

## ANALISIS DE REUSO DE GLUCOAMILASA *A.NIGER* INMOVILIZADA EN PERLITA EXPANDIDA

Juan J. Rodríguez Zotelo<sup>\*</sup>, Fernando Soria, Hugo Destefanis

INIQUI- CONICET, Universidad Nacional de Salta, Av. Bolivia N° 5150, Código Postal 4400, Salta – Argentina.  
E-mail: jrodriguez@unsa.edu.ar

**Introducción:** Las enzimas, moléculas de proteínas estructuralmente complejas, son catalizadores biológicos que participan de la mayoría de los procesos químicos. Tienen ventajas sobre su alto grado de especificidad y capacidad de operar en condiciones ambientales.

Las enzimas son relativamente caras y pierden sus propiedades catalíticas por cualquier cambio en sus condiciones, como el aumento de temperatura, lo que desnaturaliza las proteínas.

El objetivo principal de este trabajo es lograr una reutilización de la enzima, esto se puede lograr trabajando con enzimas inmovilizadas.

Dado que la Glucoamilasa ha ganado considerable atención en los últimos tiempos debido a su amplio uso en los campos médicos e industriales, se inmovilizó esta enzima por unión covalente sobre perlita expandida (Perlita Verde, Quebrada de Quirón-Dpto. de los Andes, facilitado por la Sociedad perlita de Salta).

Estos minerales fueron seleccionados por su disponibilidad en la zona de la Puna de San Antonio de los Cobres, Salar de Pocitos y Salta, todos ellos situados más de 3500 metros sobre el nivel del mar al norte de Argentina. Además perlita es hidrofílica, posee gran número de grupos hidroxilos reactivos y áreas de superficie apreciables, que permiten que la perlita expandida que se propone como soporte sea atractiva para la inmovilización de biomoléculas.

**Materiales:** Perlita expandida, Almidón soluble de Mallinckodt, Glucoamilasa de *A.Niger* fue de SIGMA USA). Glutaraldehído (5%) de SIGMA, ácido dinitrosalisílico (Morton Thiokol Inc. Alfa Catalog Chemicals), APTES (Aminopropiltriétoxissilano) de SIGMA. Todos los otros reactivos fueron de grado analítico.

### **Métodos:**

*Preparación del Soporte:* El proceso de expansión se llevó a cabo en un horno de lecho fluido a una temperatura de 1000 °C, obteniéndose la PE (perlita expandida) que fue usada directamente como soporte. Se trabajó con tamaños de partículas malla 50/70. Para la inmovilización de  $\alpha$ -amilasa *A. oryzae* por unión covalente, el soporte fue activado por dos procedimientos: a) se suspendieron 0,1 g de PE en 2 ml de una solución de APTES (Aminopropiltriétoxissilano) al 10% en acetona. La mezcla se agitó por 2 horas a 20°C. Posteriormente se lavó con agua y buffer fosfato de sodio 20 mM y pH 5,5 para luego secar a 50°C durante toda la noche.

*Inmovilización de Glucoamilasa:* Se preparó una solución de enzima comercial glucoamilasa *A. niger* de concentración 1.623 mg ml<sup>-1</sup> en medio buffer fosfato 20mM pH: 5,5. A 30 mg de soporte, previamente activado con APTES y GA, se agregó 1 mL de solución de enzima y se agitó durante 16 horas a 4°C y 20 rpm. El derivado inmovilizado fue separado del sobrenadante y lavado tres veces con buffer fosfato pH 5,5.

*Ensayos enzimáticos:* Se utilizó 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). Se realizó curva de calibración con soluciones de glucosa de diferentes concentraciones.

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 15 mg ml<sup>-1</sup> en medio buffer fosfato de sodio 20 mM, pH 4,5 con 30 mg del derivado inmovilizado a 50°C. La mezcla se incubó durante 10 minutos, luego se separó el derivado inmovilizado por centrifugación. Se tomo 20 µl de muestra y se agrego 2 mL de reactivo de trabajo (se preparo por la combinación de 30mL H<sub>2</sub>O, 3 mL 4-AF, 3 ml reactivo Fenol, 60 mL H<sub>2</sub>O y 0,18 mL reactivo GOD/POD) para incubar 10 minutos a 37 °C y luego medir absorbancia a 505 nm.

**Reutilización:** La actividad de la enzima inmovilizada se midió nueve veces en forma consecutiva lavando dos veces, con buffer fosfato de sodio 20mM, pH 5,5, entre cada reuso.

**Resultados:** Una característica importante que surge de la inmovilización de una enzima es la capacidad de reutilizar, lo que justifica la evaluación de inmovilización al considerar los costos en el uso de una enzima soluble. La Figura 1(A) y (B) muestra que la enzima inmovilizada conserva un porcentaje de actividad elevado hasta el noveno reuso (aproximadamente 90 %). La Figura 9 (C) y (D) muestran un porcentaje de actividad retenida en el noveno reuso del 60 y 55 %, respectivamente.

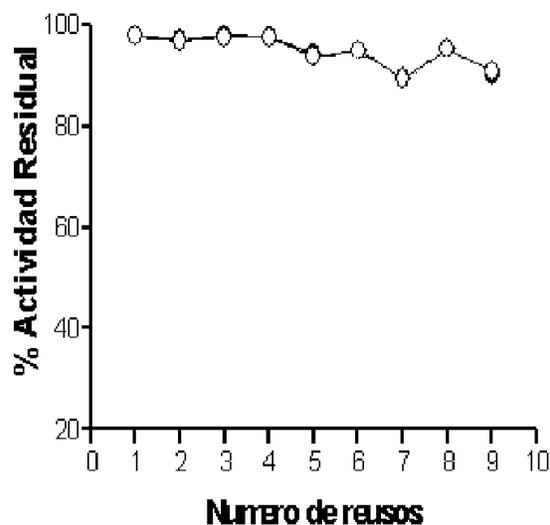


Figura 1. Presenta el porcentaje actividad residual retenida, del derivado inmovilizado, en función del número de reusos.

**Conclusiones:** Se puede concluir que la inmovilización permite la reutilización manteniendo un porcentaje elevado de actividad retenida después de varios reusos esto confirma que la perlita expandida es adecuada para la inmovilización por unión covalente glucoamilasa *A. niger*. Esto demuestra que la interacción entre las enzimas y el soporte existe y es efectiva.