

INMOVILIZACIÓN DE MICORRENINA EN ALÚMINA. ESTUDIO DE ADSORCIÓN

✉ Miguel Gómez,¹ Mabel Alonso¹ y Rubén Ramos²

¹Instituto Superior Politécnico "José A. Echeverría", Facultad de Ingeniería Química, Marianao, Ciudad de la Habana, Cuba, 19390. ²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, Ciudad de la Habana, C.P. 10600, Cuba.

ABSTRACT

The utilization of immobilized enzymes has opened a new field of application to the industrial use of enzymatic preparations. In this sense, the search of adequate supports has a great importance. The present work deals with a study of the behavior of alumina as a carrier for immobilized enzymes, by the technique of immobilization by adsorption. The grade of fitting of the experimental data, to the theoretical well-known Langmuir's and Freundlich's isotherms, was determined. It was found that the Freundlich's isotherm is the one which better describes the process in the range of the studied concentrations. It was also checked that it is possible the recuperation of the carrier by means of a thermal treatment.

Key words: immobilization, rennin, adsorption

Biotecnología Aplicada 1996;13:92-97

RESUMEN

La utilización de enzimas inmovilizadas ha abierto un nuevo campo de aplicación al uso industrial de preparados enzimáticos. En este sentido, la búsqueda de soportes adecuados tiene una gran importancia. En el presente trabajo se estudia el comportamiento de un tipo de alúmina como soporte para enzimas inmovilizadas, mediante la técnica de inmovilización por adsorción. Se determinó el grado de ajuste que poseen los datos experimentales a dos de las isoterms teóricas conocidas, la de Langmuir y la de Freundlich, encontrándose como resultado, que la isoterma de Freundlich es la que mejor describe el proceso en el rango de concentraciones estudiadas. También se comprobó que es posible la recuperación del soporte a través de un tratamiento térmico.

Palabras claves: inmovilización, renina, adsorción

Introducción

Los preparados enzimáticos son ampliamente utilizados, en diferentes procesos de importancia económica y una evolución en este sentido ha sido el uso de las enzimas inmovilizadas, es decir, fijadas de alguna forma a un soporte insoluble, en lugar de su adición en solución o en suspensión (1).

Para la coagulación de la leche, una consideración importante es que la estructura del soporte sea porosa (2). Por esta razón, han sido usados la alúmina y otros materiales macroporosos con este fin (3).

En el presente trabajo se realiza un estudio de adsorción en alúmina de micorrenina, enzima que tiene la propiedad de hidrolizar la κ -caseína presente en la leche y provocar así la desestabilización del sistema y su posterior floculación. Esto constituye el primer paso en la producción de quesos, y en él se consumen cantidades importantes de la enzima, con la consiguiente elevación del costo de fabricación del producto.

La posibilidad de utilizar un sistema donde se encuentre la enzima inmovilizada y a través del cual pase la materia prima (leche), reduciría considerablemente el mencionado costo.

Materiales y Métodos

Soporte utilizado

El soporte utilizado fue alúmina Merck, calidad reactivo.

Enzima utilizada

Se utilizó una micorrenina de *Mucor pusillus*, obtenida por vía recombinante. La enzima fue utilizada en solución acuosa de NaCl al 15 %.

Inmovilización de la enzima

Teniendo en cuenta la estructura altamente porosa de la alúmina, la técnica utilizada para fijar la enzima al soporte es la inmovilización por adsorción. Este método se basa en poner en contacto la solución enzimática y el soporte durante un tiempo determinado, suficiente para que el sistema alcance el equilibrio de adsorción.

Determinación de la concentración de proteína

El método utilizado para la determinación de la concentración de proteína, tanto de la muestra inicial como del sobrenadante que queda posterior a la inmovilización, fue el propuesto por Bradford (4) que utiliza el reactivo Coomassie Brilliant Blue G-250.

1. Woodward J. Immobilised Cells and Enzymes - A Practical Approach, JRL - 1985; Press Limited.

2. Carlson A. Biotechnology Progress 1985:46.

3. Taylor M, et al. Biotechnology and Bioengineering 1977;19:683.

4. Bradford M. Anal Biochem 1976; 72:248.

Determinación de la actividad enzimática

Para la determinación de la actividad enzimática se utilizó el método propuesto por Berridge (5, 6), el cual se basa en la comparación del tiempo de coagulación de la leche, utilizando una enzima patrón, con el tiempo de coagulación de la misma leche, empleando la enzima que se quiere medir. La actividad enzimática se expresa en unidades Berridge (U_{Be}).

