



## 27. Agroalimentar

### **Efecto del pH en genipina usada como agente de inmovilización para $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* en esferas de quitosano**

Esparza Flores, Elí Emanuel; Dias Cardoso, Fernanda; Bertoldo Siqueira, Larissa; Klein, Manuela P.\*; Hertz, Plinho F.

eli.esparza.f@gmail.com;

Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos; Departamento de Nutrição\*

Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre\*

#### **Resumen**

En este trabajo fue inmovilizada la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* en esferas de quitosano, usando genipina como agente de entrecruzamiento. Para dicho objetivo se evaluó el pH de activación del soporte; luego, se determinó la efectividad de dicho proceso evaluando la actividad enzimática, el mejor pH fue 9.0 y con éste se obtuvo un rendimiento de inmovilización de 86.1 %, eficiencia de 43.2 %, actividad retenida de 37.5 % y actividad específica de 769.2 U g<sup>-1</sup> de soporte. Al final fue analizada la estabilidad térmica, encontrando que la enzima inmovilizada es 2.0 veces más estable que la libre a 50 °C y 1.6 veces a 60 °C; así como la estabilidad operacional, donde después de 40 lotes, se mantuvo el 100 % de la actividad enzimática.

**Palabras clave:** genipina, quitosano,  $\beta$ -galactosidasa, inmovilización enzimática.

#### **Introducción**

La inmovilización de enzimas es una gran alternativa para su uso en sistemas industriales, por la estabilidad (reutilización) que dicho proceso trae y la disminución de costos. El extendido uso de  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -GAL), no sólo atiende al creciente mercado que demanda productos sin lactosa, pues también mejora las características organolépticas de alimentos a base de leche. Para la inmovilización de  $\beta$ -GAL se ha utilizado glutaraldehído

(GLU), comprobadamente citotóxico, lo que limita su uso en alimentos; como alternativa en este trabajo se utilizó genipina (GEN), pigmento natural 10,000 veces menos tóxico que el GLU, presente en los frutos de *Gardenia jasminoides* y *Genipa americana* L., el cual ha demostrado ser una excelente alternativa para su aplicación en bioprocesos que involucran enzimas (Bellé, et al., 2018).

## Objetivos

Determinar las mejores condiciones para la inmovilización de  $\beta$ -GAL de *A. oryzae* en esferas de quitosano usando GEN como agente de entrecruzamiento. Evaluar la estabilidad térmica y operacional del producto obtenido.

## Materiales y Métodos

Las esferas de quitosano fueron preparadas de acuerdo con la metodología de Klein, et al., (2012). La GEN fue disuelta en soluciones con diferentes pH (4.0 – 12.0) en concentración de 1.5 mg mL<sup>-1</sup>. Así, fue colocado 20 mg de esferas (peso seco) en 5 mL de la solución de GEN y colocado en un baño maría por 1 h a 60 °C. Pasado el tiempo, el soporte fue lavado con agua destilada y adicionada la solución de  $\beta$ -GAL 10 U mL<sup>-1</sup> en buffer acetato de sodio pH 4.5. Se dejó en agitación toda la noche para favorecer el contacto enzima-soporte y así, la inmovilización.

Se realizó la actividad enzimática usando como substrato una solución de o-nitrofenil-galactopiranosídeo (ONPG) 28 mM. La determinación fue realizada en espectrofotómetro a 415 nm.

Al final fue analizada la estabilidad térmica del producto obtenido a 50 °C y 60 °C y la estabilidad operacional usando lactosa al 5 % (p/v). Para eso, se adicionó 48 mg de soporte en 4 mL de la solución mencionada a 40 °C por 250 min en agitación.

## Resultados y Discusión

A partir de los experimentos realizados, conforme a la metodología expuesta, se encontró que el pH fue un factor de gran impacto en el rendimiento y eficiencia de la inmovilización, reflejándose así en la actividad residual y específica del producto obtenido.

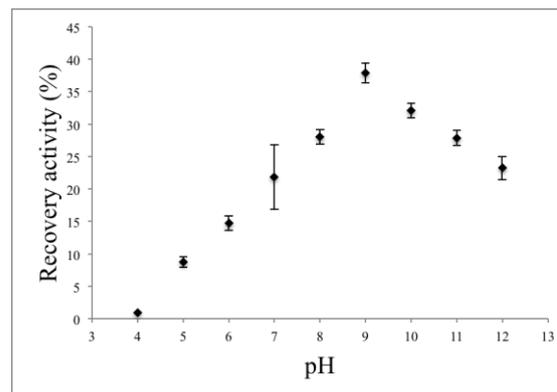


Fig. 1 Influencia del pH durante la activación en la actividad retenida (◆).

