

Evaluación voltamperométrica de inulinasa inmovilizada sobre electrodo de carbón vítreo modificado con glutaraldehído

Araceli López Ronson¹, Leandro Rodrigo González-González², Rafael Pérez Bedolla¹, Ignacio García Martínez², Karla Lorena Gutiérrez Paredes² y Anayelí García Cruz²

¹Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec

²Universidad Simón Bolívar

Resumen

Se ha generado en los últimos años el interés de la inmovilización de enzimas sobre superficies electrónicas, con el fin de reducir la pérdida progresiva de la actividad enzimática. La reciprocidad que existe entre superficie electrónica y enzima requiere de diversas estrategias experimentales para lograr que haya un intercambio directo, por lo que el propósito de este trabajo es determinar: 1) la posibilidad de evaluar la estabilidad de la enzima en un sistema de inmovilización sobre electrodo de carbón vítreo modificado con glutaraldehído y 2) su evaluación electroquímica, con el objetivo de establecer el mecanismo de transferencia de carga entre los sitios activos de la enzima y su sustrato natural de inulina de agave, comparando su potencialidad para catalizar la reacción de hidrólisis de inulina bajo condiciones normales de pH y sustrato de inulina.

Palabras clave: inulinasa, voltamperograma, glutaraldehído.

Abstract

The immobilization of enzymes on electrified surfaces to reduce the progressive decrease of enzyme activity has recently generated an interest. The reciprocity between electrified surfaces and enzymes requires different experimental strategies to achieve a direct exchange, so the aim of this study is to determine: 1) the possibility of assessing the stability of the immobilized enzyme on a vitreous carbon electrode material surface modified with glutaraldehyde, and 2) its electrochemical evaluation, in order to establish the mechanism of mass transfer between the active sites of the enzyme and its natural substrate of agave comparing its potential to catalyze the reaction of hydrolysis of inulin under normal conditions of pH and inulin substrate.

Keywords: inulinase, voltamperogram, glutaraldehyde.

Introducción

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente en condiciones semejantes a las que se encuentran en las células y fluidos biológicos; por su naturaleza proteínica y a diferencia de los catalizadores inorgánicos, las enzimas son sensibles a condiciones extremas de pH, temperatura, concentración de sustrato, coenzimas, etc. (Wingard et. al., 1972). Esta definición corresponde también a procesos por los cuales se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos y células debido a la unión con el soporte (Taylor, 1991), por lo que su acción produce una disminución en la energía de activación de las sustancias que reaccionan (Aitken et. al., 2003).

Cuando una enzima está inmovilizada a un soporte sólido, el comportamiento cinético de la reacción cambia considerablemente, provocando una modificación de los valores a sus parámetros cinéticos de su forma libre. De esta manera, los parámetros que se pueden obtener son sólo aparentes y no intrínsecos (Ukeda et. al., 1996).

La actividad expresada y los parámetros cinéticos de una enzima inmovilizada son sensiblemente dependientes de factores tales como: las dimensiones físicas y la naturaleza química del soporte, las características de flujo o mezclado en el sistema de reacción y la concentración de sustratos, productos y efectores en la solución circundante. Así es como estos factores definen los parámetros aparentes que dependen marcadamente de las condiciones de reacción. Desafortunadamente, los parámetros aparentes de velocidad enzimática son de escasa utilidad, a menos que se tenga algún conocimiento de cómo se ven afectados por variables importantes del medio ambiente (Ukeda et. al., 1996).

Este ambiente en la proximidad de la enzima inmovilizada puede ser totalmente diferente, debido a la resistencia difusional externa de sustratos y productos formados en una película estancada sobre la superficie de la enzima inmovilizada, que se promueve principalmente por difusión molecular, como a la tasa global y específica de reacción. Por tal motivo, el ambiente modificado en las proximidades de un sistema enzimático inmovilizado ha mostrado

ser el responsable de cambios en los perfiles pH-actividad en el caso de varias enzimas enlazadas a un acarreador polielectrolítico. Desplazamientos de pH de 1-2.5 unidades se pueden observar en medios de reacción con valores de fuerza iónica baja (Singh et. al., 2006). Sin embargo, este efecto se atenúa a fuerzas iónicas elevadas.

