

3. Resultados

3.1.1 Inmovilización de peroxidasa de rábano

La inmovilización de la peroxidasa de rábano en sílice, únicamente fue llevada a cabo en placas petri de vidrio; con el demás material de vidrio se presentaron dificultades y la inmovilización no se pudo llevar a cabo.

La enzima fue inmovilizada en sílice de manera covalente gracias a sus grupos amino libres, y en las nanopartículas por adsorción física. La cantidad de enzima inmovilizada se intentó determinar por medio del método de Bradford, sin embargo la concentración de enzima en los sobrenadantes era demasiado pequeña para ser detectada

por éste método. Por ello se midió la velocidad inicial de la peroxidasa a diferentes concentraciones (Fig. 1), se realizó una curva de calibración con las pendientes generadas por cada concentración en el minuto 9 de la reacción (Fig. 2) y se comparó con las velocidades iniciales de la enzima inmovilizada (1 ml de solución en el caso de las nanopartículas). De esta forma se puede tener un estimado de la concentración de enzima inmovilizada. En la Tabla 1 se muestra la cantidad de enzima añadida al sistema para inmovilizar, la cantidad de enzima inmovilizada en gramos y porcentaje, así como la actividad específica de la enzima en cada sistema y el total de enzima usada en cada reacción enzimática.

