

CURVA DE RUPTURA DE GLUCOSA OXIDASA. PARTE II. MODELAMIENTO

Orozco Alvarez C., García Salas S. y Cruz Islas O.

Departamento de Bioingeniería. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.
Instituto Politécnico Nacional. Av. Acueducto S/N. Col. Barrio La Laguna Ticomán. México,
D.F. orozco@ipn.mx ; tepoztlan61@yahoo.com.mx

RESUMEN

La glucosa oxidasa (GOX) de uso clínico requiere de alta pureza. La cromatografía de intercambio iónico se usa en la purificación final. Para el escalamiento se necesita la curva de ruptura, la cual nos ofrece información sobre la capacidad de adsorción de la resina. Se empleó una columna de vidrio con un diámetro de 0.01 m y altura de 0.3 m; resina aniónica marca Amberlite IRA-96, tamaño de 500 μm ; patrón de GOX Tipo VII marca SIGMA; regulador de fosfatos 0.1 M, pH 7. Se emplearon 2 g de resina aniónica y se resuspendieron en 20 mL de regulador de fosfatos. Esta suspensión se pasó a través de la columna para formar el lecho empacado; al final queda un lecho empacado de 0.08 m de altura y una porosidad medida de 0.55. Por otro lado se preparó 100 mL de GOX con una concentración de 2.0 U/mL. Esta solución se alimentó a un flujo de 0.5 mL/min. Inmediatamente se colectan fracciones de 3 mL en tubos de ensaye. A cada fracción se le determinó actividad enzimática. Prácticamente el 100 % de la enzima se adsorbe durante la alimentación de 600 mL de la solución enzimática; con estos resultados la resina presentó una capacidad de adsorción de 600 U/g. La enzima empieza a salir de la columna después de los 100 mL, y va incrementando su actividad en las fracciones eluidas hasta alcanzar la actividad de alimentación (2 U/mL), indicando con esto que la resina está completamente saturada.

ABSTRACT

Glucose oxidase (GOX) in clinical use requires high purity. The ion exchange chromatography is used in the final purification. For scaling the breakthrough curve is required, which provides no information on the adsorption capacity of the resin. A glass column was used with a diameter of 0.01 m and a height of 0.3 m; anionic resin Amberlite IRA -96, size of 500 microns; GOX pattern SIGMA Type VII; 0.1M phosphate buffer, pH7.2 g of anion resin was employed, and resuspended in 20 mL of phosphate buffer. This suspension was passed through the column to form the packed bed; the end is a packed bed height of 0.08 m and a porosity measure of 0.55. Furthermore GOX 100 mL was prepared with a concentration of 2.0 U/mL . This solution was fed at a flow of 0.5 mL/min . Immediately 3 mL fractions are collected in test tubes . Each fraction was analyzed for enzymatic activity. Virtually 100 % of the enzyme is adsorbed during feeding of 600 mL of the enzyme solution; with the results presented a resin adsorptivity of 600 U/g. The enzyme begins to emerge from the column after 100 mL, and will increase its activity in the eluted fractions up to the feeding activity (2 U mL), indicating that the resin is completely saturated

Palabras clave: *Glucosa oxidasa, adsorción, desorción.*

Área: Microbiología y biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la purificación final de la glucosa oxidasa (GOX) se lleva a cabo por cromatografía de intercambio iónico empleando resinas que sólo se utilizan a nivel laboratorio las cuales son de muy baja resistencia mecánica y son muy costosas (Rivero y Delfín, 2002; Eryomin *et al*, 2006). Por lo tanto, en este trabajo se estudian resinas de uso industrial, de alta resistencia y bajo costo para la purificación de la

enzima con el fin de obtener su máxima capacidad de adsorción en una columna empacada (Ming *et al.*, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó una columna de vidrio con un diámetro de 0.01 m y altura de 0.3 m., operando a presión atmosférica y a un flujo de alimentación de 0.5 mL/min. Resina de intercambio aniónica marca Amberlite IRA-96, con un tamaño promedio de 500 μm , alto grado de porosidad, 536 kg/m^3 de densidad y humedad de 65 %. Patrón de GOX Tipo VII marca SIGMA. Regulador de fosfatos 0.1 M, pH 7. La actividad enzimática fue determinada a través de una curva tipo elaborada con el patrón de GOX en una escala de 0 a 0.2 U/mL (Bhatti *et al.*, 2006)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primeramente se decidió trabajar con una solución de GOX de 2 U/mL y alimentar el volumen necesario hasta alcanzar la saturación de la resina. Los resultados están en la **Fig. 1**.

