



ESTUDIO DE LA ADSORCIÓN DE TRIPSINA SOBRE UNA MATRIZ INSOLUBLE DE ALGINATO Y GOMA GUAR: SU POTENCIAL APLICACIÓN A LA PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA A PARTIR DE FUENTES NATURALES

Pilar Aravena, Nadia Voitovich Valetti, Guillermo A. Picó

Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos (IPROBYQ - CONICET). Universidad Nacional de Rosario, Argentina. gpico@fbioyf.unr.edu.ar

Palabras clave: alginato, goma guar, tripsina, adsorción.

Introducción: El desarrollo de nuevos métodos de bioseparación es un requerimiento urgente para el avance de la Biotecnología. La etapa de purificación de macromoléculas puede llegar a representar el 80% del costo final del producto [1]. La adsorción de proteínas sobre matrices insolubles es una alternativa viable para solucionar este inconveniente, si se logran desarrollar nuevos adsorbentes de bajo costo y reciclables. En este trabajo se estudió la adsorción de una proteína de alto valor comercial (Tripsina; Trip) sobre una matriz formada por dos polímeros naturales, de bajo costo y biodegradables: alginato (Alg) y goma guar (GG).

Metodología: Se preparó una mezcla de Alg (0,2%P/V) y GG (0,5%P/V). La misma fue goteada sobre CaCl_2 (0,2 M) para obtener esferas uniformes que posteriormente fueron entrecruzadas utilizando epiclorohidrina.

La adsorción de Trip se realizó en batch y se siguió por medidas de actividad enzimática utilizando un reactivo específico: N-benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA). Se determinaron las condiciones óptimas para la adsorción, las curvas de absorción en el tiempo y las isotermas de adsorción en el equilibrio.

Resultados: Como primer paso, se determinaron las condiciones óptimas para la adsorción variando dos factores que influyen notablemente en la adsorción: el pH y la fuerza iónica del medio. Basándonos en resultados previos, el pH se varió entre 4,00 y 6,00 y la fuerza iónica fue variada adicionando NaCl, entre 0 y 200 mM, al medio. Como era de esperarse, ambos parámetros influyen la capacidad de adsorción de la matriz. El pH óptimo para la adsorción es 5,00 con un 81,02 % de proteína adsorbida. La disminución o aumento del pH del medio lleva a una disminución en el porcentaje de proteína adsorbida. Por su parte, el aumento de la fuerza iónica del medio disminuye el porcentaje de proteína adsorbida desde 90,1 % hasta 11,6 % al utilizar la mayor cantidad de sal en el buffer de trabajo. A partir de estos resultados se eligió como buffer de trabajo citrato pH 5,00 25 mM.

La cinética de la adsorción a pH 5,00 presentó una forma exponencial alcanzando el equilibrio a los 10 min de contacto. La figura 1 muestra las isotermas de adsorción de Trip sobre la matriz de Alg-GG obtenidas a dos temperaturas. Los datos obtenidos a 25°C ajustan a la isoterma de Freundlich ($Q=b.C^m$; donde Q es la carga del adsorbato y b y m son constantes), mientras que la

isoterma a 5°C presenta una forma sigmoidea. Se observa también un leve incremento en la capacidad máxima de adsorción del sistema al disminuir la temperatura de trabajo.

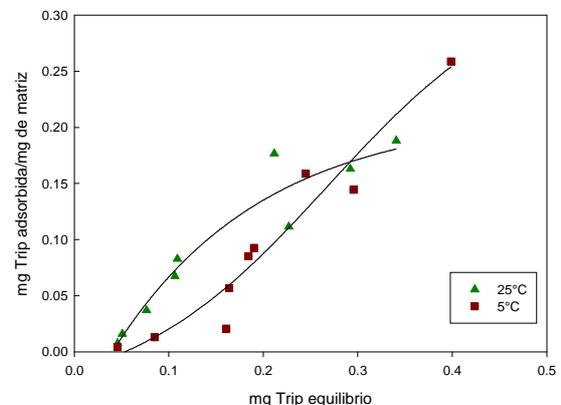


Figura 1. Isotermas de adsorción de Trip a 25°C y 5°C. Medio: buffer citrato 25 mM, pH 5,00

Conclusiones. Durante este trabajo se determinaron las condiciones óptimas para el proceso de adsorción de Trip sobre una matriz insoluble de Alg-GG. Se encontró que el mejor rendimiento de la adsorción se da a pH 5,00 requiriendo de tan sólo 10 min para completarse. Las isotermas de adsorción se mostraron altamente favorables. La variación de las condiciones experimentales del medio afectó notablemente la capacidad de adsorción de la matriz. El efecto del pH y de la fuerza iónica sobre el proceso permite concluir que la interacción entre la Trip y la matriz es de naturaleza principalmente electrostática. Es importante destacar que ninguno de los pasos del proceso afectó la actividad enzimática de la Trip. Los datos obtenidos muestran su potencial para ser aplicados a la purificación de la Trip a partir de fuentes más complejas.

Agradecimientos. Subsidiado por FonCyT –PICT 2012-428. BiValBi Biotechnologies to Valorise the regional food Biodiversity in Latin America, Marie Curie Actions.

Bibliografía.

1.Scopes, R.K., *Protein purification : principles and practice / Robert K. Scopes*. Springer advanced texts in chemistry. 1994, New York :: Springer-Verlag.