Adsorción de un soluto a partir de una disolución. Consideraciones teóricas

La adsorción es, de forma general, el intercambio de materia entre una determinada fase y una superficie sólida (7). Esto implica la acumulación de moléculas de un soluto dado en la interfase sólido-fluido.

Deben distinguirse dos tipos de fenómenos de adsorción: la *adsorción física* y la *adsorción química* (8). La *adsorción física* o de *Van der Waals* es el resultado de la actuación de fuerzas intermoleculares de atracción entre las moléculas de un sólido y de la sustancia adsorbida. La *adsorción química* o *quimisorción* es el resultado de la interacción química entre el sólido y la sustancia adsorbida.

Isotermas de adsorción

La adsorción de una sustancia en una superficie adsorbente está acompañada por una liberación de calor, y recíprocamente, la separación de la sustancia de la superficie, es decir, la desorción, ocurre con absorción de calor. La adsorción sigue el principio de Le Chatelier, o sea, el aumento de temperatura cambia al equilibrio en dirección al proceso endotérmico, por lo que la cantidad de sustancia adsorbida disminuye con el aumento de la temperatura y aumenta con la disminución de la temperatura (9).

La cantidad de sustancia adsorbida puede disminuirse o aumentarse a temperatura constante por la disminución o aumento de la concentración de adsorbato.

La relación entre la adsorción y la concentración a temperatura constante puede representarse gráficamente y la curva obtenida se denomina *isoterma de adsorción* (8, 9).

Existe un gran número de expresiones que describen isotermas de adsorción, y entre estas, algunas de las más conocidas son la *isoterma de Langmuir* y la *isoterma de Freundlich*.

Isoterma de Langmuir

Si se hacen las siguientes suposiciones (8):

- la capa adsorbente saturada es monomolecular,
- la superficie dada tiene uniformemente distribuidos los centros activos, y entre las moléculas adsorbidas no existen interacciones,
- la adsorción máxima corresponde al estado en que la superficie se encuentra totalmente llena de moléculas,

la cantidad de sustancia adsorbida puede representarse mediante la siguiente expresión (10):

$$\Theta = \frac{\Gamma}{\Gamma_{\text{máx}}} = \frac{c}{K + c} \quad [1]$$

donde:

Γ : concentración en la superficie (o la concentración en exceso en la superficie)

$\Gamma_{\text{máx}}$: concentración máxima en la superficie, la cual se asume que es constante

Θ : grado de ocupación

K : constante de disociación, que aquí significa la concentración a la cual el grado de ocupación es del 50 % (La ecuación [1] puede escribirse como $c = K\Theta/(1-\Theta)$), por lo que $c = K$ cuando $\Theta = 0,5$, y

c : concentración de proteínas de la disolución

Esta ecuación puede linealizarse tomando los inversos de ambos miembros y manipulando algebraicamente queda:

$$\frac{1}{\Gamma} = \frac{1}{\Gamma_{\text{máx}}} + \frac{K}{\Gamma_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{c} \quad [2]$$

Esta ecuación representa una línea recta cuya pendiente es $\frac{K}{\Gamma_{\text{máx}}}$, y el intercepto es $\frac{1}{\Gamma_{\text{máx}}}$, por lo que los valores de las constantes $\Gamma_{\text{máx}}$ y K pueden obtenerse por regresión lineal a partir de datos de $1/\Gamma$ vs. $1/c$.

La ecuación de Langmuir se corresponde bien con los datos experimentales en el campo de las concentraciones altas y bajas (9); no obstante, esta isoterma no es aplicable a todos los fenómenos de adsorción.

Isoterma de Freundlich

Otra ecuación de la isoterma de adsorción es la ecuación empírica denominada isoterma de Freundlich (8), la cual se expresa como:

$$\frac{x}{m} = k \cdot c^{1/n} \quad [3]$$

donde:

x : cantidad de sustancia adsorbida

m : masa del adsorbente

c : concentración de equilibrio de adsorbato

k y n : constantes

Para calcular las constantes, la ecuación [3] debe linealizarse, lo cual se logra aplicando logaritmos en ambos miembros. De esa forma quedaría:

$$\log \frac{x}{m} = \log k + \frac{1}{n} \log c \quad [4]$$

Esta ecuación representa una línea recta cuya pendiente es $1/n$, y su intercepto con el eje de las ordenadas es $\log k$, por lo que los valores de estas constantes pueden obtenerse por regresión lineal a partir de datos de $\log (x/m)$ vs. $\log c$ (9).

