



INMOVILIZACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO DE LA TIROSINASA DE *AGARICUS BISPORUS* EN ESFERAS DE QUITOSANA

Vânia Paula Salviano dos Santos, Carlos H. Mendonça, Rafael V.G. dos Santos, Francisca S. C. S. Miños, Alexandre G. Torres, Karen S. Pereira, Andréa M. Salgado

Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro – RJ – Brasil CEP: 21941-909 Email: paulassalviano@ufrj.br

Palabras clave: tirosinasa, quitosana, covalente

Introducción. La quitosana es una molécula natural, inerte, hidrofílica y biocompatible, con propiedades antifúngicas bajo temperatura ambiente. Esas propiedades aliadas a la alta disponibilidad de agrupamientos amino e hidroxila en su superficie y bajo costo relativo, la tornan un excelente soporte [1]. La enzima tirosinasa es empleada en aplicaciones biotecnológicas: bioremediación, biosensores para diversas áreas y producción de bioproductos de interés [2].

Este trabajo tiene como objetivo inmovilizar la enzima tirosinasa obtenida del macrofungo *Agaricus bisporus* por medio de ligación covalente y cruzada utilizando esferas de quitosana como soporte.

Metodología. Esferas de quitosana fueron preparadas con base en el método modificado de [3]. 2,0 g de quitosana fueron adicionados en 100 mL de solución de ácido acético 5% (v/v), sobre agitación por 24 horas. La solución fue goteada en 1000 mL de solución de NaOH y Etanol (4:1), dejadas en la solución, agitación por 24 horas, filtradas y lavadas con agua desionizada hasta pH neutro (pH 7.0). Los diámetros de las esferas pre-tratadas resultaron entre 1,5 e 1,8 mm. En seguida, 10 g de esferas de quitosana fueron añadidas a 80 mL de solución de glutaraldehído 3,0% (v/v) y agitadas, a 25°C y 150 rpm por 2 horas. La inmovilización covalente fue realizada adicionando 1,0 g de esferas de quitosana activadas a una mezcla de 1 mL de solución de extracto (5328 U/mL) sobre agitación a 25°C y 150 rpm por 24 horas. Las esferas fueron separadas y lavadas con un tampón de fosfato de sodio pH 6,0. Para la inmovilización covalente-reticulación, fue realizado el procedimiento de adsorción directa relatado anteriormente. Entretanto, pasadas 24 horas de agitación, se adicionó al medio de reacción 5 mL de solución de glutaraldehído 1,0% (v/v). Esta mezcla permaneció en agitación a 25°C y 150 rpm por 2 horas. Por fin, las esferas fueron separadas y lavadas con tampón fosfato de sodio pH 6,0 tres veces. La actividad de la enzima tirosinasa libre e inmovilizada fue medida según el procedimiento [4]. La eficiencia de las inmovilizaciones fue medida por medio de la ecuación $n(\%) = (U_s/U_v) \cdot 100$ donde, U_s = unidades de actividad enzimática total presente en el soporte y U_0 = unidades de actividad utilizadas en la inmovilización.

Resultados.

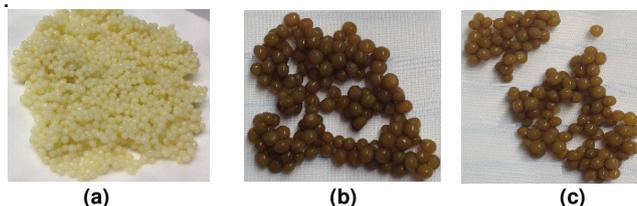


Figura 1. Esferas de quitosana activadas con GA (a) Inmovilización covalente (b) Inmovilización Covalente-reticulación (c).

La Tabla 1 muestra los resultados de las actividades recuperadas y porcentuales de eficiencia de las inmovilizaciones. La adsorción directa presentó mayor actividad recuperada y eficiencia de inmovilización.

Tabla 1. Efectos de los métodos de inmovilización en la actividad recuperada en la inmovilización del extracto.

Método de Inmovilización	Us (U/mL)	n(%)
Covalente	1320 ± 19,6	24,77
Covalente-reticulación	1096 ± 45,7	20,57

Conclusiones. La baja actividad recuperada en los inmovilizados en relación a la enzima libre puede ser explicada debido a la saturación de la superficie de soporte con la alta carga enzimática. La menor actividad retenida en lo inmovilizado por ligación covalente-reticulación probablemente se debe a la concentración de glutaraldehído utilizada que proporciona un elevado número de grupos aldehídos en la superficie de la quitosana formando ligaciones multi-punto entre las enzimas y el soporte trayendo impedimentos espaciales y alteraciones conformacionales en la estructura de la enzima y consecuencia disminución en la actividad.

Bibliografía.

- [1] Faria, R. O. Moure, V. R. Amazonas, M. A. L. Krieger, N. Mitchell, D. A. (2007). Food Technol. Biotechnol. 45 (3): 287 - 294.
- [2] Jesionowski, T. Zdzarta, J. Krajewska, B. (2014). Adsorption. 20: 801–821.
- [3] Zhou, Y. Wang, L. Wu, T. Tang, X. Pan, S. (2013). Electronic Journal of Biotechnology. (16) 6.
- [4] Campos, C.F., Souza, P.E.A., Coelho, J.V., Glória, M.B.A. J. Food Process. Preserv., vol. 20, no. 6, pp. 487–500, Dec. 1996.