

UTILIZACIÓN DE SISTEMAS MICELARES BENIGNOS AL AMBIENTE PARA RECUPERACIÓN PRIMARIA DE PROTEASAS DE APLICACIÓN INDUSTRIAL

Di Giacomo Melisa^A, Nerli Bibiana^A

^AInstituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos (IPROBYQ), CONICET - Facultad de Ciencias
Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR.

Área: Ciencias biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: Y

Palabras clave: sistemas micelares, surfactantes, proteasas.

INTRODUCCIÓN

El considerable incremento del uso de enzimas en numerosos procesos productivos ha impulsado el desarrollo de nuevas estrategias bioseparativas sencillas, rápidas, no contaminantes y aplicables a macro-escala que permitan recuperar enzimas de importancia biotecnológica, entre ellas, tripsina (TRP) y papaína (PAP).

En los últimos años han cobrado relevancia los sistemas bifásicos acuosos micelares (SBAMs) termoinducidos (Persson y col., 2000), dado que éstos permiten eliminar la utilización de solventes orgánicos, brindar entornos acuosos biocompatibles y concentrar la molécula blanco en pequeños volúmenes. Los surfactantes más utilizados son los de las series del Triton X, y si bien son de baja toxicidad y biodegradables (Tani y col., 1998), presentan un comportamiento espectroscópico que interfiere frecuentemente en la cuantificación de la molécula aislada, lo que obliga a un proceso de remoción del detergente que prolonga el proceso bioseparativo y provoca pérdida de rendimiento. Para evitar estas desventajas, fue introducido otro detergente amigable con el medioambiente como el Genapol X-080. Este presenta la capacidad de formar SBAMs a temperaturas inferiores a los 50°C y de ser utilizado como aditivo alimentario, en condiciones controladas (aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA)).

El objetivo de este trabajo fue diseñar y caracterizar sistemas micelares formados por surfactantes benignos al ambiente para aplicarlos en procesos extractivos de proteasas de importancia industrial.

METODOLOGÍA

Se utilizaron SBAMs formados por citrato de sodio (NaCit) pH 5,20 y surfactantes Tritón X-114 (TX-114) y Genapol X-080 (GX-080). Se empleó PAP y TRP comerciales y se preparó extracto crudo de las enzimas a partir de látex de papaya y homogenado pancreático, respectivamente. Se caracterizó la estabilidad de las enzimas en los SBAMs, su perfil de reparto y el de los azúcares reductores (AR) en el extracto crudo, a través de los respectivos coeficientes de reparto (K_r). Se optimizó la estrategia extractiva y se realizó el seguimiento del proceso de purificación a través del cálculo del rendimiento ($R(\%)$) y del factor de purificación (FP).

RESULTADOS

Estabilidad de las enzimas en presencia de surfactantes TX-114 y GX-080

Los resultados demuestran que la actividad enzimática de PAP no se afecta sensiblemente en presencia de los surfactantes TX-114 y GX-080. Esto es válido hasta temperaturas menores a los 50 °C, ya que por encima de esta se producen caídas notables en la funcionalidad proteica, debidas a la mayor proximidad a la temperatura de desnaturalización. Para TRP se observaron resultados similares con la única diferencia de que dicha enzima se ve afectada a temperaturas inferiores, cercanas a los 40°C. Se observó además que ambos surfactantes no producirían modificaciones estructurales significativas o en el entorno de los fluoróforos intrínsecos de las enzimas (triptófanos y tirosinas), ni se vería afectado el sitio activo de las mismas.

Determinación del perfil de reparto de PAP y diseño de la estrategia extractiva

Los diagramas de fase de los SBAMs obtenidos permitieron determinar la temperatura mínima para la separación de fases siendo cercana a los 21°C para aquellos formados por TX-114, y 38°C, para GX-080. Esto dificultaría la aplicación de SBAMs de GX-080 en la obtención de TRP, cuya funcionalidad proteica se ve afectada a dichas temperaturas, por lo que nuestro estudio se enfocó en la enzima PAP.

Los repartos se realizaron utilizando SBAMs de TX-114 (a 28, 33 y 38 °C) y GX-080 (a 42, 45 y 48 °C) a una concentración 4% P/P de surfactante. Se determinó como tiempo óptimo para alcanzar el equilibrio un tiempo de reparto de dos horas y media (Fig. 1).

