

Caracterización de Glucomilasa *A. niger* inmovilizada sobre perlita expandida y perlita expandida modificada.

Juan J. Rodríguez Zotelo¹, Fernando Soria¹ & Hugo Destefanis¹

(1) INIQUI- CONICET, Universidad Nacional de Salta, Av. Bolivia N° 5150.
jrodriguez@unsa.edu.ar

RESUMEN: Se estudio la inmovilización por unión covalente, de Glucoamilasa *A. niger* (comercial), en perlita expandida y perlita expandida modificada por tratamiento con magnetita (PE-magnetita) para su aplicación en la hidrólisis de almidón. Las propiedades analizadas del derivado inmovilizado fueron: pH óptimo, temperatura de máxima actividad, cantidad de proteína fijada y retención de la actividad, El pH óptimo y temperatura de máxima actividad de la enzima inmovilizada, en ambos soportes, resultado de 4,5 y 60 ° C. La máxima cantidad de proteína fija para PE-APTÉS y PE-Fe-APTÉS fue de 0,8 y 5 mg g-1 de soporte, respectivamente, en la cantidad más alta de proteína ofrecida. Se observa una elevada actividad retenida que aumentan conforme aumenta la cantidad de proteína ofertada. La actividad específica de la enzima inmovilizada sobre PE-APTÉS y PE-Fe-APTÉS resultaron de 0,18 y 0,14 η kat / mg de soporte, respectivamente. Las medidas de proteínas y actividad del derivado inmovilizado permitieron confirmar que el material preparado es apto para inmovilizar por unión covalente glucoamilasa *A.niger*. Esto demuestra que la interacción entre la enzima y el soporte existe y es efectiva.

1 INTRODUCCION.

La glucoamilasa, 1,4-alfa-D-glucano glucohidrolasa (EC 3.2.1.3), es una enzima hidrolítica del grupo de las amilasas, actúa en la degradación del almidón que es uno de los productos alimentarios más explotados a nivel mundial. Puesto que el almidón es soluble sólo a altas temperaturas (cerca de 100°C), una de las claves para su hidrólisis a escala industrial es el uso de enzimas con alta estabilidad térmica. La inmovilización de enzimas, frecuentemente produce un aumento de la estabilidad térmica y operacional de la enzima (Klibanov, 1983). El proceso de inmovilización puede ser llevado a cabo fijando la enzima a algún material orgánico y/o inorgánico. La principal ventaja derivada de la inmovilización es la fácil recuperación de productos y sustratos remanentes y la recuperación y reutilización del catalizador (Buchholz, 1992). El soporte ideal debe ser de bajo costo, inerte, físicamente fuerte y resistente al ataque microbiano. La perlita es un vidrio volcánico de alto contenido en sílice y álcalis, con muy bajos tenores de Fe, Ca y Mg, que puede expandirse cuando se expone a altas temperaturas. Los silicoaluminatos naturales reúnen dos características que los hacen particularmente atractivos como soportes para inmovilizar enzimas. Una es su abundancia y la otra es su capacidad de formar distintos tipos de

estructuras. Estos materiales pueden ser modificados mediante tratamientos hidrotérmicos, con el fin de obtener una mayor reactividad de la superficie, así como, para transformar el silicato amorfo en estructuras zeolíticas.

En este trabajo se ha estudiado la inmovilización por unión covalente de Glucoamilasa *A. niger* en perlita expandida y perlita expandida modificada por tratamiento con magnetita (PE-magnetita) para su aplicación en la hidrólisis de almidón. Se estudiaron las siguientes propiedades: retención de la actividad, pH óptimo y temperatura.

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Materiales

Perlita expandida (Perlita Verde, Quebrada de Quirón-Dpto. de los Andes, provista por la empresa Perlita Salta). Glucoamilasa *A. niger*, glutaraldehído (GA) y Aminopropiltriétoxisilano (APTÉS) fueron de SIGMA (St.Louis, Mo, USA). Almidón soluble de Merck.

Todos los otros reactivos fueron de grado analítico.