Los métodos electroquímicos son muy efectivos en la fabricación de electrodos enzimáticos, empleando polímeros conductores como intermediarios. Existen dos formas de realizar este proceso; el primero, consiste en dos pasos y está relacionado con la formación de un polímero conductor en la superficie del electrodo y la inmovilización de la enzima en la película del polímero. El segundo método consiste en la preparación del electrodo enzimático, inmovilizando la enzima en una capa del polímero conductor durante la polimerización electroquímica y posteriormente se hace el depósito del polímero en la superficie del electrodo (Ruzgas et. al., 1996).

La importancia de la tecnología enzimática radica en la posibilidad de llevar a cabo reacciones catalizadas por enzimas fuera de la célula de la cual provienen y con ello generar un amplio panorama de aplicaciones en las determinaciones analíticas, ya sea en las industrias farmacéutica y de alimentos (Pandey et. al., 1999), o en el uso de una clase importante de enzimas industriales con sus diversas aplicaciones, como las inulinasas en la producción de jarabes de alta fructosa (Vuilleumier et. al., 1993).

Debido al costo elevado de las enzimas es necesario pensar en metodologías que permitan recuperar el catalizador enzimático hasta hoy soluble, para poder reutilizarlo. Este problema ha impulsado el desarrollo de tecnologías de inmovilización de las enzimas, que sujetas a un soporte insoluble permitan mantener un sistema de reacción por largos periodos de tiempo, tan largos como su estabilidad lo permita (Serrano et. al., 1994).

La estrategia empleada, cuando se trata de inmovilizar a una enzima, no sólo incluye las consideraciones de cómo lograr la inmovilización, sino también la selección del medio más apropiado. Por ejemplo, se puede considerar la inserción de grupos funcionales adicionales para obtener las propiedades fisicoquímicas deseadas del polímero inmovilizante y, con ello, del sistema enzima-sustrato-producto. Además de esta consideración, también se tienen

que cubrir otros requerimientos básicos, como el uso de acarreadores que deben poseer la forma geométrica conveniente y las dimensiones apropiadas, e igualmente tienen que cumplir con ciertos requerimientos de estabilidad química, permeabilidad, rigidez, estabilidad mecánica y deben permitir eliminar la unión entre el acarreador y el ligando para posibilitar el avance de la reacción (Serrano et. al., 1994).

Objetivo

Evaluar electroquímicamente la inulinasa inmovilizada sobre electrodo de carbón vítreo modificado con glutaraldehído, con el fin de establecer la transferencia de carga entre los sitios activos de la enzima y su sustrato.

Método

Se realizó la construcción de un electrodo de carbón vítreo base-enzima para determinar la respuesta amperométrica de la enzima Inulinasa inmovilizada de acuerdo con el siguiente procedimiento (Zhang, 2000):

El electrodo de carbón vítreo construido se sumergió en una solución de glutaraldehído 3mM durante 24 horas. Posteriormente, el electrodo modificado se sustrajo de la solución, se enjuagó previamente y se introdujo en una solución amortiguadora de citratos 0.1M a pH 5 que se establece para mejor estabilidad de la enzima. La intención con este proceso fue generar una película que soporte a la enzima y de esta manera tener la respuesta en el electrodo de carbón vítreo.

Se trazó un voltamperograma cíclico a una velocidad de 100 mV/s para establecer la referencia. Posteriormente, se enjuagó y se sumergió en la solución que contenía la enzima, prosiguiendo con las respuestas amperométricas con un potencios-tato PGSTAT 100 de Autolab.

