

ADSORCIÓN Y DESORCIÓN DE GLUCOSA OXIDASA.

Orozco Álvarez C.^{*}, García Salas S. y Hernández Sánchez E.

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

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron los niveles de adsorción y desorción de glucosa oxidasa (GOX) en una resina industrial aniónica Amberlite IRA-96. Primeramente se probó el grado de adsorción empleando concentraciones de GOX desde 0.1 U/mL hasta 125 U/mL. Las condiciones de adsorción fueron: 2 g de resina en columna de vidrio de 0.01 m de diámetro proporciona una altura de lecho de 0.08 m; se alimentaron 15 mL de GOX a un flujo de 0.5 mL/min; la columna trabaja a temperatura ambiente y presión atmosférica; se colectan fracciones de 1 mL y se les determina actividad enzimática. Aún alimentando una concentración 125 U/mL la actividad en las fracciones eluidas fue nula, mostrando con esto la total adsorción de la enzima y por lo tanto la resina alcanzó una adsorción de hasta 1000 U por gramo. Para el ensayo de desorción se trabajaron dos soluciones de NaCl 0.1 y 0.3N. Con la primera hubo nula desorción de la enzima. Pero con NaCl 0.3 N se provoca la desorción esperada, sin embargo, sólo se recupera el 60 % de la enzima adsorbida cuando se emplean 30 mL de la sal.

ABSTRACT

In this study the levels of adsorption and desorption of glucose oxidase (GOX) on an anionic resin Amberlite IRA-96 were evaluated. First, the degree of adsorption using GOX concentrations from 0.1 U / mL to 125 U / mL was tested . Adsorption conditions were: 2 g of resin in a glass column of 0.01 m in diameter provide a bed height of 0.08 m ; 15 mL of GOX was fed at a flow of 0.5 mL / min ; column works at room temperature and atmospheric pressure ; 1 mL fractions were collected and enzyme activity were determined . Still feeding a concentration 125 U / mL activity in the eluted fractions was nil , showing by this total adsorption of the enzyme and thus achieved an adsorption resin to 1000 U per gram . Desorption test for two solutions of 0.1 and 0.3N NaCl were worked. With the first , there was no desorption of the enzyme. But with 0.3 N NaCl desorption causes expected , however , is only recovered 60% of the adsorbed enzyme when 30 mL of the salt used

Palabras clave: *Glucosa oxidasa, cromatografía, resina aniónica*

Área: Microbiología y biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Una de las aplicaciones actuales de la enzima glucosa oxidasa es en la cuantificación de glucosa en fluidos corporales, como sangre y líquido cefalorraquídeo, para lo cual se requiere un alto grado de pureza (Zoghbia y Ojeda, 2008; Rivero y Delfín, 2002). La purificación final se efectúa aplicando diversos tipos de cromatografía en columna, como el intercambio iónico (Sandip *et al.*, 2009). Sin embargo, el único criterio que se emplea en la purificación por cromatografía, acorde al objetivo de estos trabajos, es el grado de purificación de la enzima, dejando en un lugar secundario, u omitiendo, la economía, el rendimiento y las condiciones operativas de la operación cromatográfica, entre otros parámetros (Eryomin *et al.*, 2006). Esto último se estudia en este trabajo a través de la adsorción y desorción de GOX.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplea 2 g de resina aniónica y se resuspende en 20 mL de regulador de fosfatos. Esta suspensión se pasa a través de la columna de vidrio 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 prepara la solución de GOX a diferentes concentraciones, 0.1 a 125 U/mL. Esta solución se alimenta a la columna a un flujo de 0.5 mL/min. Inmediatamente se colectan fracciones de 1 mL en tubos de ensaye a temperatura ambiente. A cada fracción se le determina actividad enzimática (Bhatti *et al.*, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primeramente se trabajaron actividades de alimentación de 0.1 a 1 U/mL. Los resultados se presentan en la Fig. 1. Se alimentaron 15 mL de GOX a la columna (adsorción) y la enzima fue completamente adsorbida por la resina; sin embargo esta actividad total fue insuficiente para saturar la resina ya que la actividad en el eluido siempre fue cero. Aprovechando que había un 100 % de adsorción, se probó la desorción de la enzima, probando primero una desorción con 10 mL de NaCl 0.1 M. Se observó una desorción nula.

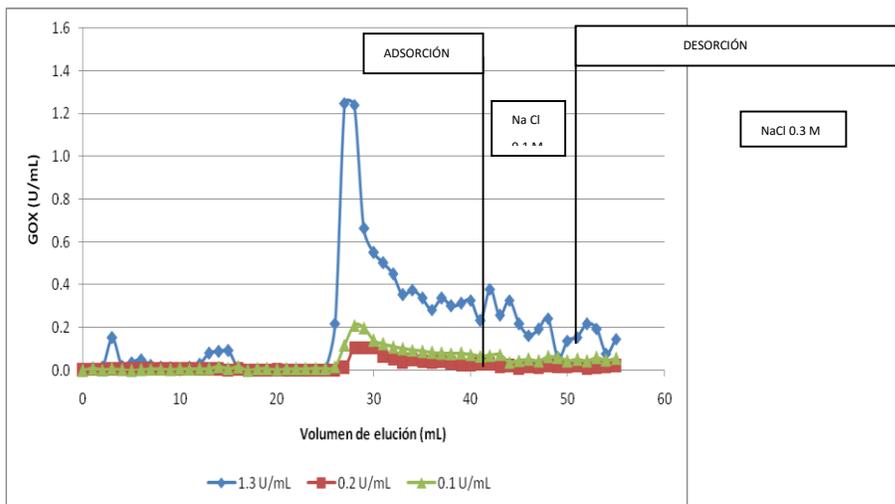


Fig.1 Adsorción y desorción de GOX en Amberlite-IRA-96. Alimentación de 0.1 a 1 U/mL

