se usó el siguiente equipamiento: pHmetro Hanna, Baño Termostático HH-S, Balanza Analítica OHAUS, Cronómetro, Agitador magnético, Espectrofotómetro UV-Vis Metrolab 1700.

2.2 Preparación de perlas en Quitosano.

Se preparó una solución de quitosano al 1,5% en ácido acético al 1,5%, calentando a 60 °C con agitación continua hasta lograr la disolución completa del quitosano. Esta solución se toma con una jeringa y se dejan caer las gotas en hidróxido de potasio 1 M para obtener perlas rígidas de tamaño uniforme.

2.3 Inmovilización de α -amilasa sobre perlas de quitosano.

Para la activación de las perlas de quitosano se dejaron reposar las mismas en glutaraldehido al 5% durante 24 hs. A continuación las perlas se lavaron con el buffer acetato repetidas veces para eliminar los restos de glutaraldehido. Las perlas fueron sumergidas en una solución de enzima comercial de dilución 1:30 y se almacenaron a 4 °C durante un lapso de 24 hs. Las perlas finalmente se almacenaron en buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,6 a 4 °C.

2.4 Determinación del % de inmovilización.

Para determinar la cantidad de enzima inmovilizada se utilizó el método de Biuret que se basa en la formación de un complejo coloreado entre Cu^{+2} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico⁷. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren. Para la preparación de 500 mL de Reactivo de Biuret se utilizaron 3,35 g de disódica de EDTA, 1,9 g de sulfato cúprico pentahidrato, y 100 mL solución de Hidróxido

de Sodio 5 M. Para determinar la absorbitividad (ϵ) se utilizaron soluciones de albúmina de concentraciones conocidas como patrón de referencia. La absorbancia se midió a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción del complejo ($\lambda_{\max} = 545 \text{ nm}$).

2.5 Determinación de la cinética enzimática

Se realizaron una serie de experimentos de hidrólisis variando la concentración inicial de almidón entre 1 y 0.5 g/L a concentración de enzima, pH y temperatura constantes. Se determinó el almidón presente en la muestra utilizando una solución de trioduro (iodo-ioduro). Ambos reaccionan produciendo un color púrpura profundo. Al hidrolizarse el almidón en monómeros de carbohidrato, el color del complejo desaparece.

Se prepararon 10 mL de disoluciones de almidón de concentración deseada a partir de la disolución madre al 0,5% (5 g/L) completando el volumen con buffer acetato 50mM, pH 5,6. La reacción de hidrólisis comienza con el agregado de la enzima (20 μL de dilución 1:10) a tiempo cero. Mientras se incubaba la mezcla de reacción a 37 °C, de la misma se tomaron 500 μL en tiempos establecidos y se transfirieron a un tubo de ensayo que contenía 1mL de HCl 0.5 N para frenar la reacción. Luego se llevó a agua en ebullición durante 2 min y en seguida se enfrió en baño de hielo. Se añadieron 3,4 mL de agua destilada y 100 μL de solución de I_3 al 2% para la formación del complejo coloreado iodo-almidón (no hidrolizado). Transcurridos 10 min, se leyó la absorbancia a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción del complejo ($\lambda_{\max} = 530 \text{ nm}$).

Para los ensayos con enzima inmovilizada se realizó una segunda serie de experimentos, con la diferencia de que esta vez se colocó una perla de quitosano con α -amilasa inmovilizada, en lugar de los 20 μL , para 10 mL de solución inicial, de manera tal de tener una concentración equivalente de enzima que la empleada en los ensayos realizados con enzima libre. Esta cantidad fue determinada a partir de los valores de concentración de enzima inmovilizada por perla.

2.6 Curva de calibración para el almidón.

Se determinó el espectro de absorción del complejo iodo-almidón mediante un barrido espectral para determinar el pico de absorbancia y utilizar este valor para las mediciones posteriores. Con el objeto de convertir los valores de absorbancias a concentraciones de almidón se realizó la curva de calibración. Para la misma se formó el complejo almidón-iodo con soluciones de concentraciones perfectamente conocidas de almidón y se midieron las absorbancias de estas soluciones después de 10 min de la adición de iodo. En todas las soluciones se agregó igual cantidad de iodo (200 μL), la cantidad necesaria de almidón al 0,5 % para lograr la concentración final deseada y se completó con buffer acetato hasta un volumen final de 10 mL.