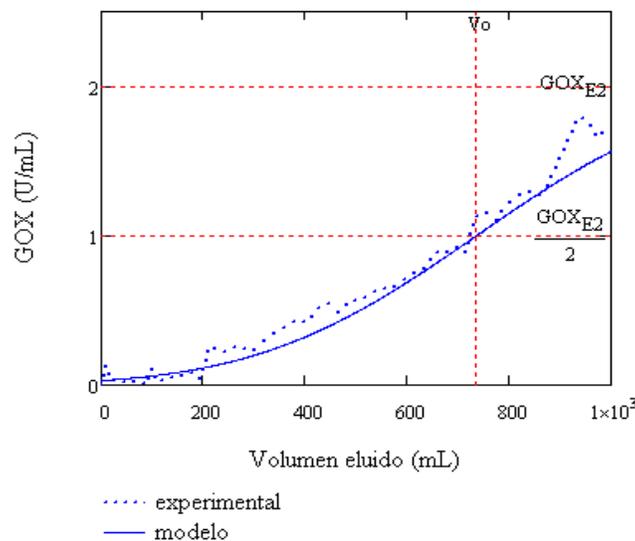


Fig. 1. Curva de ruptura de GOX en Amberlite-IRA-96. Alimentación de 2.0 U/mL; 2 g de resina

Se necesitan 100 mL para alcanzar el punto de ruptura, que es el punto donde la GOX comienza a elevar su concentración paulatinamente hasta alcanzar la concentración de entrada. Cuando se han alimentado 730 mL se encuentra que la actividad de salida es la mitad de la entrada; este es un dato que algunos modelos emplean en la adsorción de proteínas (V_0 , en el modelo de abajo). Sólo cuando se agrega 1 L de la solución, se logra que las concentraciones de salida y entrada de GOX sean las mismas, indicando esto que se ha alcanzado la completa saturación de la resina. A través de un balance de actividad enzimática se obtiene que la resina presenta una capacidad de adsorción de 600 U/g. También se puede determinar

que se necesita añadir un volumen de GOX, 90 % adicional al volumen donde se encontró el punto de ruptura para igualar las actividades de entrada y salida. En la **Fig. 1**, también puede observarse que el modelo usado representa con bastante acercamiento los resultados experimentales, el modelo usado fue el de la teoría de platos-cinética. Posteriormente se experimentó otra concentración de GOX para obtener su curva de ruptura, pero ahora se utilizó sólo 0.5 g de resina y actividad de 0.5 U/mL en la solución de alimentación; en la **Fig. 2** se muestran estos resultados. Se necesitan 25 mL para alcanzar el punto de ruptura; 140 mL para que la actividad de salida sea la mitad de la entrada; y prácticamente 300 mL para que las concentraciones de entrada y salida sean iguales; ahora la capacidad de adsorción es de sólo 60 U/g, diez veces menor que la anterior, lo que puede deberse a que solo se alcanzó una altura de lecho empacado de 0.015 m y por lo tanto un tiempo de residencia de solo 2.6 minutos (13.5 minutos para dos gramos de resina); sin embargo el modelo empleado representa adecuadamente el comportamiento experimental.

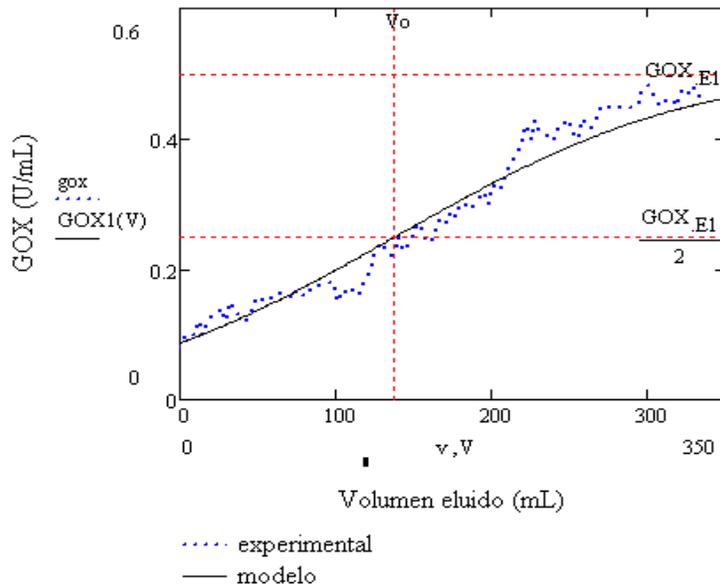


Fig. 2. Curva de ruptura de GOX en Amberlite-IRA-96. Alimentación de 0.5 U/mL; 0.5 g de resina

