

ESTUDIO DE ADSORCION/DESORCION DE POLIGALACTURONASAS DE ORIGEN MICROBIANO SOBRE FILTROS DE FIBRA DE VIDRIO

J.C. Contreras-Esquivel^{1,2*}, C.E. Vita¹ y C.E. Voget¹

CINDEFI. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115 (1900). La Plata, Argentina. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, México.

^{2*}Fax 01 844 4390511/e-mail:coyotefoods@hotmail.com

Palabras clave: fibra de vidrio, Aspergillus, pectinasas.

Introducción. La filtración es una operación común en la recuperación y purificación de productos biotecnológicos. Entre sus aplicaciones más frecuentes se encuentra la separación de biomasa y componentes insolubles de los medios de cultivo, la clarificación de soluciones, etc. Los medios de filtración más empleados son las telas filtrantes, filtros de profundidad, etc. En previos estudios de fermentación se observó el fenómeno de adsorción de cierta actividad poligalacturonasa (PGasa) producida por *A. kawachii* en medio de cultivo glucosa/triptona a filtros de fibra de vidrio (1). Este proceso de adsorción selectiva nos permitió inferir que *A. kawachii* produce en el medio glucosa al menos dos grupos de enzimas con actividad PGasa. Un grupo corresponde a las enzimas que son activas sobre ácido poligalacturónico a pH 2.0 (inactivas a pH 5.0) y el otro grupo que son activas a pH 5.0 (pero no a pH 2.0, denominadas como PGasas moderadamente ácidas).

El objetivo del presente trabajo es describir el fenómeno de adsorción/desorción de PGasas a filtros de fibra de vidrio como método integrativo para la concentración y/o purificación de estas enzimas.

Metodología. Se adquirieron dos PGasas purificadas de *A. niger* (Megazyme, Irlanda) y *Trichosporum penicillatum*. Como fuente de actividad PGasa cruda se utilizó *A. kawachii* cultivado en medio glucosa/triptona. Los productos fueron caracterizados en cuanto a su actividad enzimática y proteína. La separación inicial del micelio del cultivo de *A. kawachii* se realizó filtrando el medio a través de tela muselina. El líquido obtenido fue centrifugado y el sobrenadante fue congelado en botes de plástico. La filtración del medio centrifugado (MC) fue llevada a cabo utilizando un sistema de flujo directo con soporte de polisulfona. El proceso de filtración se efectuó mediante vacío a un caudal aproximado de 20-25 ml/min. Los medios de filtración fueron filtros de fibra de vidrio con binder, esteres de celulosa (acetato y nitrato) y fibra de fibra de vidrio sin binder. Cada muestra fue filtrada tres veces para asegurar condiciones de equilibrio. Luego de la filtración los filtrados fueron analizados en cuanto a actividad enzimática, conductividad, proteína, y proteína. La filtración fue evaluada a pH 3.0 a 7.0. Se determinaron isotermas de adsorción para las PGasa de *A. kawachi*.

Resultados y discusión. En el medio glucosa/triptona las actividades enzimáticas más significativas corresponden a poligalacturonasas y proteasa ácida. Los valores típicos de proteína y actividad determinados entre 30 y 40 h de cultivo (tiempo al cual no se detecta glucosa en el medio) fueron los

siguientes: proteína: 0.25-0.30 mg/ml, PGasa 1.0-5.0 U/ml (determinada a pH 5.0), PGasa ácida: 0.08-0.25 U/ml (determinada a pH 2.0), proteasa ácida: 3.5-4.7 U/ml, celulasa 3.0-5.0 U/ml y ailsa 20-75 U/ml.

Las PGasas activas a pH 5.0 que produce *A. kawachii* en el medio glucosa/triptona fueron selectivamente adsorbidas a filtros de fibra de vidrio de borosilicato. El proceso de adsorción (y elución) dependió fuertemente del pH y fuerza iónica del medio pero no fue afectado por detergentes. Esta característica sugiere que la interacción principal de las PGasas no ácidas con el vidrio borosilicato es de naturaleza electrostática y/o involucra puentes de hidrógeno. La adsorción presenta además cierta bioespecificidad, ya que la PGasa ácida de *A. kawachii* no se adsorbió al filtro de fibra de vidrio, pero si los hicieron otras PGasas, como las de *A. niger* y *T. penicillatum* (Fig 1). El factor de purificación de la actividad PGasa luego del proceso de adsorción al filtro (pH 3.0) y posterior elución (pH 5.0) fue de 100 veces, siendo en este sentido la operación comparable con otros procesos de purificación de alta resolución, como la cromatografía de fase reversa, de afinidad o biospecífica. La muestra eludía posteriormente fue purificada por cromatografía de intercambio catiónico y permación por gel, resultando dos PGasa no ácidas (PGII y PGIII).

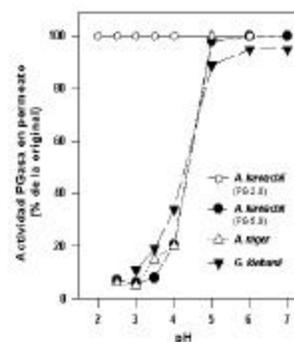


Fig. 1. Efecto del pH en la adsorción de PGasas a filtros de fibra de vidrio.

Conclusiones. El estudio demuestra el potencial de los filtros de fibra de vidrio para la adsorción selectiva de algunas PGasa fúngicas como etapa de purificación.

Bibliografía.

1. Contreras-Esquivel, J.C. (2003). Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus kawachii*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