5. Berridge NJ. *Biochem J* 1945; 39:179.

6. Berridge NJ. *Analyst* 1952;77:57.

7. Treybal E. *Operaciones con transferencia de masa*. Ed. Rev. 1985; 581.

8. Frodorov M. *Química Coloidal*. Ed. Pueblo y Educación 1983;15.

9. Medvedev PI. *Química Física y Coloidal*. Ed. Pedagógica de Cuba 1957; 207.

10. Kohler HH. *Thermodynamics of Adsorption from Solution*. Ed. Marcel Dekker Inc 1993.

Descripción de los experimentos

En cada experimento se utilizó la misma cantidad de alúmina (5 g), y se realizaron en placas Petri, colocadas en un agitador rotatorio (*shaker*).

Determinación del tiempo de contacto

Para determinar el tiempo en que se alcanza el equilibrio de adsorción, a dos placas Petri rotuladas como A y B, que contienen alúmina, se adicionaron 10 mL de la solución de enzima y 10 mL de solución de NaCl al 15 %, y se hicieron determinaciones de concentración de proteína y de actividad enzimática en el sobrenadante durante 10 horas a intervalos de 2 horas.

Influencia de la concentración enzimática inicial en la cantidad de enzima adsorbida

A cinco placas con 5 g de alúmina previamente humedecida, fueron añadidos los volúmenes de solución de enzima y NaCl al 15 % que se muestran en la Tabla 1. La solución se preparó en un recipiente aparte, se homogenizó y se añadió a la alúmina.

Tabla 1. Volúmenes de solución enzimática y de solución de NaCl al 15 % utilizados en la preparación de las soluciones de enzimas de diferentes concentraciones.

Placa	Vol. soln. enzimática, mL	Vol. soln. NaCl 15 %
1	2	18
2	4	16
3	6	14
4	10	10
5	20	0

Se dejó en contacto el soporte y la solución de enzima en un *shaker* con agitación lenta durante 2 h a 20 °C de temperatura.

Pasado este tiempo se tomaron muestras del sobrenadante y se determinó la concentración de proteína y la actividad enzimática por los métodos antes descritos.

Influencia del tratamiento térmico en la capacidad de adsorción de la alúmina

El mismo experimento fue realizado con alúmina usada, la cual se sometió a un tratamiento térmico a 800 °C durante 4 h, con el fin de evaluar su comportamiento en cuanto a la capacidad de adsorber proteínas después del tratamiento.

Resultados y Discusión

En todos los experimentos se realizaron determinaciones de concentración de proteínas y actividad enzimática de la muestra inicial y del sobrenadante posterior a la inmovilización. Se consideró que la cantidad de proteína inmovilizada y la actividad en-

zimática inmovilizada están dadas por la diferencia entre las concentraciones iniciales y finales tanto de actividad enzimática como de proteínas totales.

Se realizó un experimento preliminar en el que se siguió el procedimiento descrito anteriormente, pero sin humedecer previamente el soporte. Posteriormente, este experimento fue repetido a las mismas concentraciones de enzima iniciales, pero humedeciendo esta vez la alúmina antes de añadir la enzima. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1.

Figura 1. Resultados obtenidos al realizar el experimento con y sin humectación previa de la alúmina.