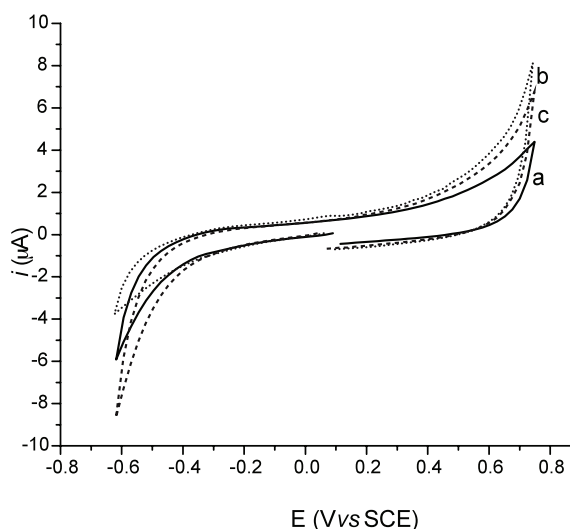
Se empleó estándar de inulina de la compañía Megafarma® Beneo raftline inuline. Todos los estándares utilizados durante el experimento fueron grado reactivo, Sigma Chemical Co. (St. Louis Missouri, USA), y los disolventes empleados grado analítico (J. T. Baker).

Resultados

Inicialmente se realizaron los ensayos voltamperométricos de la enzima inulinasa libre en solución, utilizando un electrodo de carbón vítreo. Seguido de esto se realizaron los ensayos voltamperométricos para el electrodo de carbón vítreo pulido y para la enzima, utilizando como electrolito de soporte una solución amortiguadora de citratos 0.1M a pH 5 y a una velocidad de barrido de 100 mV/s, empleando un intervalo de potencial de $-0.6 \leq E \leq 0.73$ V (vs de SCE).

En la figura 1 se presenta el voltamperograma iniciando el barrido de potencial en dirección positiva, obtenido para el electrodo de carbón vítreo pulido (ver figura 1a) para la enzima disuelta en el medio (ver figura 1b) y de la enzima más la inulina (ver figura 1c). Como se puede observar en el voltamperograma trazado sobre el electrodo de carbón vítreo, cuando la enzima se encuentra en el medio presenta una modificación en su forma con respecto al voltamperograma trazado para el electrodo de carbón vítreo limpio (ver figura 1a), además de un aumento de corriente y un ligero desplazamiento de potencial hacia potenciales más negativos.

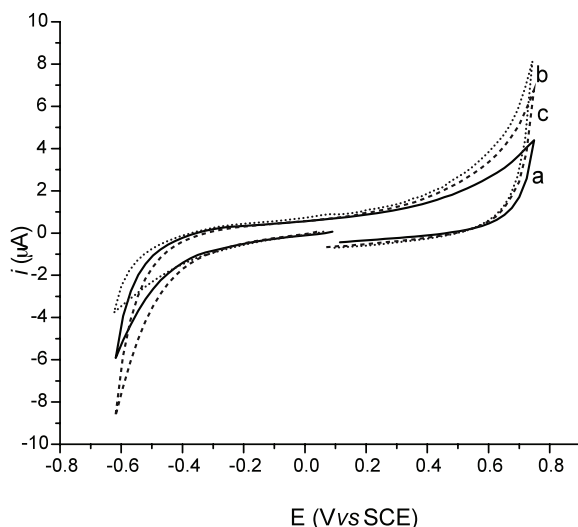
Figura 1. Voltamperograma trazado con el electrodo de carbón vítreo.



a) Limpio, b) con la presencia de 1 ml de inulinasa en el medio y c) con la presencia de 1 ml de inulinasa y 1 M de inulina. El barrido de potencial es iniciado en dirección positiva a partir del OCP, utilizando como electrolito soporte solución amortiguadora de citratos 0.1M a pH 5 y a una velocidad de 100 mV/s.

En la figura 2 se muestran los voltamperogramas obtenidos iniciando el barrido de potencial en dirección negativa del electrodo de carbón vítreo pulido (ver figura 2a), la enzima disuelta en el medio (ver figura 2b) y de la enzima más la inulina (ver figura 2c). Puede observarse en la figura 2 que el comportamiento en los tres casos es similar al mostrado cuando el barrido de potencial es iniciado en dirección positiva (ver figura 1).

Figura 2. Voltamperograma trazado con el electrodo de carbón vítreo.



a) Limpio, b) con la presencia de 1 ml de inulinasa en el medio y c) con la presencia de 1 ml de inulinasa y 1 M de inulina. El barrido de potencial es iniciado en dirección negativa a partir del OCP, utilizando como electrolito soporte solución amortiguadora de citratos 0.1M a pH 5 y a una velocidad de 100 mV/s.