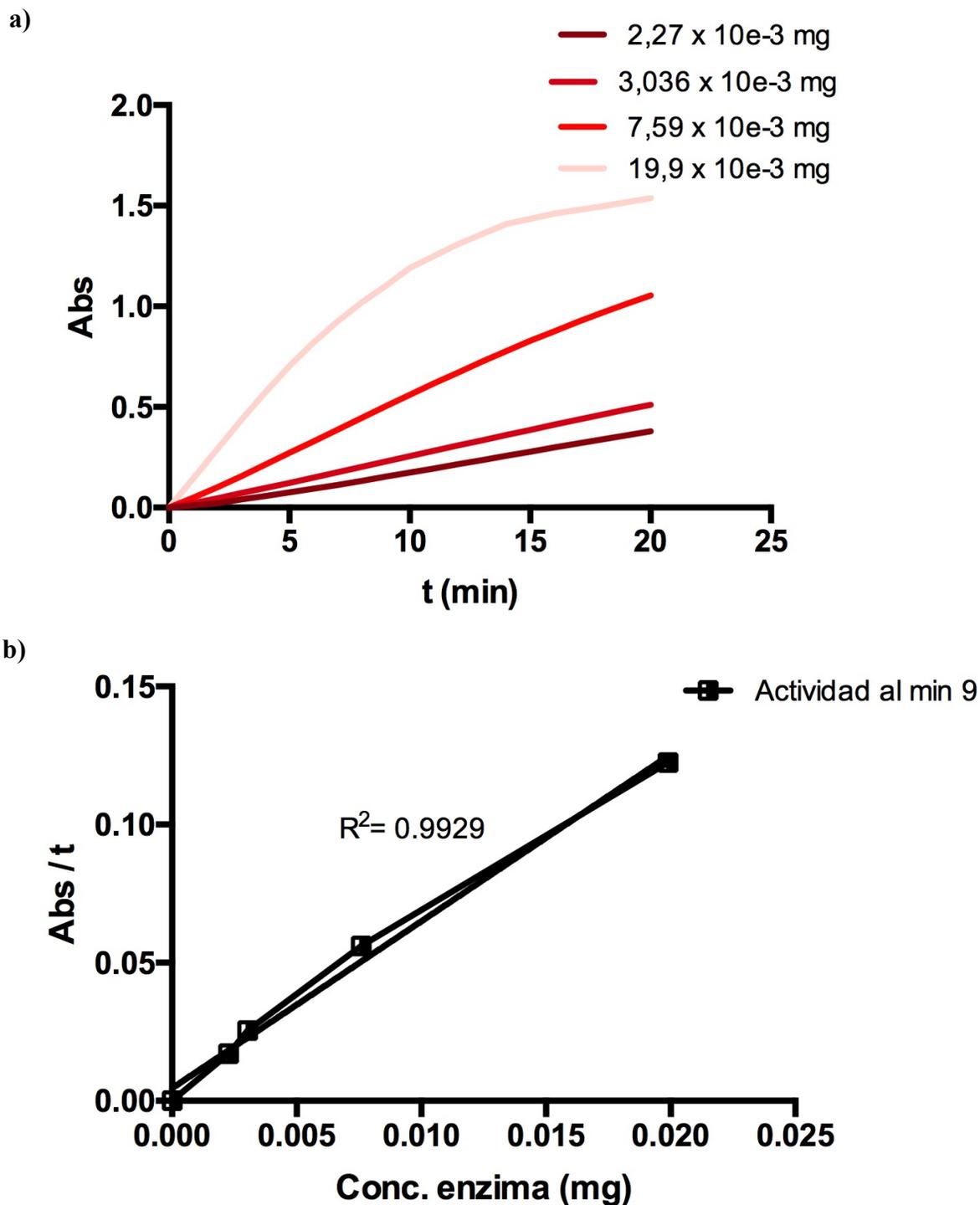
Tabla 1: Inmovilización enzimática

	Silice	MnFe2O4	CoFe2O4
Enzima añadida (mg)	0.02	0.64	0.64
Cantidad de sistema	65 cm ²	2g partículas 11 ml solución	2g partículas 11 ml solución
Enzima inmovilizada (mg)	0.0039	0.111	0.0665
Enzima inmovilizada (%)	19.75	17	10.4
Enzima usada en reacción (mg)	3.9 x10 ⁻³	10.09 x10 ⁻³	6.05 x10 ⁻³
Actividad específica (µg/min)	2.937	4.517	2.193

Figura 1.

a) Velocidades iniciales de peroxidada a diferentes concentraciones.

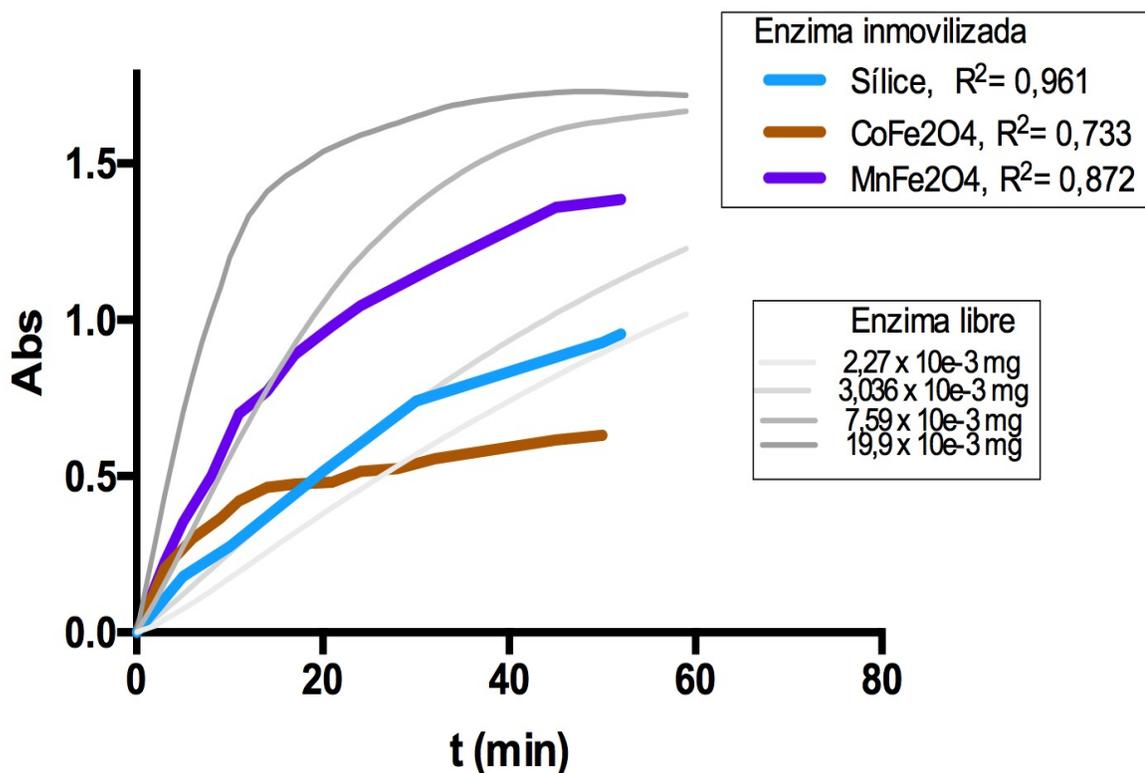
b) Regresión lineal; velocidades iniciales de peroxidasa a distintas concentraciones