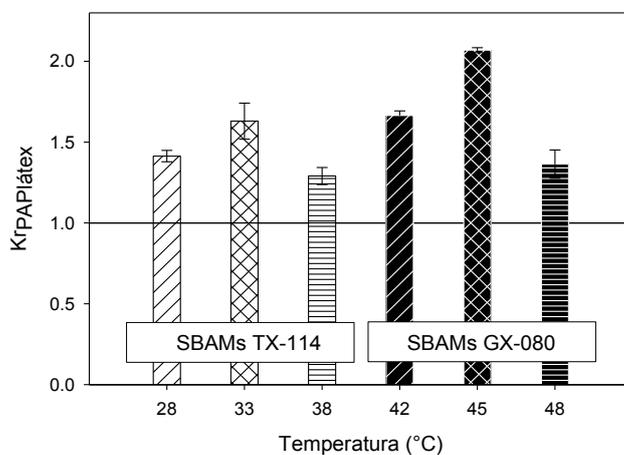


Figura 1: Valores de coeficientes de reparto de $PAP_{látex}$ en SBAMs TX-114 y GX-080 a distintas temperaturas.

Para todos los casos se observan K_r mayores a 1, evidenciando que la enzima se reparte mayoritariamente a la fase acuosa. Cabe destacar que en los SBAMs formados por GX-080, la fase acuosa es la fase inferior, pobre en micelas, en contraposición con SBAMs de TX-114, donde la fase acuosa es la superior.

Se realizó el seguimiento del proceso de purificación de $PAP_{látex}$ luego del paso extractivo como se observa en la Fig. 2. En todos los casos los R(%) en la fase acuosa son mayores que en la micelar, alcanzándose valores superiores al 60%. En los repartos que se realizaron con GX-080, los rendimientos obtenidos fueron en general mayores que los de TX-114, observándose que el sistema con GX-080 a 42°C

presenta la mayor capacidad extractiva con un rendimiento en fase acuosa cercano a 80%. Los FP logrados alcanzan valores mayores para las fases acuosas de los SBAMs ensayados, fases hacia las cuales se reparte mayoritariamente la enzima de interés. Esto resulta muy ventajoso ya que en un único paso extractivo se logra recuperar más del 60 % de la PAP de látex con una buena purificación.

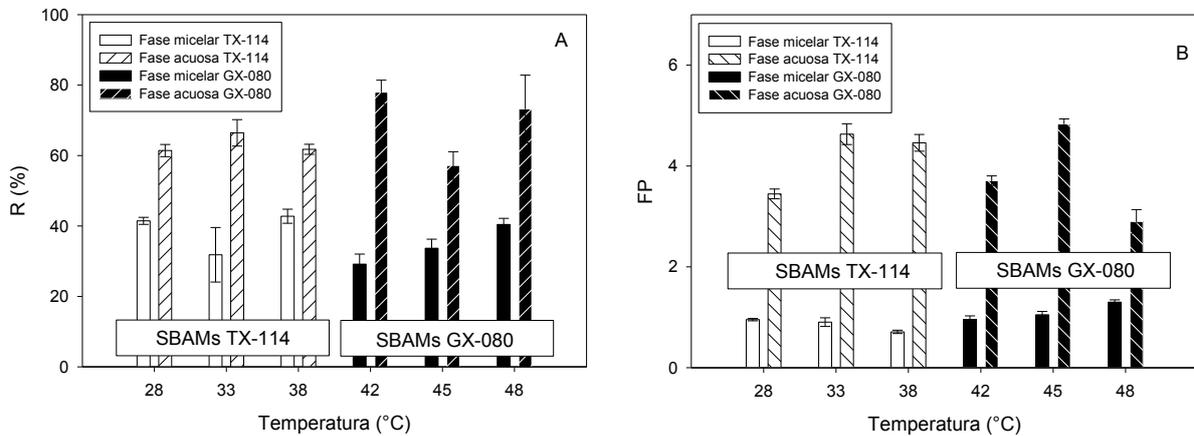


Figura 2: Rendimientos (A) y factores de purificación (B) de reparto $PAP_{\text{látex}}$ en SBAMs TX-114 y GX-080 a distintas temperaturas.

En forma adicional se estudió el reparto de los AR contenidos en el látex de papaya como se aprecia en la Fig. 3. Para TX-114, los K_{rAR} tomaron valores mayores a la unidad, de lo que se deduce que los AR se reparten preferentemente a la fase superior acuosa, misma fase en la cual se reparte la enzima de interés. Para los sistemas de GX-080, los AR del extracto se distribuyeron de forma similar entre las fases tanto a 48°C como a 45 °C con K_{rAR} cercanos a la unidad, mientras que a 42°C se repartieron preferentemente hacia la fase superior micelar ($K_{rAR} = 0,64$).

Se estimó además la capacidad de estos SBAMs de separar la enzima de los AR a través de su selectividad, β , calculada como el cociente K_{rPAP}/K_{rAR} . La selectividad obtenida para el sistema GX-080 a 42°C fue mayor que para los restantes, lo cual puede ser útil si se deseara obtener la enzima con bajo contenido de este tipo de azúcares.

