



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



ULTRAFILTRACIÓN DE GLUCOSA OXIDASA

Carlos Orozco Álvarez, Sergio García Salas y Joanan López Morales

Departamento de Bioingeniería. Unidad 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, diafiltración, glucosa oxidasa

Introducción. Las técnicas actuales de purificación emplean la ultrafiltración como un paso de concentración de la enzima (1). Sin embargo no explotan su aplicación como operación de diafiltración para eliminación de impurezas proteicas y orgánicas (2). En este trabajo se estudia la diafiltración para purificar glucosa oxidasa. También se evalúa el riesgo de inactivación enzimática debido al esfuerzo de corte del equipo de bombeo inherente a la ultrafiltración.

Metodología. Se efectuaron cultivos por lote de *A. niger* en un fermentador de 20 L tipo tanque agitado. La (GOX) presente en el caldo clarificado fue concentrada en un sistema piloto de ultrafiltración (50 L) de tipo fibra hueca, membrana de 0.46 m² y corte de 30 kDa. Parte de la GOX concentrada por ultrafiltración se sometió al proceso de diafiltración. Este último se efectúa en el equipo de ultrafiltración de laboratorio (0.12 m² de membrana) por el reducido volumen que queda (5 L) después de la concentración en el equipo piloto. Se trabajaron cinco volúmenes de lavado durante la diafiltración (c/u 1.5 L).

Resultados y discusión. Se realizaron cinco fermentaciones y los resultados promedio se presentan a continuación. La productividad de la GOX es de 55 U/Lh.

Tabla 1. Resultados globales de la fermentación.
t_f =14 h; s₀ =10 g/L; 500 rpm; 1 vvm; pH 4.5; 28 °C

Corrida	X ₀ (g/L)	P ₀ (U/g cel)	X _f (g/L)	P _f (U/g cel)	S _f (g/L)	Y _{xs} (gs/gc)	R _x (g/Lh)	R _p (U/Lh)
promedio	1.12	55	3.81	158	0.65	0.288	0.224	55

Durante la ultrafiltración la GOX específica se incrementa cinco veces debido a la eliminación de impurezas proteicas en el filtrado (Figura 1), por esto la concentración proteica en el concentrado permanece constante, mientras que la GOX en el filtrado es cero. El flux es casi constante y de 100 L/hm².

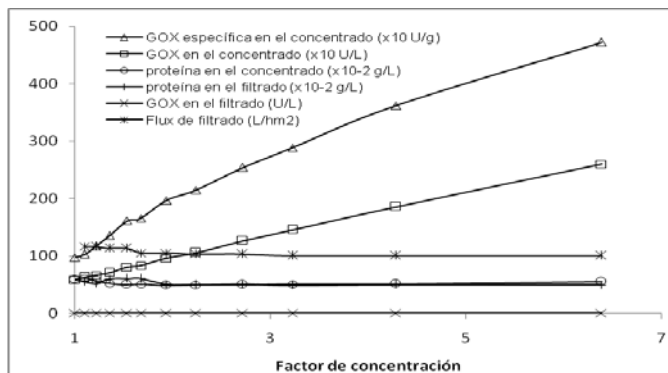


Fig. 1. Ultrafiltración piloto del caldo clarificado de GOX.
pH 7, 25 °C, PTM: 25 psi; FA: 40 Lpm; V_i: 50 L; V_f: 8 L.

En el cuadro 2, se presentan los resultados promedio de tres corridas de ultrafiltración donde observamos que la enzima se purifica 4.8 veces y el rendimiento es de 73 %, mostrando que la pérdida es debida a su inactivación en la bomba centrífuga (2.0 HP) del equipo piloto.

Tabla 2. Resultados de la ultrafiltración piloto de GOX

Corrida	Operación	GOX (U/l)	Proteína (g/l)	GOX específica (U/g)	Purifi- cación	Rendi- miento (%)
promedio	clarificado	580	0.599	968	1.0	100
	ultrafiltración	2260	0.481	4698	4.8	73

Durante la diafiltración se elimina el 80% de la proteína contaminante (menor de 50 kDa), así la actividad específica se eleva 5 veces más que en la ultrafiltración (Figura 2).

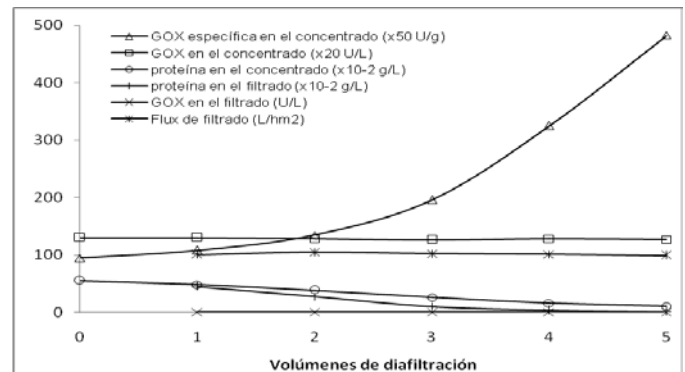


Fig. 2. Diafiltración de GOX concentrada.
pH 7, 25 °C, PTM: 25 psi; FA: 3.0 Lpm; V_{diafiltración}: 1.5 L.

Se efectuaron tres corridas de diafiltración y los resultados promedio se muestran en el cuadro 3, donde se observa que la GOX se purifica 5 veces y el rendimiento es de 95 %; la inactivación es tan baja debido a la bomba peristáltica (1/4 HP) del equipo de laboratorio.

Tabla 3. Resultados globales de la diafiltración de GOX

Corrida	Operación	GOX (U/l)	Proteína (g/l)	GOX específica (U/g)	Purifi- cación	Rendi- miento (%)
promedio	concentrado	2500	0.554	4512	1.0	100
	diafiltración	2425	0.105	23095	5.1	95

Conclusiones. La ultrafiltración y diafiltración purifican hasta 25 veces la GOX presente en el caldo clarificado con un rendimiento global de 68 %.

Agradecimientos. Proyecto SIP- 20100227.

Bibliografía.

- Normig Zoghbia y Luis Ojeda. (2008). Extracción y purificación de glucosa oxidasa para fines diagnósticos. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 28:31-37
- Alonso del Rivero y Julieta Delfín. (2002). Purificación parcial de glucosa oxidasa para uso diagnóstico. Revista Biología. Universidad de la Habana. Vol. 16, No.2.