3.1.2 Actividad enzimática

En la figura 3 se muestran las actividades de la enzima inmovilizada en los tres sistemas, en comparación con la actividad de la enzima libre a diferentes concentraciones. . El sistema con mayor actividad después de 1 hora de reacción (Fig. 3) fue el de manganeso (MnFe_2O_4) con absorbancia máxima de 1.41, seguido por el de sílice con absorbancia de 1.02 y al final el de cobalto (CoFe_2O_4) con 0.625. La absorbancia máxima de la enzima libre fue de 1.69. En la figura se observa en el fondo la actividad de la enzima libre a diferentes concentraciones como comparación a los sistemas inmovilizados.

Figura 2. Actividad enzimática de peroxidada inmovilizada.



Con cada sistema se llevó a cabo a medición de la actividad enzimática en dos soluciones de concentración fenólica distinta, una con una concentración 0.1 M y otra 5 mM. Además se reutilizó la enzima inmovilizada y midió el porcentaje de actividad conforme el número de veces utilizada. En la tabla 2 se muestra la actividad máxima de la enzima inmovilizada en los 3 sistemas tras una hora de reacción, comparándolas con la actividad máxima de la enzima libre, mostrando también la cantidad de enzima en miligramos que se utilizó en cada reacción y el tiempo transcurrido para dicha absorbancia máxima.

Tabla 2: máxima actividad de enzima inmovilizada y enzima libre.

	Enzima usada (mg)	Max. Abs (Fenol 0.1M)	Max. Abs (Fenol 5mM)	Tiempo de reacción (min)
Enzima libre	19.9 x10 ⁻³	1.69 (100%)	0.68 (100%)	2
Silice	3.9 x10 ⁻³	1.02 (60.35%)	0.56 (82.35%)	60
MnFe2O4	10.09 x10 ⁻³	1.41 (83.43%)	0.63 (92.64%)	60
CoFe2O4	6.05 x10 ⁻³	0.625 (36.98%)	0.33 (48.52%)	60

3.1.3 Reutilización de enzima inmovilizada

Los sistemas con la enzima inmovilizada se reutilizaron hasta 3 veces dependiendo del soporte y la concentración de fenol. En las siguientes figuras (Fig. 3, 4, 5, 6) se muestra la actividad enzimática de los tres soportes a concentraciones fenólicas 0.1 M y 5 mM; se observa la actividad durante tres ciclos de uso. En la tabla 3 se expresa la máxima actividad de cada ciclo en porcentaje, tomando como cien por ciento la actividad máxima del primer ciclo. La inmovilización en ferrita de cobalto y ferrita de manganeso con solución de fenol 5 mM solo se reutilizó 2 veces.

Figura 3: Actividad enzimática tras reutilización.

