

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA INMOVILIZACIÓN DE UNA XILANASA COMERCIAL EN DIFERENTES SOPORTES.**

Zafra-Jiménez, Gabriela, Rivero-García, Mayola, Martínez-Trujillo, María Aurora

Laboratorio de Catálisis Enzimática. División de Ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Av. Tecnológico S/N, Col. Valle de Anáhuac. Teléfono 57 10 45 60 Ext. 2227. e-mail: auro_mt@yahoo.com

Palabras clave: Xilanasas, Inmovilización, Alginato, Solgel.

Introducción. La inmovilización tanto de células como enzimas ofrece diversas ventajas sobre las enzimas y células libres, incluyendo la conservación de la biocatálisis activa y estable, la alta productividad volumétrica, el perfeccionamiento en el control de procesos, la protección celular y enzimática contra daños adversos de temperatura y la reducción de la susceptibilidad a la contaminación de los mismos¹. Estudios recientes han demostrado que la inmovilización de enzimas en sol-gel y alginato ofrece ventajas como el incremento de la estabilidad enzimática contra desnaturantes químicos y térmicos; sin embargo también se ha observado que muchas enzimas pierden totalmente o disminuyen significativamente su actividad al ser inmovilizadas en una matriz de solgel^{2,3}. Debido a que no existen reportes relacionados con el agar bacteriológico como soporte, el objetivo de este trabajo es realizar la comparación de la eficiencia y estabilidad de la actividad enzimática inmovilizada en diversos soportes incluyendo al agar bacteriológico.

Metodología. Para la actividad de las enzimas inmovilizadas y libres, se trabajó con una enzima comercial, Xilanasas de *Trichoderma viride* (sigma No. Cat. X3876). La cinética enzimática tanto libre como inmovilizada se determinó a temperatura y pH óptimos (50°C, 6). La inmovilización enzimática se realizó utilizando tres soportes: Alginato de sodio al 2.5% (AS 2%) estabilizando las perlas en CaCl₂ 0.5M; Agar bacteriológico al 4% (AB 4%), preparado en el regulador, y Sol-gel con tetrametil ortosilicato al 98%, seguida de la adición de 2ml de enzima en los tres casos. La actividad de la enzima inmovilizada se determinó en condiciones similares a las de la enzima libre, utilizando las perlas obtenidas con AS 2%, AB 4%, y 3.5mg del polvo del sol-gel/ml de reacción. Dicha actividad se cuantificó al inmovilizar y después de 3 meses de haber formado el soporte, para probar la estabilidad de la enzima inmovilizada. Los parámetros cinéticos (Km y Vmax) fueron determinadas por la linearización de los datos de la cinética, mediante la ecuación de Lineweaver-Burk.

Resultados y discusión. En la Figura 1 se observan las actividades enzimáticas de la enzima inmovilizada en AS 2% y AB 4% (Fig. 1A) y Sol-gel (Fig. 1B) con respecto a la enzima libre. Es posible observar que en AB 4%, la actividad aumenta en un 109%. En este soporte, la enzima inmovilizada permanece estable, ya que después de 3 meses mantiene el 60% de su actividad original, y ésta es todavía mayor a la observada para la enzima libre (20%). AS 2% incrementa la actividad en un 176% respecto a la enzima libre. Sin embargo, este soporte no es muy estable, ya que después de 3 meses pierde la consistencia original y se comporta como la enzima libre. Al ser inmovilizada en sol-gel, la actividad de la enzima disminuye considerablemente. Algunos trabajos proponen que esta disminución se debe a la relación [Enzima]-

soporte³. Se realizaron estudios modificando esta relación y el resultado fue similar en cada caso. Por lo anterior, se piensa que esta disminución se debe al metanol generado durante la polimerización del soporte y no a concentraciones mayores de enzima. Estudios previos mostraron que la actividad disminuye significativamente independientemente de la concentración de enzima, y que un 2% de metanol presente en el medio, disminuye la actividad enzimática libre en un 70%. La actividad de la enzima inmovilizada en sol-gel, disminuye en un 98%. Con respecto a los valores de Km (Tabla 1), podemos observar que, la enzima inmovilizada en AB 2% muestra mayor afinidad que la enzima libre, sin embargo, los otros soportes disminuyen la afinidad de la enzima. Estos cambios en los parámetros cinéticos podrían deberse a un posible microambiente generado debido a la estructura orgánica del soporte.

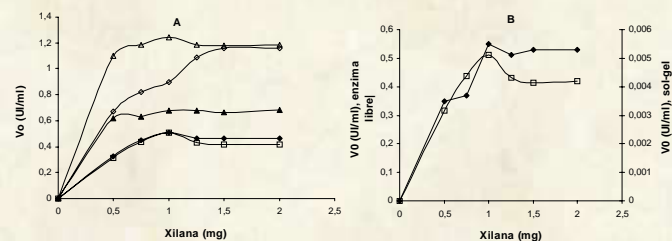


Fig. 1. Comparación de las cinéticas enzimáticas en los soportes de inmovilización: AB 4% (Δ actividad inicial, • actividad 3 meses), Alginato de sodio (◇ actividad Inicial, ◆ actividad 3 meses) y • enzima inmovilizada en sol-gel.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la Xilanasas libre e inmovilizada

	Libre	AB4% *	AB4% **	Sol-gel	Alginato de Na ²⁺	Alginato de Na ²⁺ **
Vmax (μmol/ml/min)	0.5920	1.2421	0.7115	0.0103	1.6353	0.6835
Km (mg/ml)	0.3770	0.0527	0.0771	1.22048	0.7264	0.4937

* Medición correspondiente a la actividad de la enzima inmediatamente después de haberla inmovilizado (Tiempo inicial).

** Medición correspondiente a la actividad de la enzima después de 3 meses de haberla inmovilizado.

Conclusiones y perspectivas. A pesar de que se logró inmovilizar a la xilanasas en diferentes soportes, no todos resultaron exitosos. El soporte en AB4% resultó ser el mejor por mantener una mayor actividad tanto enzimática como una mejor estabilidad de soporte.

Referencias.

- Ki-Yong Lee y Tae-Ryeon Heo. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied Environmental Microbiology*. 66:869-873
- Roy I., Gupta A., Khare S.K., Bisaria V.S. y Gupta M.N. 2003. Immobilization of xylan-degrading enzymes from *Melanocarpus albomyces* IIS 68 on the smart polymer Eudragit L-100. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61:309-313
- Chia-I. Li, Yi-Hua Lin, Cheng-Ling Shih, Jeng-Pyng Tsaur, Lai-Kwan Chaul. 2002. Sol-gel encapsulation of lactate dehydrogenase for optical sensing of L-lactate. *Biosensors & Bioelectronics*. 17:323-330