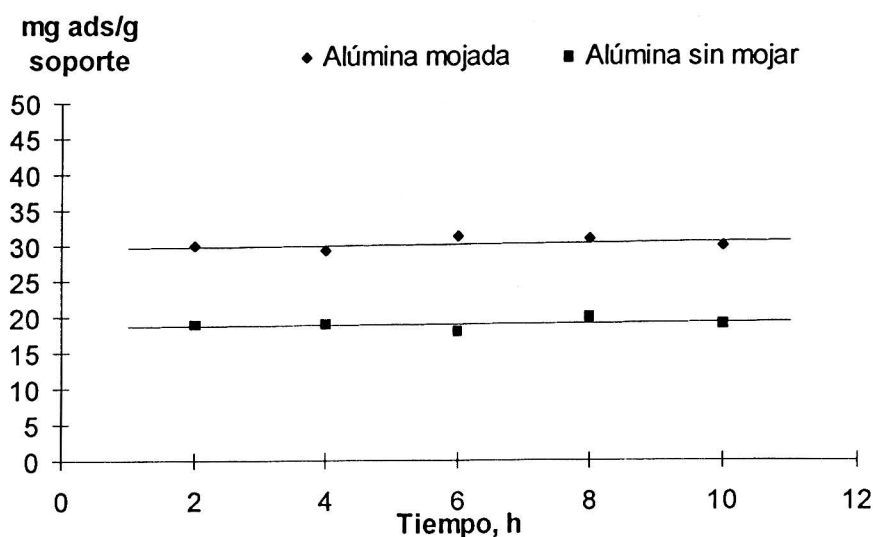
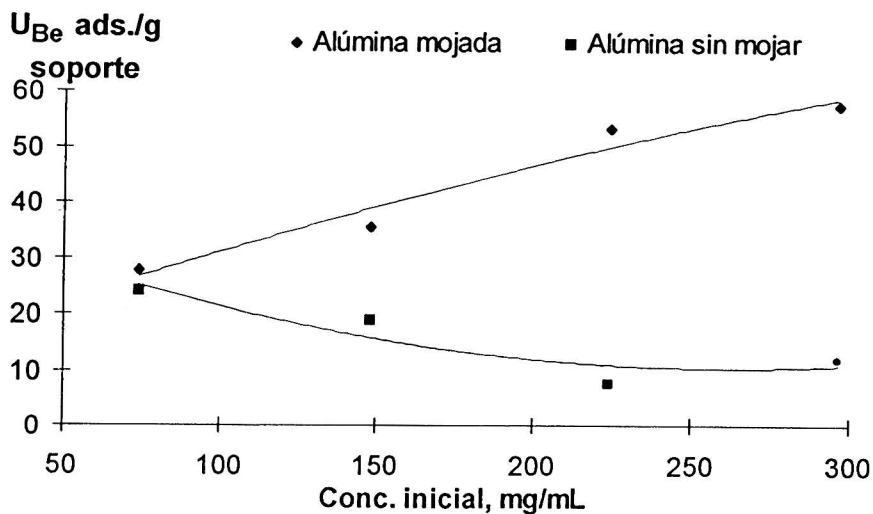


Figura 2. Adsorción detectada a diferentes tiempos de contacto entre la enzima y el soporte.

Como puede apreciarse, para el caso de la alúmina mojada previamente, se observa que a medida que aumenta la concentración inicial de la enzima, aumenta la cantidad de enzima adsorbida por gramo de soporte, hasta un valor que tiende a la saturación, no siendo este el comportamiento observado en el caso de la alúmina que no se mojó. La curva que representa a la alúmina que no se mojó previamente, indica que la cantidad de enzima adsorbida por gramo de soporte, determinada como la

diferencia entre las concentraciones inicial y final de la disolución, disminuye al aumentar la concentración inicial de la enzima.

Cuando se mezcla un adsorbente con una solución, se produce la adsorción de ambos, soluto y disolvente (7), y en dependencia de la especie que se adsorba preferentemente, se detectará más o menos adsorción, pudiendo incluso detectarse una adsorción negativa en el caso en que el disolvente se adsorba preferentemente al soluto de interés.

Por otra parte, en la alúmina utilizada existen poros grandes, medianos y pequeños, y teniendo en cuenta que la molécula de proteína es mucho mayor que la de agua, habrá poros en los que podrá adsorberse la molécula de agua, pero no podrá hacerlo la proteína. Al mojarse previamente el soporte, todos los poros se saturarán de agua, y al ponerlo posteriormente en contacto con la solución enzimática, la competencia del soluto con el disolvente será sólo por aquellos sitios activos del soporte donde puede entrar la proteína. El resto de la superficie activa del soporte permanecerá saturada de agua, por lo que no deberá ocurrir la adsorción del disolvente presente en la solución enzimática. De esta forma, la cantidad de enzima que se adsorbe, puede estimarse a partir de la diferencia entre la concentración inicial y final de proteínas en la solución enzimática.

En la Figura 2 se presentan los resultados del experimento para determinar el tiempo de contacto entre la enzima y el soporte, y en ella se observa que entre 2 y 10 horas no hay variación de la cantidad de enzima adsorbida, lo cual induce a pensar que a las 2 horas ya se ha alcanzado el equilibrio de adsorción. Nótese que para el caso de la alúmina sin mojar, se detecta menor cantidad de proteína adsorbida que en el caso en que

Tabla 2. Alúmina sin tratar a 800 °C.

Placa	Act. inic., U _{Be} / g sop.	Act. final, U _{Be} / g sop.	Act. Adsorbida, U _{Be} / g sop.
1	33,66	4,63	15,14
2	67,32	13,08	15,00
3	100,98	21,86	13,54
4	168,30	36,67	21,62
5	336,60	71,02	52,52

Tabla 3. Alúmina tratada a 800 °C.

