

PURIFICACIÓN DE GLUCOSA OXIDASA POR FILTRACIÓN TANGENCIAL

Carlos Orozco¹, Jorge Maxil¹, Israel Navarro, Sergio García y Leobardo Ordaz.
Departamento de Bioingeniería. ¹Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. IPN.
Av. Acueducto S/N. Col. Barrio La laguna Ticomán. G.A. Madero. México, D.F.
Fax: 57 29 60 00 ext. 56305. e-mail: tepoztlan61@yahoo.com.mx

Palabras clave: *ultrafiltración, microfiltración, cromatografía*

Introducción. La glucosa oxidasa se usa en las áreas alimentaria y clínica. En la primera se consume alrededor de 5, 500 Kg/año y tiene un precio de \$4,00.00/Kg. En el área clínica se consume 750 l/año y un precio de \$8,500.00/l. Todo el consumo nacional es de importación. Las metodologías reportadas proporcionan rendimientos bajos aunque purificación elevada (2,3). Así, el objetivo de este trabajo es desarrollar una metodología de purificación que proporcione un producto que cumpla con las especificaciones comerciales, con altos rendimientos y un número reducido de pasos.

Metodología. Se realizaron fermentaciones con *Aspergillus niger* para producir la enzima (1). El micelio obtenido se separó del caldo agotado con filtración al vacío. La enzima en el caldo se purificó por ultrafiltración. La del micelio se recuperó mediante ruptura mecánica. El extracto micelial se obtuvo mediante una microfiltración tangencial del material rupturado. La enzima del extracto se purificó con ultrafiltración y cromatografía de intercambio iónico. Mediante los análisis de actividad enzimática y proteína se determinaron el grado de purificación y rendimiento.

Resultados y discusión. Glucosa oxidasa del extracto celular se concentró al doble por ultrafiltración purificándose 1.6 veces y conservándose 95 % de la actividad (figura 1). La diafiltración eliminó proteína contaminante provocando que la purificación se incrementara 17 veces y el rendimiento fuera del 90 %. En la cromatografía se purificó 25 veces y el rendimiento global fue 80%. Así, se obtuvo una enzima con actividad específica de 250 UI/mg que cumple la especificación del área clínica (cuadro 1).

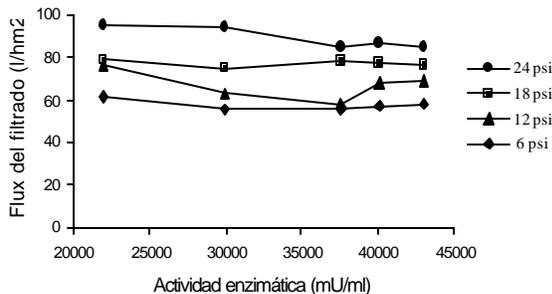


Figura 1. Concentración por ultrafiltración a diferentes presiones de trabajo

Cuadro 1. Purificación de glucosa oxidasa del extracto celular.

Operación	Actividad enzimática (mU/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (mU/mg)	Rendimiento global (%)
Extracto	22,000	2.222	9,946	-
Concentración	43,000	2.679	16,051	95
Diafiltración	45,296	0.274	165,314	90
Cromatografía	4,500	0.018	250,000	80

La enzima purificada del caldo agotado, después de la ultrafiltración y diafiltración, se purificó 21 veces y alcanzó un rendimiento de 78 %, obteniéndose una actividad específica de 20 UI/mg la cual cumplió la especificación para el área alimentaria (cuadro 2).

Cuadro 2. Purificación de glucosa oxidasa del caldo de cultivo agotado.

Operación	Actividad enzimática (mU/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (mU/mg)	Rendimiento global (%)
Caldo agotado	580	0.599	968	-
Concentración	2260	0.481	4,698	81
Diafiltración	2800	0.134	20,895	78
Cromatografía	695	0.0061	114,000	70

Conclusiones. La metodología desarrollada cumplió la pureza del área alimentaria: la especificación es de 1.5 UI/mg, en esta trabajo se obtuvo una pureza de 20 UI/mg. También cumplió la especificación exigida del área clínica, 175 UI/mg, aquí se obtuvo una pureza promedio de 200 UI/mg.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado por CGPI-IPN.

Bibliografía

1. Almada, S.A., 1990. Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* B-25. (Tesis, ENCB, IPN).
2. Bennet, E. P. y V. Massey, 1965. Purification and properties of the glucose oxidase from *A. niger*. *J. Biol. Chem.* 240:2209-2215.
3. Orozco, A. C., 1992. Desarrollo de un proceso de extracción y purificación de glucosa oxidasa de *A. niger*: Preingeniería y estudio de prefactibilidad económica. (Tesis, ENCB, IPN).