



Fabricación de un electrodo enzimático de lacasa

González I., Ugalde-Saldívar V.M., Viniegra G., Castro M.A.*

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Avenida San Rafael Atlixco No. 186, Colonia Vicentina, México D. F. 09340, México.

ang@xanum.uam.mx

Palabras clave: lacasa, biosensor, inmovilización

Introducción Un biosensor es un dispositivo constituido de un elemento de reconocimiento biológico (enzimas, dna, bacterias y proteínas), y de un elemento transductor, el cual convierte la reacción biológica o proceso biocatalítico en señales electrónicas cuantificables. Los sensores enzimáticos emplean como elemento de reconocimiento diversos tipos de enzimas como las oxidoreductasas (glucosa oxidasa, peroxidasa, lactato oxidasa, lacasa, etc) [1-2]. La lacasa (EC 1.10.3.2), es una fenol oxidasa con sitios activos que poseen átomos de cobre. Sus aplicaciones se encuentran en la industria textil y alimentaria principalmente, en la actualidad se vislumbra su utilidad en el desarrollo de biosensores y celdas de biocombustible [3]. En este trabajo, el objetivo es demostrar que el funcionamiento del sensor de lacasa lo determina el número de sitios activos [Cu(II)], presentes en la superficie transductora. Esto genera una corriente a través del electrodo que se obtiene si hay transferencia de electrones (TE) entre la enzima y la superficie electródica. A partir de esto se establece, que la eficiencia del biosensor es altamente dependiente de la cinética de TE y la distribución homogénea del sitio activo en la superficie del electrodo.

Metodología. Se caracterizó la superficie del electrodo de carbón vítreo empleando microscopía de luz polarizada y de tunelaje (STM), y el comportamiento electroquímico de la superficie se evaluó con voltamperometría cíclica. Posteriormente, se hizo la inmovilización de la enzima en la superficie del electrodo con glutaraldehído (GA) al 10% y se caracterizó cinéticamente (actividad (U/mL), Km (mM), V_{max} (mM/min), y K_{cat}/Km (mMmin)⁻¹ o eficiencia). Los datos obtenidos se compararon con los valores de la enzima libre obtenidos bajo las mismas condiciones de trabajo.

Resultados y discusión. Se evaluaron diversos procesos para la inmovilización de la enzima en el electrodo se llevo a cabo empleando silanos al 50% y una disolución de glutaraldehído al 10%, con la enzima en una proporción al 50 %. Para determinar

que la enzima estaba efectivamente inmovilizada, se determinaron los parámetros cinéticos empleando ABTS como sustrato y una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH 3.7. Los resultados experimentales (Tabla 1), muestran que la actividad es equivalente a la cuarta parte de la actividad presente en la enzima libre, lo que es debido a la modificación conformacional de los sitios activos de la enzima al fijarla a la superficie del electrodo [4].

Tabla 1. Valores de actividad, Km, y k_{cat}/Km empleando ABTS como sustrato en una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH 3.7.

P.C.	Lac libre	Electrodo Número					
		1	2	3	4	5	6
Act U/mL	43	11	13	14	12	9.0	12
Km (mM)	0.01	1.7	0.06	0.4	0.13	0.3	0.4
Efic.	3453	12	266	69	128	94	38

¹ parámetros cinéticos

Conclusiones. La caracterización microscópica de la superficie activa proporcionó la información necesaria para conocer las propiedades de rugosidad de la superficie electródica antes de inmovilizar a la enzima y se establecieron las condiciones de trabajo más adecuadas para la inmovilización de la enzima en la superficie del electrodo

Bibliografía

- [1] Schéller F.W., Wollenberger V., Waesinke A., Lisdot F. (2001). Research and development in biosensors, *Curr. Op. Biotech.* (12): 35-40
- [2] Habermüller K., Musbach M., Schuhmann W. (2000). Electro-transfer mechanisms amperometric biosensors, *J. Anal. Chem.* (366): 560-568.
- [3] Xu F., Berka R. M., Wahleithner J. A., Nelson B. A., Shuster J. R., Brown S. H., Palmer A. E., Solomon E. I. (1998). Site directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity ald profile, *J. Biochem.* (334): 63-70.
- [4] Quan D., Kim Y., and Shin W. (2004). Characterization of an amperometric laccase electrode covalently immobilized on platinum surface, *J. Electroanal Chem.* (561):181-189.