BIER8

**Caracterización de una pectinasa enológica inmovilizada en hidrogeles**

**de alginato de calcio**

Ninago, D.M.1,2; Martín, M.C.3,4; Merín, M.G. 3,4; Bignert, M.C. 3,4; Longhi, S.J. 3,4; López, O.V.1; Ciolino, A.E.1,5; Villar, M.A.1,5; Morata, V.I. 3,4

1) Planta Piloto de Ingeniería Química, PLAPIQUI (UNS–CONICET); 2) Departamento de Ingeniería Química–Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria–Universidad Nacional de Cuyo; 3) Laboratorio de Biotecnología–Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria–Universidad Nacional de Cuyo; 4) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); 5) Departamento de Ingeniería Química–Universidad Nacional del Sur. mbignert@fcai.uncu.edu.ar

Las pectinasas son un grupo heterogéneo de enzimas polisacaridasas que degradan sustancias pécticas presentes en la lamela media y pared celular primaria de las plantas. Son ampliamente utilizadas para la clarificación de jugos de frutas y vegetales, así como también en la industria vitivinícola. Sin embargo, cuando las enzimas libres son empleadas, éstas se solubilizan en el medio de reacción y su recuperación y reúso resulta complejo. La inmovilización de enzimas en una estructura de tipo gel, mediante la técnica de entrampamiento, resulta una alternativa factible para minimizar estos inconvenientes. Por su parte, el alginato de sodio es un biopolímero usado para la formación de hidrogeles debido a que puede intercambiar sus cationes sodio por cationes divalentes, formando una red tridimensional. En la presente investigación, se estudió la inmovilización de una pectinasa enológica comercial en hidrogeles de alginato de calcio y su caracterización, tanto micro-estructural del biomaterial obtenido, como de su actividad enzimática.

Los hidrogeles se prepararon por gelación externa a partir de soluciones acuosas, con una relación volumétrica 1:1 de alginato de sodio al 2 % (m/v) y solución de la pectinasa al 0,3 % (m/v), empleando como agente de entrecruzamiento cloruro de calcio al 2,5 % (m/v). La actividad enzimática se determinó mediante la liberación de azúcares reductores a partir de una dispersión de pectina al 0,25%, utilizando el reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

La morfología y apariencia de los hidrogeles cargados de pectinasa se estudiaron mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM). Para la visualización de las superficies y las secciones trasversales, los hidrogeles fueron crio-fracturados y metalizados. Las pectinasas presentaron formas pseudo-esféricas con bordes irregulares y la formación de agregados de mayor tamaño. Los hidrogeles sin enzima mostraron una superficie de fractura homogénea y la ausencia de grietas o irregularidades, mientras que en los hidrogeles compuestos se observó una buena distribución de la enzima en toda la matriz, tanto en la superficie como en su interior. A partir de ensayos de Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) se evidenció la presencia de bandas asociadas a los grupos funcionales de las enzimas presentes en la matriz de alginato de calcio.

Por otra parte, se estudió el efecto de la temperatura y del pH sobre la actividad enzimática de la pectinasa libre e inmovilizada. Se observó que la inmovilización no afectó la temperatura óptima de trabajo de la enzima, y que la máxima actividad, tanto de la pectinasa libre como de la inmovilizada, fue encontrada a 50 ºC. Con respecto al pH, la enzima libre mostró la máxima actividad en el rango de 3,0 a 4,0; mientras que el pH óptimo de la pectinasa inmovilizada fue de 4,0. Es importante resaltar que la pectinasa inmovilizada en los hidrogeles de alginato de calcio mostró una alta estabilidad, manteniendo su actividad inicial hasta 11 semanas, bajo condiciones de almacenamiento tradicionales (4 ºC y pH 3,8).

De acuerdo a los resultados obtenidos, y en concordancia con otros autores, el alginato de calcio es un muy buen agente de entrampamiento para la pectinasa en estudio, presentando una metodología de trabajo simple y de bajo costo, que permitiría el uso de este biocatalizador en el proceso de vinificación.