3. Resultados y Discusión

3.1 Inmovilización de α -amilasa en perlas de quitosano

Las perlas de quitosano resultaron blandas, blancas, traslúcidas, de forma esférica y con un diámetro medio de 3 - 4 mm. Luego de la activación en glutaraldehído se volvieron rígidas y opacas. Finalmente al ser sumergidas en la solución de enzima tomaron la coloración de solución de enzima comercial. Las perlas pueden verse en la Figura 1.

Tabla 1. Determinación de la cantidad de enzima inmovilizada.

Dilución inicial de enzima (1:30)	$E_o = 13,00 \text{ mg/mL}$
Sobrenadante	$E_s = 9,75 \text{ mg/ml}$
Volumen de solución de enzima (1:30)	$V = 10 \text{ mL}$
Nº de perlas de quitosano	56
% Inmovilización	25 %
Enzima inmovilizada	$E_p = 0,580 \text{ mg/perla}$

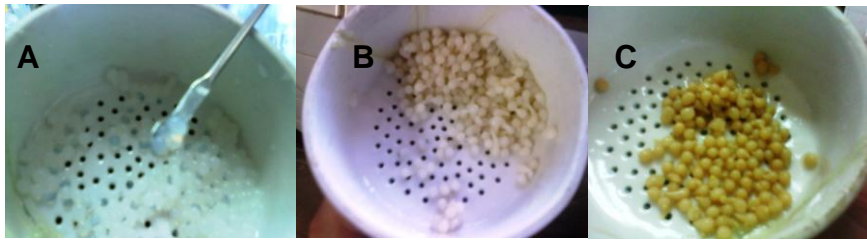


Figura 1. Fotografía de perlas de Quitosano. **A)** Antes de la activación **B)** Luego de la activación con glutaraldehido 5%. **C)** Luego de la sumersión en la dilución 1:30 de enzima α -amilasa.

Utilizando las soluciones patrones de albúmina (albúmina disuelta en buffer fosfato pH 7,0) se obtuvo la absorbitividad (ϵ) para el Método de Biuret que resultó ser 0,04 mg/mL.cm. Con este valor se determinaron las siguientes concentraciones de enzima, para la dilución 1:30 de enzima comercial (E_0), para el sobrenadante de las perlas (E_S). La cantidad de enzima inmovilizada en cada perla (E_p) se estima como la diferencia entre la cantidad de enzima inicial y la enzima que queda en el sobrenadante, dividido por el número de perlas, de acuerdo con la Ec. 4. El porcentaje de inmovilización se obtiene según la Ec. 5. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 1.

$$E_p(\text{mg enzima/perla}) = \frac{(E_0 - E_S) \cdot V(\text{ml})}{n^\circ \text{ perlas}} \quad (4)$$

$$\% \text{ inmovilización} = \frac{E_0 - E_S}{E_S} \cdot 100 \quad (5)$$

La concentración de la dilución 1:10 de enzima comercial también se determinó por el método de Biuret y resultó ser de 35,75 mg/mL. Con este dato es posible calcular la concentración final de la misma en la serie de experimentos realizados con la enzima libre. Si se añaden 20 μL de dicha dilución en 10 mL de solución, la concentración de enzima en el medio reaccionante es de 0,0715 mg/mL.

De aquí se deduce que basta con utilizar una sola perla para 10 mL de solución reaccionante (correspondiente a una cantidad de enzima de 0,0580 mg/mL), de modo que la cantidad de enzima añadida sea equivalente a la cantidad de enzima libre empleada en la primera serie de experimentos.

3.2 Espectro del complejo iodo – almidón y curva de calibración.

En la Figura 2A se muestra el espectro del complejo iodo-almidón y puede observarse claramente que el pico máximo de absorbancia corresponde a 530 nm. Se conoce que el valor varía según el grado de polimerización del almidón⁸. La Figura 2B muestra la curva de calibración de almidón. La absorbitividad del almidón resultó 7.53 g/L.cm y éste fue el valor utilizado para los ensayos posteriores.