Como se mencionó arriba, se seleccionó el modelo de la teoría de platos-cinética, porque representa con bastante acercamiento los resultados experimentales, a continuación se desglosa este modelo (Tejeda *et al.*, 2000).

$$GOX(V) := \frac{GOX_E}{2} \cdot \left(1 + \operatorname{erf} \left(\frac{\frac{V}{V_0} - 1}{\sqrt{\frac{2}{N}}} \right) \right)$$

Donde:

GOX (V): actividad de GOX a la salida de la columna empacada y a cualquier volumen de elución; U/mL

GOX_E : actividad de GOX a la entrada de la columna; U/mL

V : volumen de elución a la salida de la columna; mL

V_o : volumen de elución donde la actividad de GOX a la salida de la columna es la mitad del valor de GOX a la entrada; mL;

$$V_o := \frac{[\varepsilon + [(1 - \varepsilon) \cdot K]] \cdot z \cdot F_{\text{elución}}}{v \cdot 60}$$

ε : porosidad del lecho empacado; adimensional

K : pendiente de la isoterma de adsorción de GOX en la resina (lineal); adimensional

z : altura del lecho empacado en la columna; m

F_{elución} : flujo de elución a través del lecho empacado; mL/min

v : velocidad de elución a través del lecho empacado; m/s

N : número teórico de platos de equilibrio; adimensional

$$N_{\text{teórico}} := \frac{z \cdot k_L \cdot a}{v}$$

a : área volumétrica de transferencia de masa en el lecho empacado; m²/m³; m⁻¹

$$a := \frac{6 \cdot (1 - \varepsilon)}{d_p}$$

d_p : diámetro de la partícula de la resina; m

k_L : coeficiente de transferencia de masa de la GOX; m/s;

$$k_L := \left(\frac{D_{AB}}{d_p} \right) \cdot \left[2 + 1.45 \left(\frac{d_p \cdot v \cdot \rho}{\mu} \right)^{0.5} \cdot \left(\frac{\mu}{\rho \cdot D_{AB}} \right)^{0.33} \right]$$

ρ : densidad de la solución enzimática de GOX; kg/m³

μ : viscosidad de la solución enzimática de GOX; kg/m.s

D_{AB} : coeficiente de difusividad de la GOX; m²/s;

$$D_{AB} := 9.4 \cdot 10^{-15} \cdot \frac{T}{\mu \cdot (Ma)^{0.33}}$$

T : temperatura de la solución enzimática de GOX; K

Ma : peso molecular de la GOX; 180,000 Daltons

Conforme a las ecuaciones mostradas anteriormente a continuación se enlistan las condiciones de operación que se emplearon en este trabajo:

ε = 0.55; valor determinado en la columna

K = 266; valor de la pendiente de la isoterma de adsorción de GOX

z = 0.08 m, cuando se usa 2.0 g de resina; 0.015 m, cuando se usa 0.5 g de resina; con estos datos se obtiene una densidad promedio de 371 kg/m³, para un diámetro de columna de 0.01 m.

F_{elución} = 0.5 mL/min; valor medido en la elución

v = 9.8 x10⁻⁵ m/s; calculada con el flujo de elución y el diámetro de la columna

d_p = 500 micrones; valor especificado de la resina (Medina, 2009).

ρ = 1000 kg/m³

μ = 0.001 kg/m.s

Analizando estas condiciones de operación se puede establecer que sólo la cantidad de resina se puede variar arbitrariamente, influyendo en la altura del lecho empacado (z), así como también el flujo de elución, el cual afecta directamente la

velocidad de elución (v); el flujo de elución permaneció fijo y solo se varió la cantidad de resina.

En la **Fig. 3** se presentan los resultados cuando se emplearon 2.0 gramos de resina: el modelo empleado representa con bastante acercamiento el comportamiento experimental encontrado en estas curvas de ruptura.