Luego se probó una solución de 0.3 M, y se logró la desorción de la enzima agregando 30 mL. Posteriormente se procedió a usar mayores concentraciones de GOX, los resultados se muestran en la Fig. 2. Cuando se agregan 15 mL de solución de GOX con una actividad de 8 U/mL, por ejemplo, son adsorbidos totalmente por la resina y no se logra la saturación buscada. Al igual que el anterior experimento, se aprovechó la enzima adsorbida para probar su desorción con NaCl. No se desorbe la enzima cuando se eluyen 10 mL de NaCl 0.1M; sí se desorbe cuando se alimentan 30 mL de NaCl 0.3M; estos resultados de desorción corroboran lo obtenido anteriormente

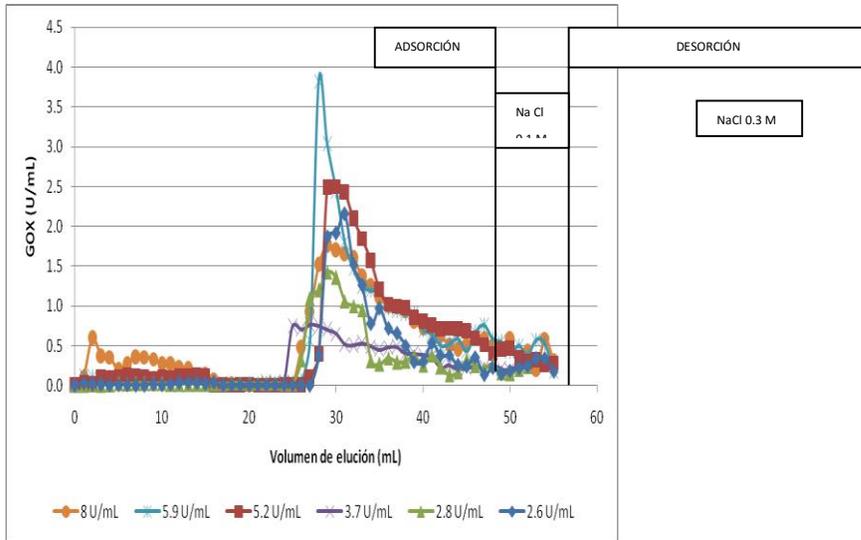


Fig.2 Adsorción y desorción de GOX en Amberlite-IRA-96. Alimentación de 1 a 10 U/mL

Finalmente se probaron concentraciones de GOX de 10 a 100 U/mL y los resultados se muestran en la Fig. 3. Claramente se observa que las concentraciones probadas no saturan la resina: aún cuando se adicionen 15 mL de GOX a 125 U/mL, por ejemplo. También se comprueba la no desorción con NaCl 0.1M, y la plena desorción con una solución 0.3M de la misma sal.

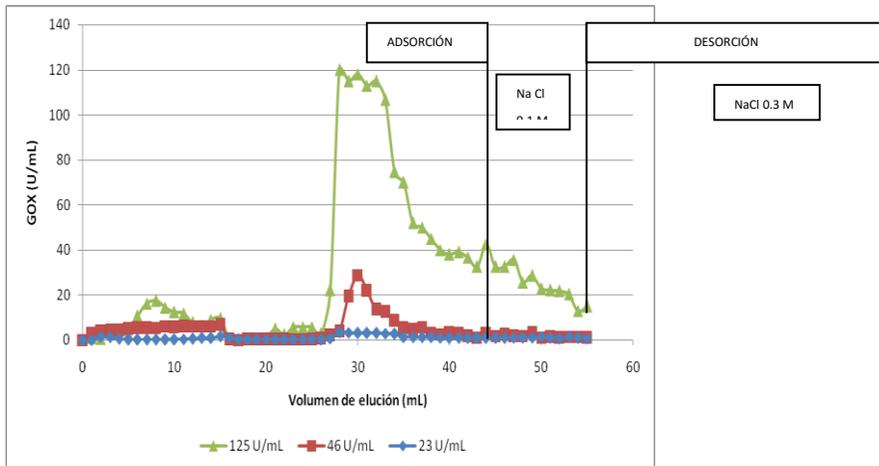


Fig.3 Adsorción y desorción de GOX en Amberlite-IRA-96. Alimentación de 10 a 100 U/mL

CONCLUSIONES

La resina de uso industrial Amberlite IRA-96 presentó una capacidad de adsorción de 10^3 U por gramo de resina, operando a una velocidad de elución de 9.8×10^{-5}

m/s, 0.08 m de altura de lecho, temperatura ambiente y a presión atmosférica. La desorción se logró con una solución de NaCl 0.3 N.

Agradecimientos. Proyecto SIP 20130554. INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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.
- Rivero Alonso y Delfín Julieta. (2002). Purificación parcial de glucosa oxidasa para uso diagnóstico. Revista Biología. Universidad de la Habana. Vol. 16, No.2.
- Sandip B. Bankar, Mahesh V. Bule, Rekha S. Singhal, Laxmi Ananthanarayan. (2009). *Glucose oxidase: An overview*. Biotechnology Advances 27: 489–501.
- Zoghbia Normig y Ojeda Luis. (2008). Extracción y purificación de glucosa oxidasa para fines diagnósticos. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 28:31-37.