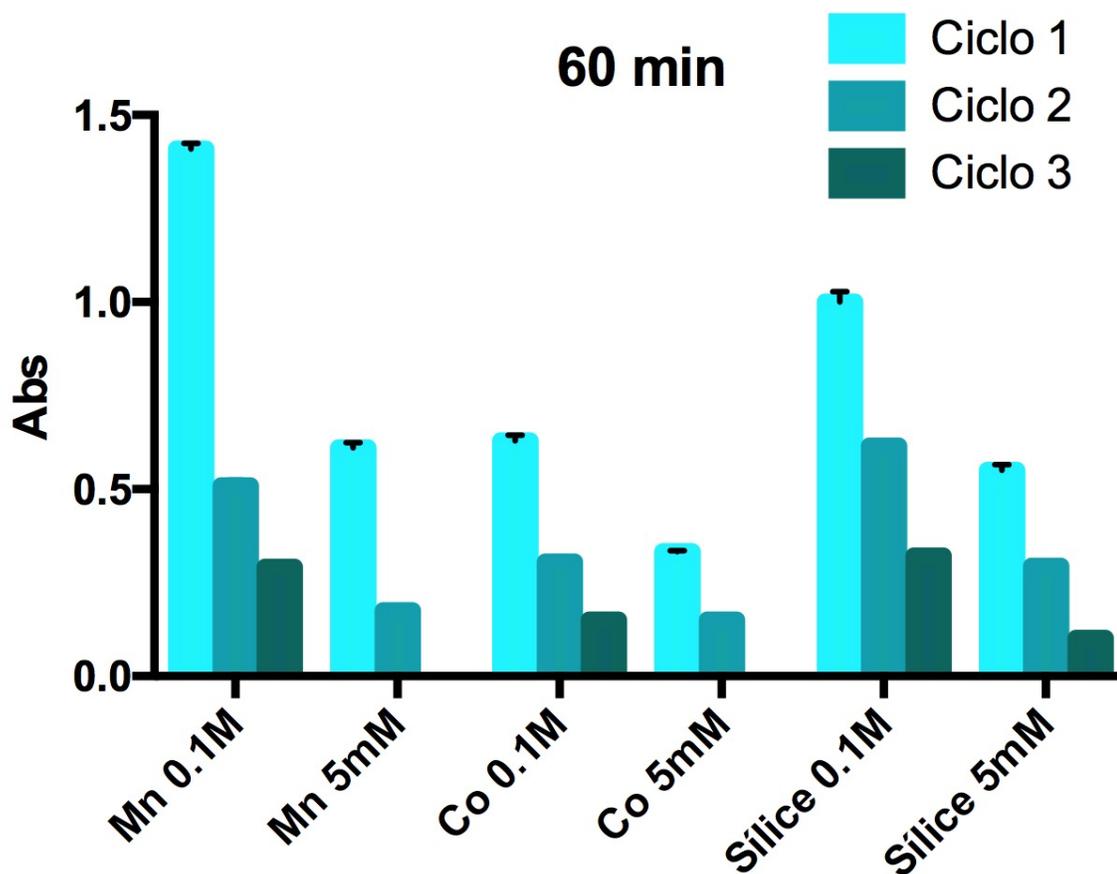


Figura4:
Inmovilización covalente en sílice. Actividad enzimática en fenol 0.1M (a) y 5 mM (b).