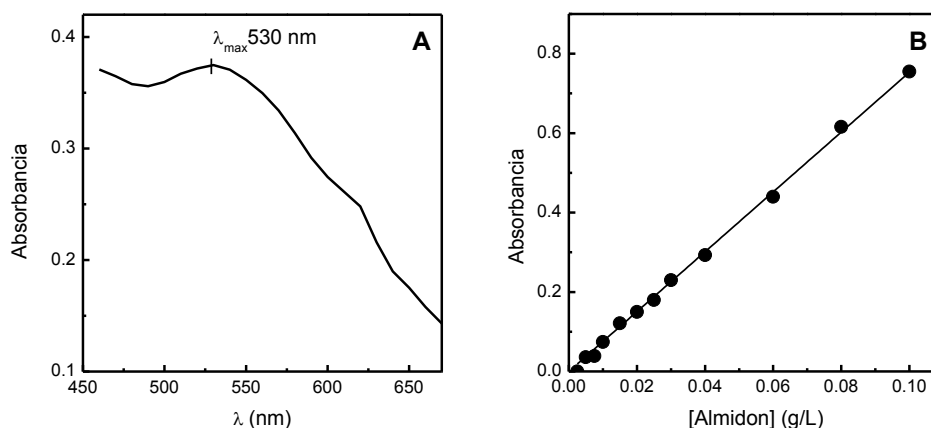


Figura 2. A) Espectro de Absorción Complejo Iodo – Almidón en Buffer Acetato 50 mM, pH 5.6. **B)** Curva de calibración para el almidón.

3.3 Estudio cinético.

Para determinar los parámetros cinéticos de Michaelis – Menten, se aplicó el método de las velocidades iniciales. Con los valores de absorbancia en función del tiempo obtenidos en los ensayos cinéticos (Figuras 3A y 3B) se hizo el ajuste para obtener la velocidad inicial (V_0) para cada una de las concentraciones iniciales de almidón. Se tomaron tres o cuatro de los primeros puntos de la curva, verificando un valor de R^2 que indique el mejor ajuste lineal. En las Figuras 4A y 4B se muestran los gráficos correspondientes.

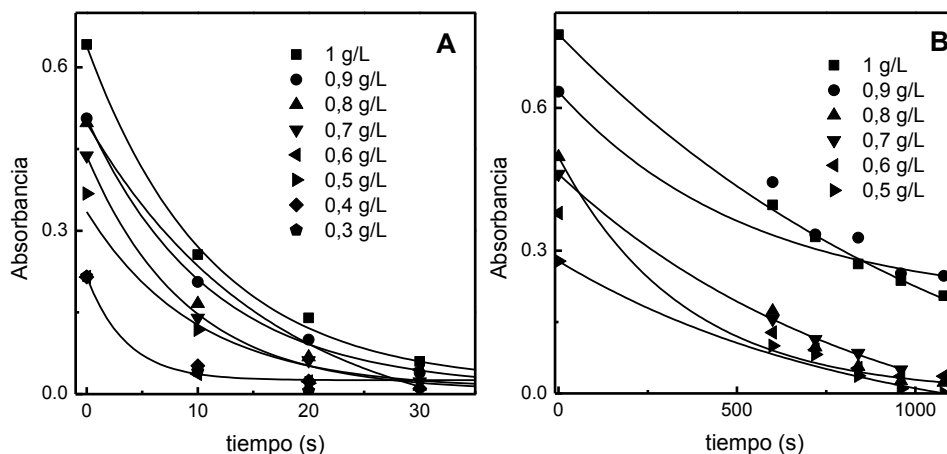


Figura 3. Absorbancia vs tiempo para los ensayos de cinética enzimática, cada curva corresponde a diferentes concentraciones iniciales de almidón. **A)** Enzima libre, **B)** Enzima inmovilizada.

Luego se convirtieron los valores de absorbancia en concentración, usando el valor de ϵ obtenido previamente, para obtener las velocidades iniciales. Los valores de velocidad inicial de reacción (V_0) se usan para construir la curva de Lineweaver-Burk, que permiten determinar fácilmente los valores de K_M y V_{MAX} a partir de la ordenada al origen y la pendiente de la recta. Los parámetros cinéticos calculados se muestran en la Tabla 2.