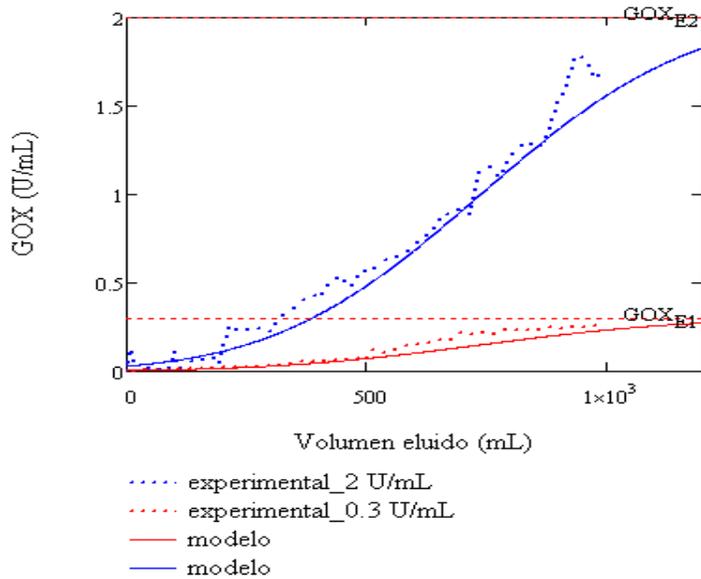


Fig. 3. Curva de ruptura de GOX en Amberlite-IRA-96; 2.0 g de resina

Se obtuvieron otras dos curvas de ruptura pero ahora trabajando con solo 0.5 gramos de resina, y los resultados se muestran en la **Fig. 4**: existe una gran correspondencia entre el modelo aquí usado y los resultados experimentales.

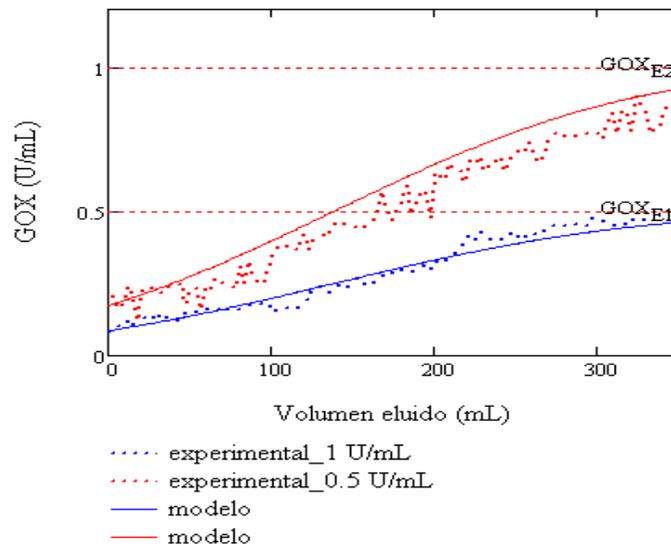


Fig. 4. Curva de ruptura de GOX en Amberlite-IRA-96; 0.5 g de resina

CONCLUSIONES

Se encontraron los parámetros operacionales de la cromatografía en lecho empacado fijo para obtener la curva de ruptura de la glucosa oxidasa en una resina industrial de intercambio aniónico. También se seleccionó el modelo denominado de cinética-platos para la representación de los resultados experimentales obtenidos en este trabajo.

Agradecimientos. Proyecto SIP 20130554. INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

BIBLIOGRAFÍA

11. Bhatti H.N., Madeeha M., Asgher M., and Batool N. (2006). *Purification and thermodynamic characterization of glucose oxidase from a newly isolated strain of Aspergillus niger*. Can. J. Microbiol. Vol. 52; 519-524.
12. Eryomin A. N., Makarenko M. V., Zhukovskaya L. A., and Mikhailova R. V.. (2006). Isolation and Characterization of Extracellular Glucose oxidase. Applied Biochemistry and Microbiology, vol. 42, no. 3, 304-311.
13. Medina Flores Rubén (2009). *Estudio y simulación para la difusión monocomponente en cromatografía preparativa no lineal*. Tesis de maestría. UPIBI-IPN.
14. Ming Wong Chun & Kwun Hei Wong & Xiao Dong Chen. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol. 78:927–938
15. Rivero Alonso y Delfín Julieta. (2002). Purificación parcial de glucosa oxidasa para uso diagnóstico. Revista Biología. Universidad de la Habana. Vol. 16, No.2.
16. Tejeda M, Armando, Montesinos C, Rosa M y Guzmán Z, Roberto. (2000). Bioseparaciones. Capítulo 7, págs. 307-417. Ed. UNISON. Hermosillo, Sonora, México. ISBN 968-6569-83-9.