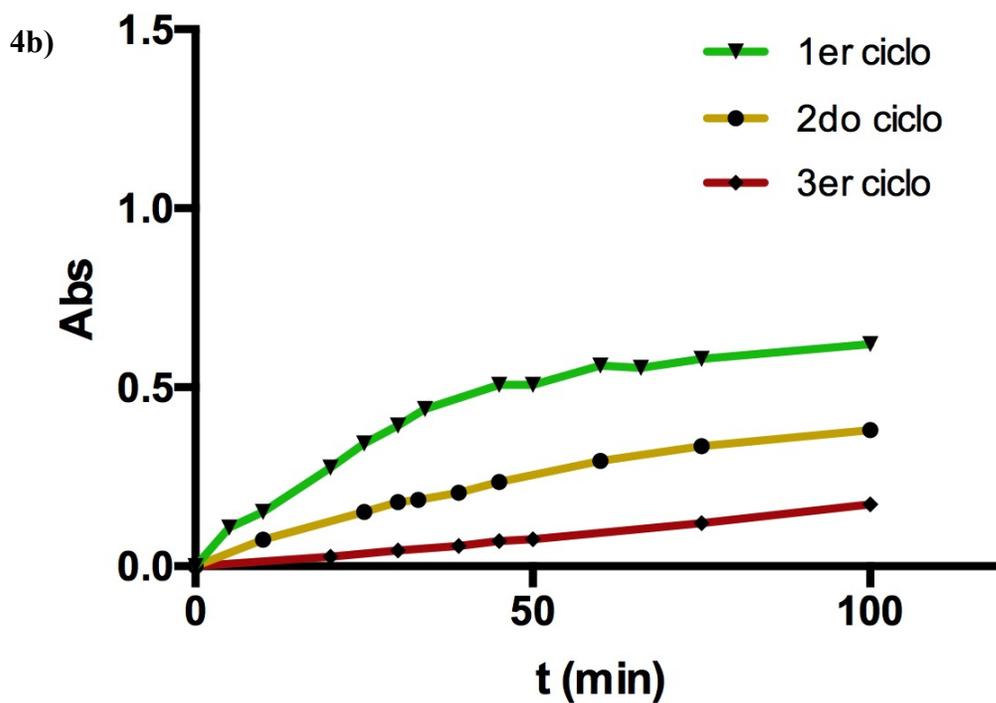
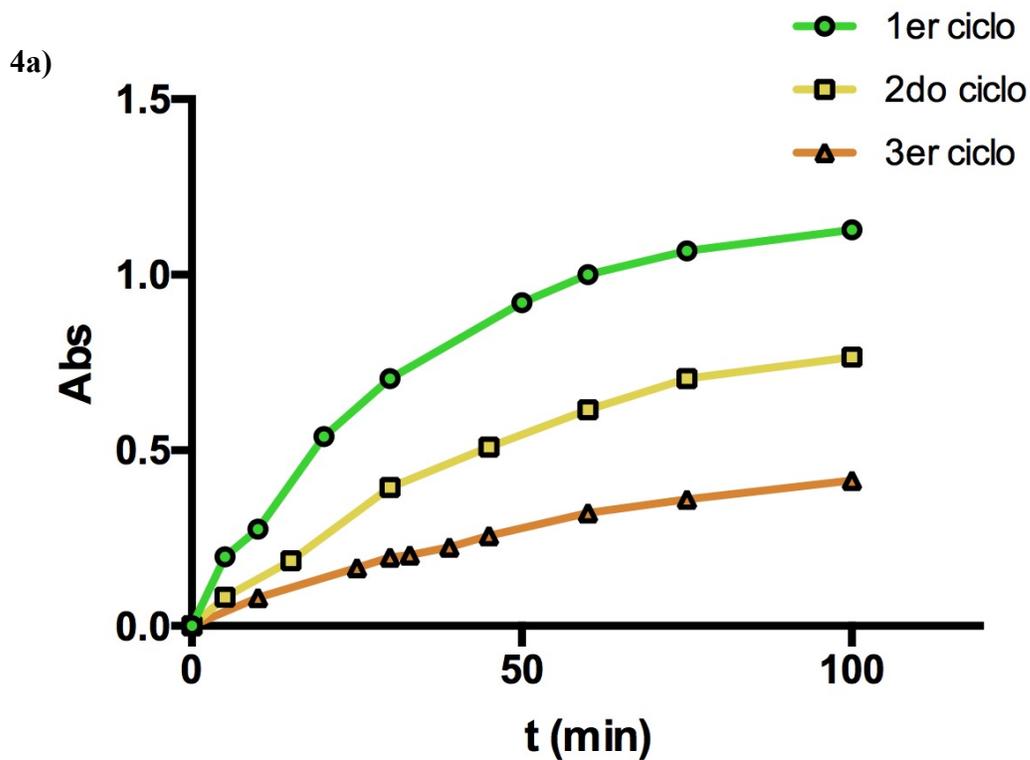


Figura 5: Inmovilización en MnFe₂O₄. Actividad enzimática en fenol 0.1M (a) y 5 mM (b)