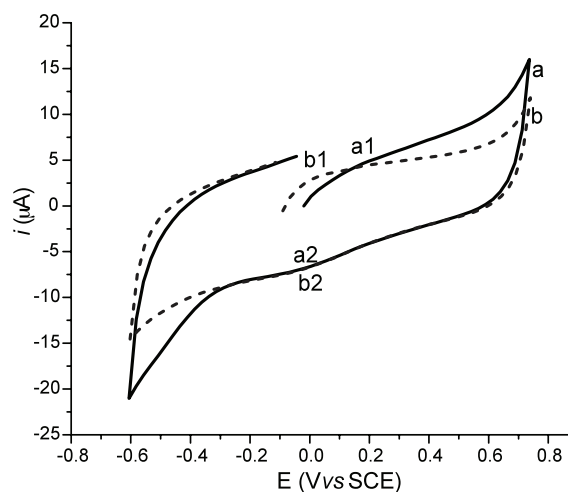
En las figuras 1 y 2 se puede advertir que la presencia de la enzima disuelta en el medio (ver figuras 1b y 2b) modifica la corriente observada para el electrodo de carbón vítreo limpio y de igual forma la presencia de la enzima y la inulina (ver figuras 1c y 2c).

Para este método electroquímico, inicialmente se realizó un estudio voltamperométrico para el electrodo de carbón vítreo modificado con glutaraldehído (VC/Glut) y para la enzima inmovilizada en el VC/Glut, utilizando como electrolito soporte una solución amortiguadora de citratos 0.1 M a pH 5 con un intervalo de potencial de $-0.6 \leq E \leq 0.73$ V (vs SCE) y a una velocidad de 100 mV/s. La enzima se debe encontrar adsorbida sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo con glutaraldehído.

En la figura 3 se muestran los voltamperogramas cuando el barrido de potencial se inicia en dirección positiva, obtenidos para el electrodo de carbón vítreo modificado con glutaraldehído (VC/Glut) y con la enzima adsorbida (ver figura 3a), y con el electrodo VC/Glut y con la enzima adsorbida en presencia de inulina (ver figura 3b). Cuando la enzima se encuentra adsorbida en la superficie del electrodo VC/Glut se aprecia un incremento de corriente que genera una meseta de oxidación (a1) y una de reducción (a2). Debido a la forma de dichas mesetas no es posible determinar los potenciales a los que se encuentran. Estas mesetas a1 y a2 se atribuyen a la presencia de la enzima adsorbida sobre el electrodo de VC/Glut.

Por otra parte, cuando se traza el voltamperograma sobre el electrodo de VC/Glut y la enzima adsorbida en presencia de inulina, se advierte que existe una modificación en la forma del voltamperograma con respecto a 3^a. Además se observa un aumento de corriente que genera una meseta de oxidación (b1), que con respecto a a1 aparece a un potencial menos positivo. También existe una meseta de reducción (b2) que presenta una ligera modificación con respecto a a2. Estas mesetas son atribuidas a la producción de fructosa y glucosa por la reacción enzima-sustrato. La forma de las mesetas b1 y b2 hace difícil definir en qué potenciales se localizan.

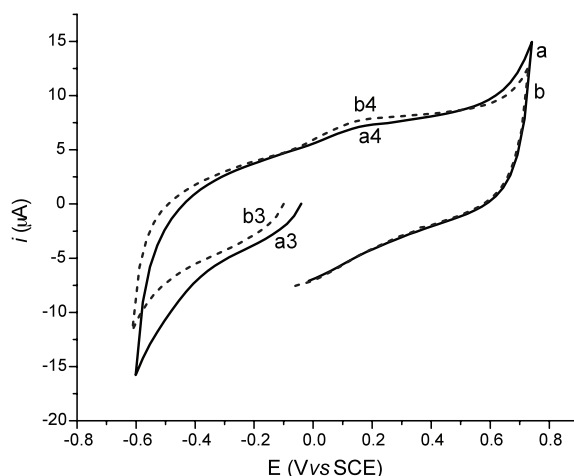
Figura 3. Voltamperograma trazado para el electrodo de carbón.



a) Modificado con glutaraldehído y con la enzima adsorbida y b) el electrodo modificado con glutaraldehído y con la enzima adsorbida en presencia de 1M de inulina. El barrido de potencial es iniciado en dirección positiva a partir del OCP, utilizando como electrolito soporte solución amortiguadora de citratos 0.1M a pH 5 y a una velocidad de 100 mV/s.