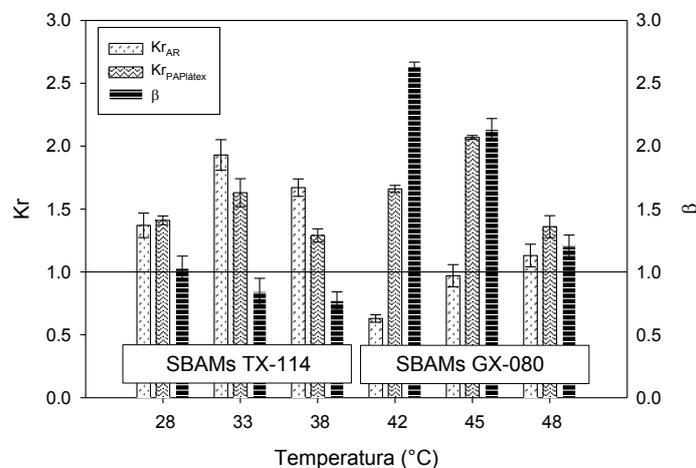


Figura 3: Comparación de los valores de coeficientes de reparto de los AR y PAP látex; valores de selectividad (β) en SBAMs TX-114 y GX-080 a distintas temperaturas.

Posteriormente, se prosiguió a estudiar la estabilidad funcional en el tiempo de PAP_{látex} en el SBAM GX-080 a 42°C, considerado óptimo para el recupero de la enzima. Esta fue satisfactoria en la fase acuosa, fase en la que se recupera en mayor proporción, hasta las 48 horas de incubación, con leve disminución de la actividad respecto a la condición en ausencia de surfactante.

Finalmente, para verificar la pureza alcanzada de la muestra compleja del látex de papaya luego de la aplicación de la estrategia extractiva, se utilizó la técnica SDS-PAGE como se observa en la **Fig. 4**.

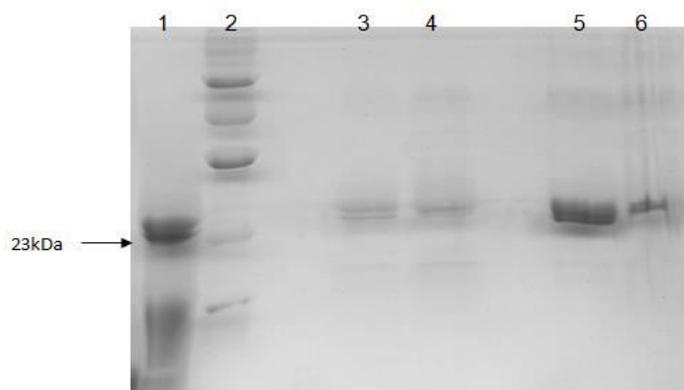


Figura 4: Electroforesis SDS-PAGE de extracto de papaya. Línea 1: látex de papaya; línea 2: marcadores de peso molecular GE Healthcare; líneas 3 y 5: fases micelar y acuosa, respectivamente, del reparto de látex de papaya en SBAM GX-080 a 42°C; líneas 4 y 6: fases micelar y acuosa, respectivamente, del reparto de PAP_{com} en SBAM GX-080 a 42°C.

En la calle 1 del gel, donde se sembró el látex, se aprecian diferentes bandas que evidencian que se trata de una mezcla compleja de enzimas, entre las cuales se encuentran el grupo de las cisteinproteasas (papaína, quimopapaína, glicil-endopeptidasa y caricaína), todas con PM entre 21000 y 30000, entre otros componentes. En las calles restantes donde se sembraron extractos provenientes del reparto tanto de PAP de látex como PAP comercial se observaron patrones similares, es decir, bandas en la región de las cisteinproteasas y desaparición de aquellas correspondientes al resto de los componentes. Particularmente el extracto proveniente de la fase acuosa del reparto de látex (calle 5), es el que exhibe las bandas más intensas en concordancia con el alto rendimiento obtenido en el proceso extractivo.

CONCLUSIONES

Se determinó como mejor SBAM para la extracción de PAP aquel formado por GX-080 a 42°C, donde el reparto mayoritario de la enzima de interés es hacia la fase inferior acuosa, obteniéndose un buen rendimiento (aproximadamente 80%) y factor de purificación mayor a 3. Adicionalmente, los azúcares reductores se reparten preferentemente a fase contraria. Esta técnica es beneficiosa en cuanto a la utilización de un surfactante biodegradable aceptado por la FDA para consumo humano, permitiendo en una única operación integrar el clarificado, la concentración y la purificación del bioproducto sin necesidad de tratamientos previos del extracto vegetal.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Persson, J. y col.**, 2000. F. Aqueous Polymer Two-Phase Systems Formed by New Thermoseparating Polymers. *Bioseparation*, 9, 105 - 116.
- Tani, H., Kamidate, T., Watanabe, H.**, 1998. Aqueous micellar two-phase systems for protein separation, *Anal. Sci.* 14, 875–888.