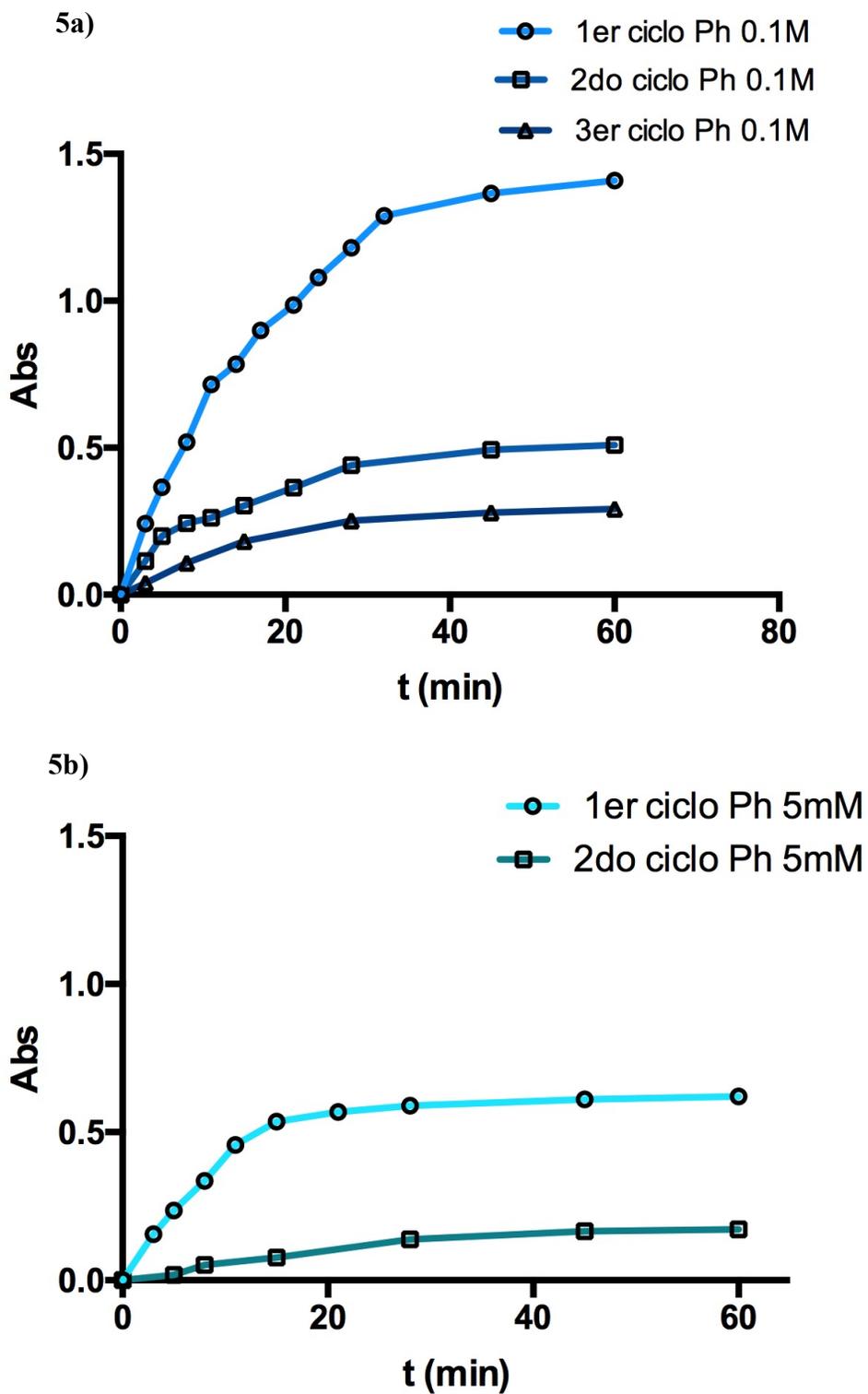


Figura 6:
Inmovilización en CoFe_2O_4 . Actividad enzimática en fenol 0.1M (a) y 5 mM (b)