En la figura 4 se muestran los voltamperogramas cuando el barrido de potencial se inicia en dirección negativa, obtenidos para el electrodo de carbón vítreo modificado con glutaraldehído (VC/Glut) y con la enzima adsorbida (ver figura 4a), y con el electrodo VC/Glut y con la enzima adsorbida en presencia de inulina (ver figura 4b). Como se observa, el comportamiento de la enzima adsorbida sobre VC/Glut (ver figura 4a) es similar al mostrado cuando el barrido de potencial se inicia en dirección positiva (ver figura 3a) y también se observa un aumento de corriente que genera una meseta de oxidación (a3) y una de reducción (a4). De igual forma, para el voltamperograma trazado sobre el VC/Glut con la enzima, se advierte una meseta de reducción (b3) y una de oxidación (b4). La forma de las cuatro mesetas mencionadas hace difícil determinar el potencial en el que se localizan.

Figura 4. Voltamperograma trazado para el electrodo de carbón.



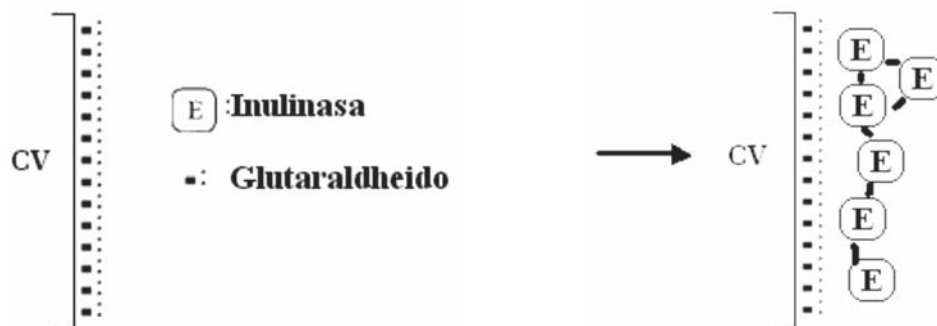
a) Modificado con glutaraldehído y con la enzima adsorbida y b) el electrodo modificado con glutaraldehído y con la enzima adsorbida en presencia de 1M de inulina. El barrido de potencial es iniciado en dirección negativa a partir del OCP, utilizando como electrolito soporte solución amortiguadora de citratos 0.1M a pH 5 y a una velocidad de 100 mV/s.

Cabe mencionar que se obtuvieron también voltamperogramas para el electrodo de carbón vítreo modificado con glutaraldehído, con el fin de comparar el comportamiento del VC/Glut sin y con la presencia de la enzima. En dichos voltamperogramas no se observa algún incremento de corriente.

Discusión

Para visualizar el efecto que tiene el electrodo de carbón vítreo pulido y después con el electrodo modificado, a una velocidad de barrido de 100 mV/s y usando como electrolito de soporte una solución amortiguadora de citratos 0.1 M a pH 5, en la figura 5 se esquematiza el procedimiento.

Figura 5. Esquema de inmovilización enzimática sobre superficie modificada de carbón vítreo con glutaraldehído como soporte enzimático.



La estrategia empleada para inmovilizar a una enzima no sólo incluye las consideraciones de cómo lograr la inmovilización, sino también la selección del medio más apropiado, por lo que se consideró tomar en cuenta las propiedades fisicoquímicas deseadas del polímero inmovilizante de acuerdo con Worsfold (1995) y, con ello, del sistema enzima-sustrato-producto. Además de esta consideración, también se tienen que cubrir otros requerimientos básicos; por ejemplo, un acarreador debe poseer la forma geométrica conveniente y las dimensiones apropiadas e igualmente tiene que cumplir con ciertos requerimientos de estabilidad química, permeabilidad, rigidez, estabilidad mecánica y debe poderse eliminar la unión entre el acarreador y el ligando para posibilitar el avance de la reacción.