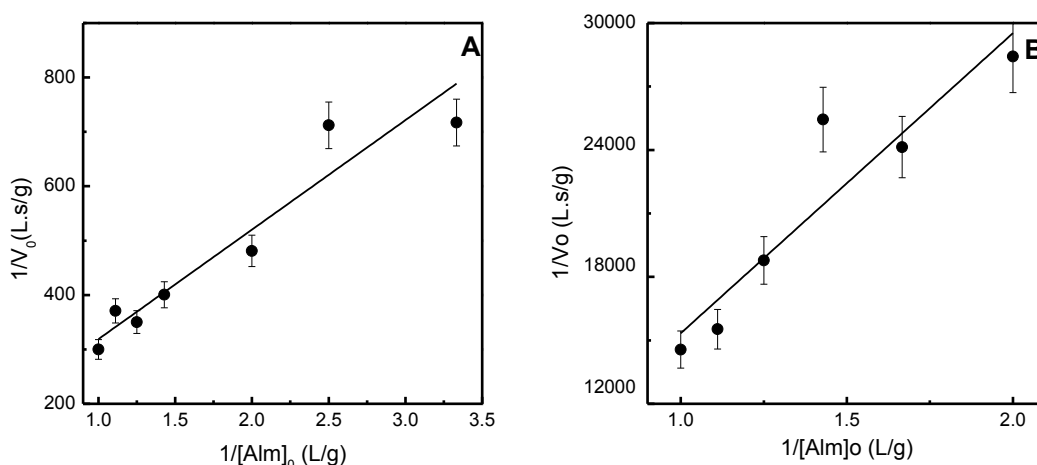


Figura 4. Determinación de K_M por el método gráfico de Lineweaver-Burk. **A)** Enzima libre, **B)** Enzima inmovilizada.

Los ensayos y el análisis de los resultados se realizan, por separado para la enzima libre e inmovilizada en quitosano. Para la enzima libre las muestras de mezcla reaccionante se toman cada intervalos de 10 s a partir del momento en que se inyecta la enzima; mientras que para la enzima inmovilizada las muestras se toman en intervalos de 2 min luego de 10 min iniciales de

incubación, que permiten la difusión del sustrato en la capa de difusión que rodea a cada perla de quitosano.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de Michaelis – Menten.

Ecuación de Lineweaver-Burk	Enzima Libre	Enzima Inmovilizada
$V_{M\acute{A}X} = 1/\text{ordenada}$	0,00851 g/L.s	0,00087 g/L.s
$K_M = \text{pendiente} \cdot V_{M\acute{A}X}$	1,712 g/L	12,34 g/L

Para determinar la actividad enzimática (UA) de acuerdo con la Ec. 3, se tomó el promedio general de los ensayos. Para la enzima libre resultó 1,8661 g alm/ g enz·min, mientras que para la enzima inmovilizada fue de 0,0547 g alm/ g enz·min.

4. Conclusiones

Se logró la inmovilización de α -amilasa en perlas de quitosano, con un rendimiento del 25 %. Los parámetros cinéticos de Michaelis – Menten (K_M) y la actividad enzimática (UA) responden a lo esperado, una reducción de la UA y un incremento de K_M para la enzima inmovilizada frente a la enzima libre. Cabe destacar que para el caso de la enzima inmovilizada lo que en realidad se calcula es la constante de afinidad aparente (K'_M) la cual depende del espesor de la capa de difusión del sustrato en el soporte δ y de la difusividad del sustrato en el soporte. A su vez δ depende del tipo de reactor ya sea lecho empacado o tanque agitado. Debido a la simplicidad del método de inmovilización y los buenos rendimientos obtenidos el quitosano resulta una matriz potencial para la inmovilización de α -amilasa a escala industrial.

5. Referencias

1. C. G. Oates. (1997). Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends Food Sci Tech.* 8, 375-382.
2. B. Svensson, (1994). Protein engineering in the α -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Mol. Biol.* 25, 141-157.
3. P. Tripathi, A. Kumari, P. Rath, A. M. Kayastha. (2007). Immobilization of α -amylase from mung beans (*Vigna radiata*) on Amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 49, 69-74.
4. J. Braun, P. Le Chaun, F. Le Goffic. (1989). The immobilization of *Penicillin G Acylase* on Chitosan. *Biotechnol Bioeng.* 33, 242 – 246.
5. H. Bergmeyer. (1987). *Methods of Enzymatic Analysis*. VCH Weinheim, Germany.
6. J.F Martínez Gallegos. (2005). Tesis Doctoral. Utilización de Alfa-Amilasas en Formulación de Detergentes Industriales. Universidad de Granada.
7. G. Gornall, Bardawill, C., David, M. (1949). Determination of Serum Proteins by means of the Biuret Reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751-766.
8. M. John, J. Schmidt, H. Kneifel. (1983). Iodine- maltossacharide complexes: relation between chein- length and color. *Carbohydr. Res.* 119, 254 - 257.