2.2 Ensayo de actividad



IX JORNADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE FACULTADES DE INGENIERÍA DEL NOA



Santiago del Estero, 3 y 4 de Octubre de 2013

La actividad de glucoamilasa se determinó utilizando almidón como sustrato, preparado en medio buffer fosfato de sodio 20mM, pH 5,5. Se siguió el progreso de la reacción midiendo la cantidad de glucosa producida por el ensayo de GLUCOSE (GO) ASSAY KIT (Bergmeyer, 1974). La unidad de actividad catalítica katal (kat/ mg de soporte) se tomó como la cantidad de enzima que libera 1 mol de glucosa por segundo por cada mg de soporte.

La actividad retenida de la enzima inmovilizada se determinó mediante la incubación de 0,8 ml de almidón de 10 mg ml⁻¹ en medio buffer fosfato de sodio 20 mM, pH 5,5 con 30 mg del derivado inmovilizado a 50°C. La mezcla se incubó durante 10 minutos, luego se separó el derivado inmovilizado por centrifugación y de la solución se midió actividad según el método ya mencionado.

La actividad específica se determinó por la relación entre la actividad retenida y la cantidad de proteína ofertada.

2.3 Preparación del soporte

En el presente trabajo se utilizó PE (perlita expandida) como material de partida. El proceso de expansión se llevó a cabo en un horno de lecho fluido a 1000°C, obteniéndose la PE que fue usada directamente como soporte. Además la PE fue sometida a un tratamiento con magnetita (PE-Fe). El material fue preparado mezclando 2 g de perlita expandida con 100 ml de agua destilada y 10 ml de sales de hierro. Se ajustó el pH a 10 con NH₄OH y se agitó suavemente durante 30 minutos. La temperatura de trabajo durante todo el tratamiento fue de 90°C. Posteriormente se lavó el material con suficiente agua hasta prueba negativa de Cl⁻.

2.4 Funcionalización del soporte con APTES y activación con GA.

En un sistema de reflujo, se suspendieron 1,5 g de PE y PE-Fe en 100 ml de tolueno. Se agitó suavemente y se calentó hasta 50°C para luego agregar 5,5 ml de APTES. Se continuó calentando hasta los 100°C y se agregó nuevamente 5,5 ml de APTES. El reflujo se

mantuvo durante 6 horas. Finalizado el proceso se dejó en reposo durante 24 horas en una campana extractora para eliminar el tolueno por evaporación. La sílice modificada se lavó con éter etílico y se dejó secar por 24 horas. Posteriormente los soportes (PE-APTES y PE-Fe-APTES) fueron tratados con GA al 5%.

2.5 Inmovilización de Glucoamilasa *A. niger*

A 30 mg de soporte activado PE-APTES y PE-Fe-APTES, se agregó 1 mL de solución de enzima 1.623 mg ml⁻¹, medio buffer fosfato 20mM pH: 5,5, para luego agitar durante 16 horas a 20°C y 20 rpm. El derivado inmovilizado fue separado del sobrenadante y lavado tres veces con buffer fosfato pH 5,5.

3 CARACTERIZACIÓN DEL CATALIZADOR

3.1 Determinación del pH óptimo y la temperatura de máxima actividad de los derivados inmovilizados

El pH óptimo y la temperatura de máxima actividad de la glucoamilasa *A. niger* inmovilizada se establecieron mediante la medición de sus actividades en varios valores de pH desde 4,5 hasta 8,5, utilizando Na₂HPO₄ ácido cítrico a 55°C y a diferentes temperaturas (Buffer fosfato de sodio 20 mM, pH 5,5) en el intervalo de 30 ° a 70 ° C, respectivamente.

3.2 Cantidad de proteína fijada y retención de la actividad

Se prepararon soluciones de glucoamilasa en distintas concentraciones de proteína (0,100; 0,203; 0,328; 0,493; 0,807 y 1,124 mg de proteínas), para luego ponerlas en contacto con 30 mg de los soportes activados (PE-APTES y PE-Fe-APTES). La cantidad de proteína fijada en los diferentes soportes se determinó, por el método de Lowry (Methods in Enzymology Vol III, pag. 448), por la diferencia entre la cantidad de proteína ofertada y la contenida en la solución sobrenadante resultante de la inmovilización. También se determinó la actividad de cada uno de los derivados inmovilizados.