Al efectuar ensayos amperométricos (ver figura 1a) con la enzima libre en solución amortiguadora de citratos, el ligero desplazamiento podría atribuirse a la enzima disuelta en el medio. Por otra parte, en el voltamperograma trazado para la enzima y la inulina disueltas en el medio (ver figura 1c), se advierte nuevamente un cambio en la forma del voltamperograma con respecto a la figura 1a y 1b en la reducción, lo cual puede indicar la presencia de los productos de la reacción enzima-sustrato.

Se puede advertir y comparar en la figura 1 y 2 que la presencia de la enzima libre, al modificar la corriente, nos confirma que es posible estudiarse por este método electroquímico. Sin embargo, en solución resulta difícil identificar potenciales de oxido-reducción. Por ello, se ha optado por inmovilizar la enzima sobre un electrodo de carbón vítreo modificado con glutaraldehído.

Hasta este trabajo se reporta estabilidad enzimática a pH 5. Sin embargo, deberán esclarecerse las condiciones de pH en que se lleva a cabo el intercambio directo de carga entre la enzima y el electrodo, permitiendo, entre otras cosas, el desarrollo de biosensores (Calvo, 1997).

Conclusión

La caracterización voltamperométrica en una solución amortiguadora de citratos (0.1 M), sobre la superficie de un electrodo de carbón vítreo modificada con glutaraldehído, mostró ser un método que posibilita evaluar la actividad de la enzima. Sin

embargo, este intercambio es un proceso fenomenológico muy complejo que requiere de diferentes estrategias experimentales para lograr el intercambio directo, lo cual representa un reto para el experimentador. Por este motivo, algunos mediadores han sido empleados para la fabricación de biosensores, ya que facilitan el intercambio directo de carga entre la enzima y el electrodo. De la misma manera la variación de pH será crucial en otros trabajos para poder evaluar la transferencia de carga en alguno de los sitios activos de la enzima. 

Referencias

- Aitken S., Ouellet M., Percival. M. (2003). Mechanism of horseradish peroxidase inactivation by benzhydrazide: a critical evaluation of arylhydrazides asperoxidase inhibitors. *Biochemical Society*. 1 – 34.
- Calvo E. y Danilowicz C. (1997). Amperometric Enzyme Electrodes. *J. Braz. Chem. Soc.* 8, 563-574.
- Pandey A., Soccol C., Selvakumar P., Soccol V.T. Krieger N. Fontana J. (1999). Recent developments in microbial inulinases its production, properties, and industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Volume 81. Number 1. Julio 35-52.
- Ruzgas, T. Csoregi E. Emneus J. Gorton L. Marko-Varga G. (1996). Peroxidase-modified electrodes: fundamentals and application. *Anal. Chem. Acta.* 330, 123-138.
- Serrano, S.R., (1994). *Introducción a la aplicación de enzimas*. Novo España S.A. 39-95.
- Singh, Prabhjeet, Kaur Gill, Prabhjeet (2006). Production of inulinases: Recent Advances. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2) pp151-162.
- Taylor, R.F. (1991). *Protein Immobilization: fundamentals and applications*, Marcel Dekker, New York.
- Ukeda H., Fujita Y., Ohira M. y Sawamura M. (1996). Immobilized Enzyme-Based Microtiter Plate Assay for Glucose in Foods. *Agric. Food Chem.* 44 (12), 3858 -3863.
- Vuilleumier, S. (1993). Worldwide production of high-fructose syrup and crystalline fructosa, *Am. J. Clin. Nutr.* 58 (suppl) 733S-6S.
- Wingard M., Matsueda G. y R.S. Wolfe (1972). Myxobacter bond cleavage on the amino side of lysine. *J. of Bact.* 112: 940-949.
- Worsfold P. J. (1995). Clasificación and chemical characteristics of immobilized enzymes. *Pure and Appl. Chem.* 67 597-800.
- Zhang S., Wright G. y Yang Y. (2000). Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosensors & Bioelectronics* 15 273–282.