El mejor pH para la activación del soporte, como puede observarse en Fig. 1 Influencia del pH durante la activación en la actividad retenida (◆), fue 9.0, con un rendimiento de la inmovilización de 86.2 %, la eficiencia de 43.2 %, la actividad retenida fue de 37.5 % y actividad específica de 769.2 U g<sup>-1</sup> de soporte la activación con distintos pHs resultó en actividades retenidas distintas, esto porque la polimerización de la GEN depende del pH medio de reacción (Reddy, Reddy, & Jiang, 2015; Jahren, Butler, Adams, & Cameron, 2011), lo cual incluso pudo ser confirmado por las diferentes tonalidades de azul que el soporte adquirió en cada pH (desde azul claro en pH ácido, hasta azul verdoso muy oscuro en pH alcalino). Además, factores como el tiempo, temperatura, pH y con-

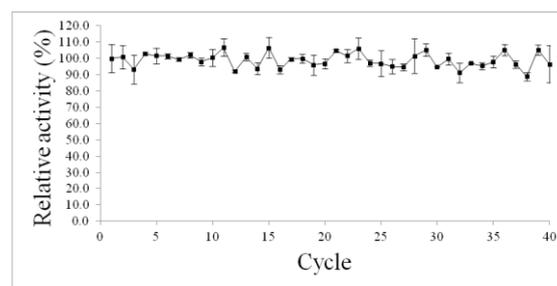
centración de la GEN en el medio de reacción inciden directamente en la polimerización de este compuesto (Tillet, Boutevin, & Ameduri, 2011; Neri-Numa, Pessoa, Paulino, & Pastore, 2017).

Se observó que en pHs bajos, la actividad retenida (AR) caía drásticamente (pH 4; AR 1.0 %), mientras que en pHs mayores la diferencia aunque significativa, era menor (pH 12; AR 23.2 %), lo cual puede explicarse, ya que en condiciones básicas, aun cuando la GEN presenta una mayor polimerización interna, también forma cadenas largas con más grupos libres para formar enlace, ya en condiciones ácidas, estas cadenas son pequeñas y rígidas, haciendo que existan menos posibilidades de enlace y de la enzima mantener su funcionalidad (Delmar & Bianco-Peled, 2015; Muzzarelli, 2009).

A partir del análisis de la estabilidad térmica del producto obtenido, se encontró que a 50 °C, la enzima inmovilizada alcanzó un tiempo de media vida de 89.2 h y para la enzima libre de 43.8 h, es decir, 2.0 veces más estable siendo inmovilizada; a 60 °C los resultados fueron de 44.3 y 28.0 min respectivamente para la enzima inmovilizada y libre; o sea, más estable 1.6 veces; lo anterior puede explicarse por la matriz polimérica que se forma entre la enzima, genipina y quitosano por enlaces covalentes, que aumenta la rigidez conformacional de la enzima, dándole una mayor estabilidad y tolerancia a las mudanzas que puedan ocurrir en el

medio de reacción comparado con la enzima libre (Bhandari, Gupta, & Hari, 2009).

Por último, la capacidad de reúso de una enzima inmovilizada ofrece una ventaja sobre la enzima libre en su aplicación industrial para la reutilización, estabilidad y consecuentemente la reducción de costos (Sheldon & van Pelt, 2013), en este trabajo como aparece en la Fig. 2 Estabilidad operacional. **Ciclos de 250 min a 40 °C usando solución de lactosa al 5 % (p/v).** consiguió reusarse el producto obtenido por 40 ciclos, manteniendo el 100 % de la actividad inicial, lo cual indica una alta estabilidad y eficiencia.



**Fig. 2 Estabilidad operacional.** Ciclos de 250 min a 40 °C usando solución de lactosa al 5 % (p/v).

## Conclusiones

Logró inmovilizarse la enzima  $\beta$ -GAL con una alta actividad residual y específica. Así, pudo obtenerse un producto muy estable frente a la temperatura cuando comparado con la enzima libre y con un excelente desempeño en un proceso a micro escala, prometiendo así un gran potencial de uso industrial.

## Bibliografía

Bellé, A. S., Hackenhaar, C. R., Spolidoro, L. S., Rodrigues, E., Klein, M. P., & Hertz, P. F. (2018). Efficient

- enzyme-assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana* L.) and its application as a crosslinker for chitosan gels. *Food Chemistry*, 266-274.
- Bhandari, S., Gupta, V. K., & Hari, S. (2009). Enhanced stabilization of mungbean thiol protease immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan beads. *Biocatalysis and Biotransformation*, 71-77.
- Delmar, K., & Bianco-Peled, H. (2015). The dramatic effect of small pH changes on the properties of chitosan hydrogels crosslinked with genipin. *Carbohydrate Polymers*, 28-37.
- Jahren, S. L., Butler, M. F., Adams, S., & Cameron, R. E. (2011). Predictive modelling of the swelling behaviour of polyelectrolytic chitosan hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 769-773.
- Klein, M. P., Nunes, M. R., Rodrigues, R. C., Benvenutti, E., Costa, T. M., & Hertz, P. F. (2012). Effect of the support size on the properties of  $\beta$ -galactosidase immobilized on chitosan: Advantages and disadvantages of macro and nanoparticles. *Biomacromolecules*, 27-36.
- Muzzarelli, R. A. (2009). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 1-9.
- Neri-Numa, I. A., Pessoa, M. G., Paulino, B. N., & Pastore, G. M. (2017). Genipin: A natural blue pigment for food and health purposes. *Trends in Food Science & Technology*, 271-279.
- Reddy, N., Reddy, R., & Jiang, Q. (2015). Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 362-369.
- Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *The Royal Society of Chemistry*.
- Tillet, G., Boutevin, B., & Ameduri, B. (2011). Chemical reactions of polymer crosslinking and post-crosslinking at room and medium temperature. *Progress in Polymer Science*, 191-217.

### Financiamiento

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) y Consejo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).