IX JORNADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE FACULTADES DE INGENIERÍA DEL NOA



Santiago del Estero, 3 y 4 de Octubre de 2013

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 pH óptimo y temperatura de máxima actividad de los derivados inmovilizados

La dependencia del pH sobre la actividad de la enzima inmovilizada en PE-APTRES y PE-Fe-APTRES se muestra en la Figura 1a. El pH óptimo de la enzima inmovilizada resultó de 4,5. (Kahraman et al 2007).

La actividad de la enzima inmovilizada en función de la temperatura se muestra en la Figura 1b. La temperatura de máxima actividad para la enzima inmovilizada fue de 60 ° C (Saikumar 2006.).

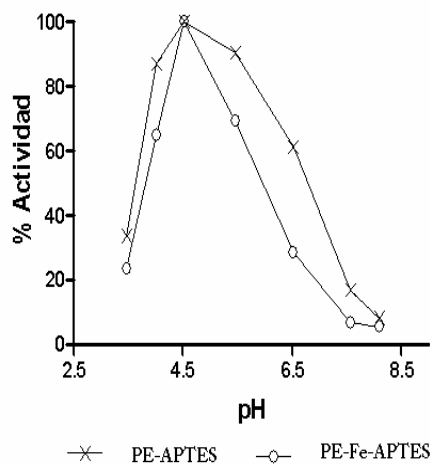


Figura 1(a). Efecto del pH sobre la actividad enzimática de glucoamilasa *A. niger* inmovilizada. Los valores de pH se obtuvieron mediante el uso de Na_2HPO_4 ácido cítrico y actividades determinadas a 55 ° C.

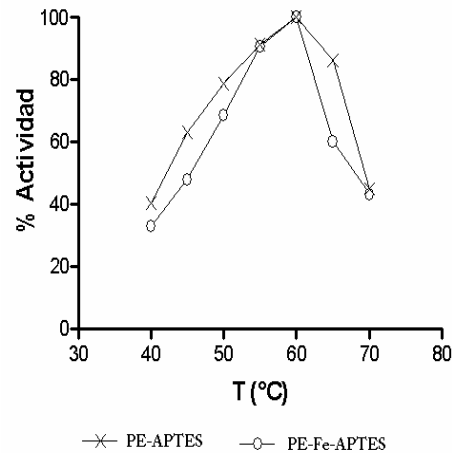


Figura 1(b). Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de glucoamilasa *A. niger* inmovilizada. La temperatura fue analizada entre 30°C y 70°C a pH 4.5 en medio buffer fosfato 20mM.

4.2 Cantidad de proteína fijada y retención de la actividad.

La dependencia de la cantidad de proteína fijada a los soportes (PE-APTRES y PE-Fe-APTRES) que se ofrece en el proceso de inmovilización se muestra en la Figura 2a. Se observa un aumento de la proteína fijada para ambos materiales en el intervalo de 0 a 10 μg de proteína ofertada por mg de soporte. Posterior a este valor, de proteína ofertada, la cantidad de proteína fijada permanece constante. La máxima cantidad de proteína fija para PE-APTRES y PE-Fe-APTRES fue de 0,8 y 5,3 mg g⁻¹ de soporte, respectivamente, en la cantidad más alta de proteína ofrecida. (Aksoy 1998.)

Las Figuras 2b y c muestra las actividades retenidas y específicas para ambos derivados inmovilizados. Se observa una elevada actividad retenida que aumentan conforme aumenta la cantidad de proteína ofertada.

La actividad específica de la enzima inmovilizada sobre PE-APTRES y PE-Fe-APTRES resultaron de 0,18 y 0,14 $\eta\text{kat} / \text{mg}$ de soporte, respectivamente. Estos valores disminuyen al aumentar la cantidad de proteína ofrecida, esta disminución puede atribuirse a la sobrecarga de enzima.



IX JORNADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE FACULTADES DE INGENIERÍA DEL NOA



Santiago del Estero, 3 y 4 de Octubre de 2013

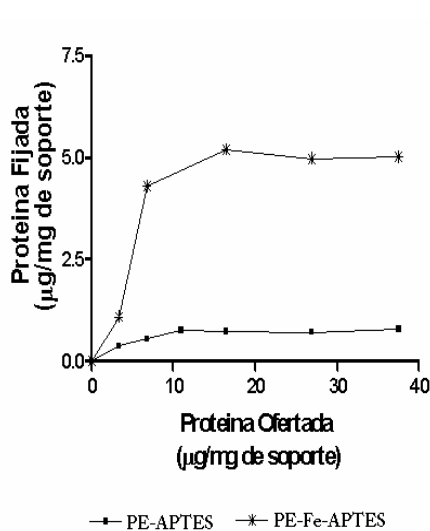


Figura 2(a). Relación entre la cantidad de glucoamilasa fijada en PE-APTES y PE-Fe-APTES y la cantidad de proteína ofertada.