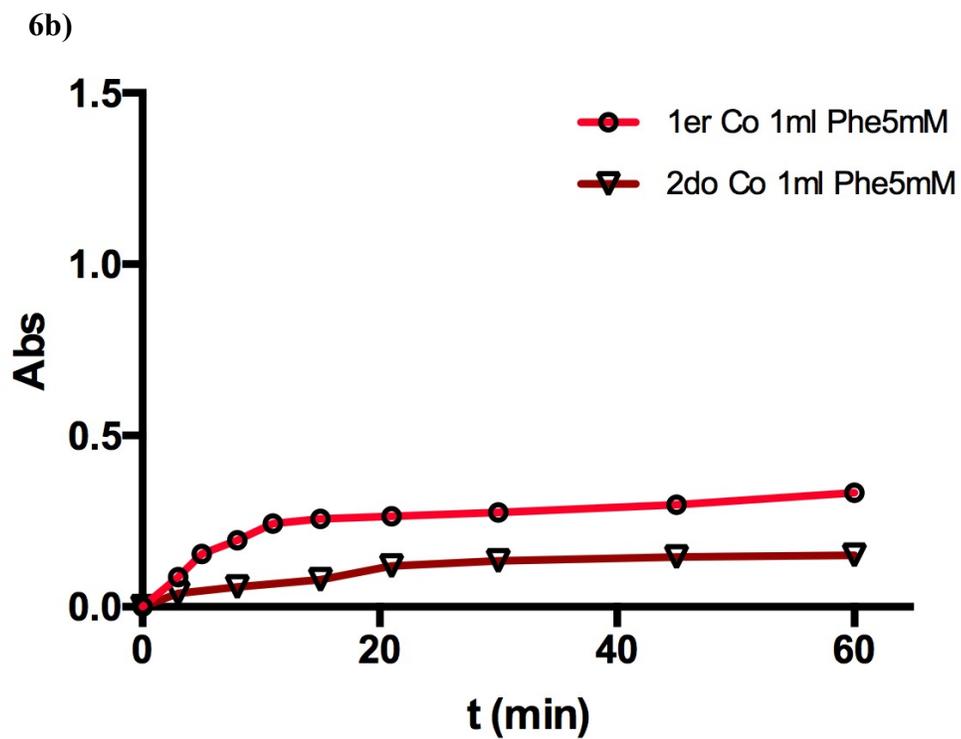
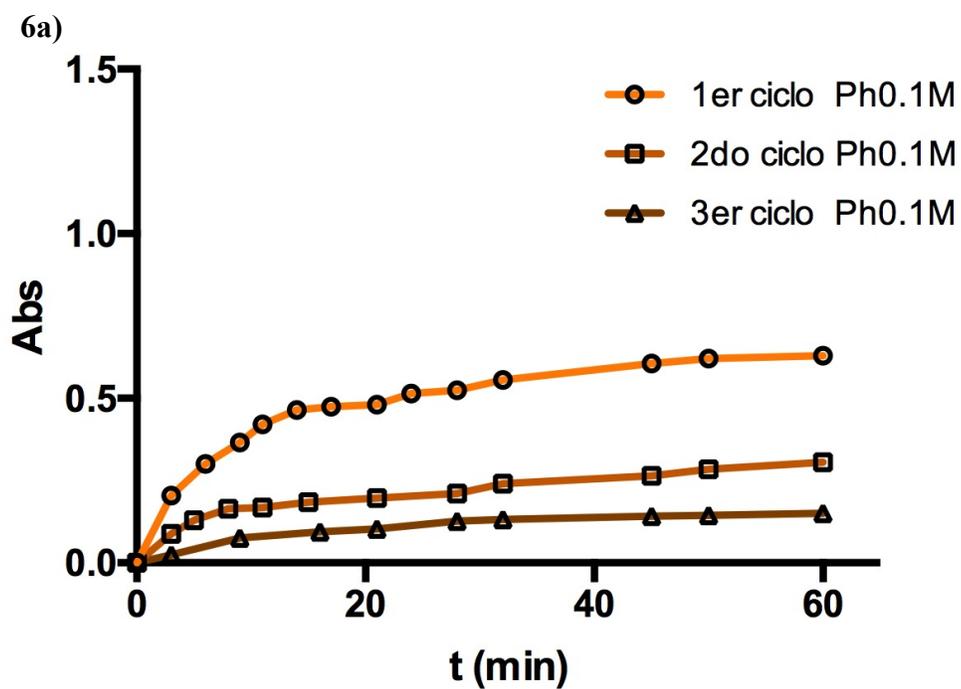


Tabla 3: Porcentaje de actividad enzimática tras reutilización.

	MnFe₂O₄ (Fenol 0.1M)	MnFe₂O₄ (Fenol 5mM)	CoFe₂O₄ (Fenol 0.1M)	Co Fe₂O₄ (Fenol 5mM)	Sílice (Fenol 0.1M)	Sílice (Fenol 5mM)
Ciclo 1	1.41 100%	0.61 100%	0.63 100%	0.33 100%	1.02 100%	0.55 100%
Ciclo 2	0,51 36%	0.174 28%	0.305 48.4%	0.15 45.45%	0.61 60.3%	0.295 53.63
Ciclo 3	0.29 20.5%		0.15 23.8%		0.32 31.3	0.1 18.18%