

CARACTERIZACION Y EVALUACION DE SISTEMAS BIFASICOS ACUOSOS PARA LA PURIFICACION DE UNA LIPASA DE *ASPERGILLUS NIGER* J-1

Janny Coca Armas¹, Ana I. Lazo Montesino¹, Yaisel Vázquez Ruiz¹, José L. Hernández Martínez²
¹Div. de Inocuidad de los alimentos y Sanidad, CIP. Santa Fé, Playa, Ciudad Habana, Cuba. Tel. 415-15-57-52, Fax: 415-95-34. ²Dpto. de Biotecnología. Facultad de Ciencias Químicas. U.A. de C. Blvd. V. Carranza y J.C. Valdez, Saltillo, Coah. 25250. Email: jose-martinez@mail.uadec.mx

Palabras clave: lipasa, purificación, sistemas bifásicos

Introducción. Los procedimientos descritos para la purificación de lipasas, incluyen etapas de precipitación y cromatográficas (Hiol y cols., 2000), lográndose usualmente la parcial purificación de la enzima de interés con altos consumos de tiempo y bajos recobrados finales. Recientemente, nuevas tecnologías de purificación han sido aplicadas, tales como, fase reversa; ultrafiltración e inmunopurificación, resultando no económicas para procesos industriales a gran escala. En este sentido, la separación de sistemas bifásicos acuosos (SBA) ha constituido en la actualidad, una alternativa para la separación y purificación de mezclas de proteínas debido a las múltiples ventajas que ofrecen.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar y caracterizar los sistemas bifásicos acuosos formados por PEG y sal para la purificación de una lipasa expresada por *Aspergillus niger*.

Metodología. Se evaluó el empleo del sistema bifásico acuoso compuesto por K_2HPO_4/NaH_2PO_4 -(PEG) Polietilenglicol, para la purificación de una lipasa obtenida por fermentación en estado sólido a partir de una cepa de *A.niger* J-1. Se estudió el efecto de diversos factores sobre el fraccionamiento de la enzima de interés, ellos fueron: masa molar del PEG (400 y 600), pH del medio (6,7 y 8), concentración de los componentes del sistema bifásico, y adición de electrolitos al sistema bifásico ($NaCl$ y Na_2SO_4 al 1; 2,5 y 4 % P/V).

Se cuantificó la actividad lipolítica y la concentración de proteínas totales en las fases y fueron determinados los parámetros coeficiente de partición, recobrado y factor de purificación, con el objetivo de caracterizar y evaluar los sistemas bifásicos empleados

Resultados y discusión. Se observó que los puntos de equilibrio se alcanzaron para concentraciones diferentes de los componentes del sistema. Cuando aumentó el pH del medio, y para un mismo valor de concentración de $K_2HPO_4-NaH_2PO_4$, fue necesaria la adición de menor cantidad de PEG-400 al sistema para la formación de las dos fases. Este efecto se fue acentuando para valores elevados de la sal. Un comportamiento parecido fue obtenido para las curvas binodales de los sistemas formados con PEG de 600, aunque se observó un desplazamiento de los puntos

de equilibrio para los tres valores de pH. El comportamiento del coeficiente de partición (K) de la enzima en el sistema bifásico bajo diversos factores a continuación se muestra.

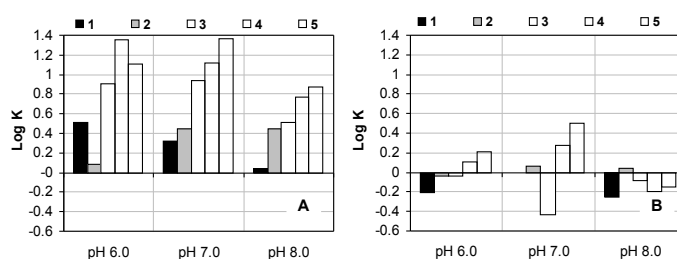


Fig. 1. Efecto de diversos factores sobre el coeficiente de partición de la lipasa de *A.niger* en el sistema PEG / $K_2HPO_4-NaH_2PO_4$ a 22 °C. PEG 400 (A), PEG 600 (B).

Tanto la masa molar del PEG como la concentración de los componentes del sistema bifásico incidieron grandemente sobre el valor de K, y en menor medida el cambio de pH. Se comprobó que la mayor actividad de la enzima de interés se obtuvo en la fase de tope en todos los sistemas donde se empleó PEG-400 ($K > 1$). Sin embargo, en sistemas con PEG-600, estos no mostraron una tendencia regular. Ello pudiera ser atribuido a la combinación de el incremento de la longitud de la cadena del PEG e incremento de la hidrofobicidad en la fase tope. La adición de los electrolitos, incrementó la partición de la enzima de interés respecto al sistema sin adición de electrolito significativamente. Los mayores valores de K se obtuvieron cuando se adicionó Na_2SO_4 al sistema. Se obtuvieron 4 variantes donde se alcanzaron los mejores resultados de purificación de la lipasa.

Conclusiones. El empleo del sistema bifásico PEG/Fosfato permitió lograr la separación de la lipasa de *A. Niger* y se demostró que la masa molar del polímero, la adición de electrolitos y la concentración de los componentes modificaron el coeficiente de reparto de la enzima en el sistema. La enzima fue parcialmente purificada, lográndose factores de purificación superiores a 3 y recobrados de la actividad lipolítica entre 19.5 y 141.1 %.

Bibliografía. Hiol, A, J., M.D, Rugani, N, Druet, D, Sarda, L, Comeau, L.C. (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rs oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb Technol* vol (26): 421-430.