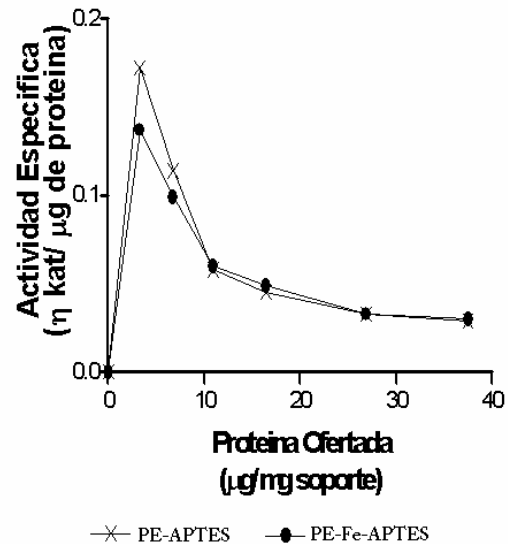


Figura 2(c). Relación entre la actividad específica de la glucoamilasa fijada en PE-APTES y PE-Fe-APTES y la cantidad de proteína ofertada.

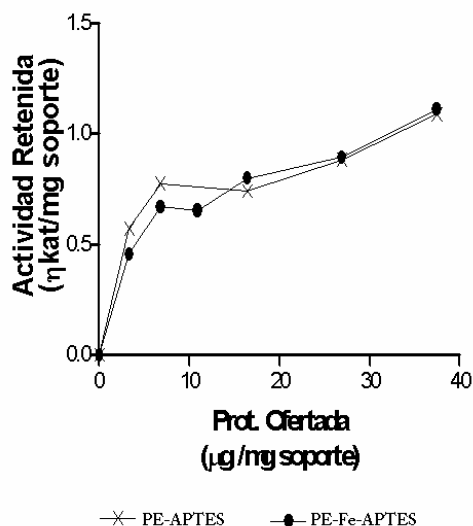


Figura 2(b). Relación entre la actividad retenida de la glucoamilasa fijada en PE-APTES y PE-Fe-APTES y la cantidad de proteína ofertada.

5 CONCLUSIONES

Las medidas de proteínas y actividad del derivado inmovilizado permitieron confirmar que el material preparado es apto para inmovilizar por unión covalente glucoamilasa *A.niger*. Esto demuestra que la interacción entre la enzima y el soporte existe y es efectiva.

6 REFERENCIAS

- Klibanov, A. M. Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Adv. Appl. Microbiol.* 29:1-28. 1983.
- Buchholz, K. Immobilized enzymes-kinetics, efficiency, and applications. *Int. Chem. Eng.* 32:1-13. 1992.
- Bergmeyer, H.U. and Bernt, E., *Methods of Enzymatic Analysis*, H.U. Bergmeyer, Ed., New York, *Academic Press, 2nd Edition*, pp 1205-1212 (1974).
- M. V. Kahraman, G. Bayramoğlu, N. Kayaman-Apohan and A. Güngör α -Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment. *Food Chem.* 104: 1385-1392. (2007)



IX JORNADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE FACULTADES DE INGENIERÍA DEL NOA



Santiago del Estero, 3 y 4 de Octubre de 2013

- R.S. Saikumar, K.S. Vishwanath, S.A. Singh and A.G. Appu Rao Entrapment of alpha-amylase in alginate beads: single step protocol for purification and thermal stabilization. *Process Biochem.* 41: 2282-2288. (2006)
- S. Aksoy, H. Tümtürk, N. Hasırcı Stability of alpha-amylase immobilized on poly(methyl methacrylate-acrylic acid) microspheres. *J. Biotechnol.* 60:37-46. (1998)



IX JORNADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE FACULTADES DE INGENIERÍA DEL NOA



Santiago del Estero, 3 y 4 de Octubre de 2013