Placa	Act. inic., U _{Be} / g sop.	Act. final, U _{Be} / g sop.	Act. Adsorbida, U _{Be} / g sop.
1	33,66	4,88	14,14
2	67,32	13,25	14,32
3	100,98	20,85	17,56
4	168,30	35,20	27,28
5	336,60	70,00	56,60

esta se moja; ello puede ser una confirmación de lo planteado anteriormente.

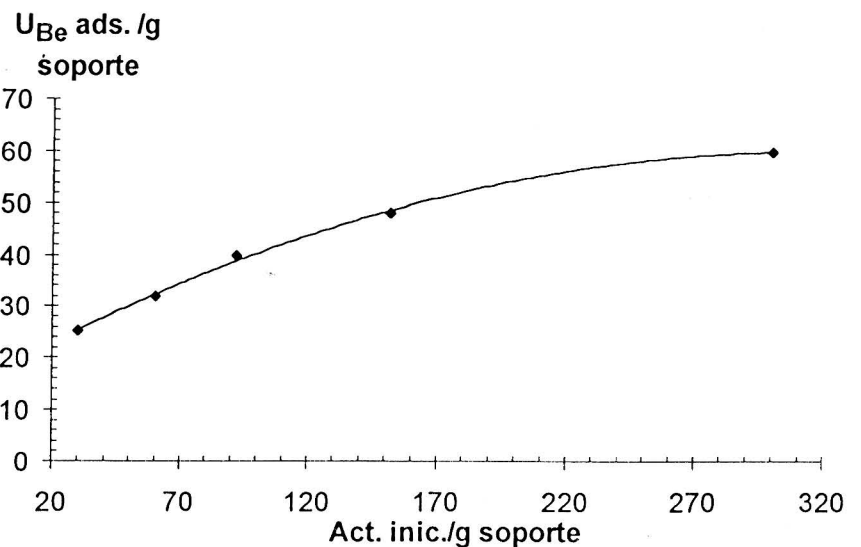
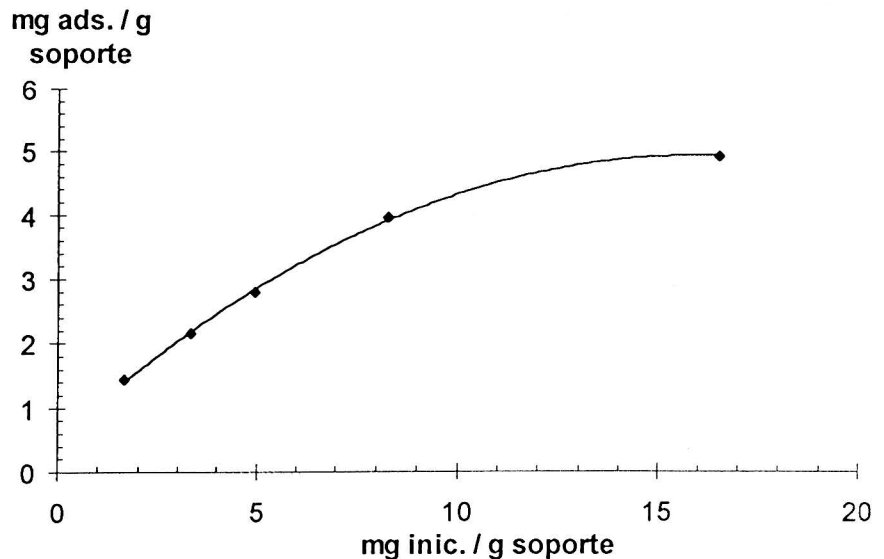
Al obtener estos resultados, en los siguientes experimentos se mojó la alúmina previamente y se tomó como tiempo de contacto 2 horas.

Influencia de la concentración inicial en la adsorción de la enzima. Ajuste de las isothermas de adsorción

La influencia de la concentración inicial en la cantidad de enzima adsorbida por gramo de soporte, es mostrada en las Figuras 3 y 4, en las que se observa que, al aumentar la concentración inicial de enzima, aumenta la cantidad de esta adsorbida por gramo de soporte, hasta que se satura su superficie, momento en el que un aumento de la cantidad inicial de enzima no produce un aumento de la adsorción.

Figura 3. Variación de la cantidad de enzima adsorbida por gramo de soporte con la concentración inicial.

Figura 4. Variación de la actividad enzimática adsorbida por gramo de soporte con la concentración inicial.



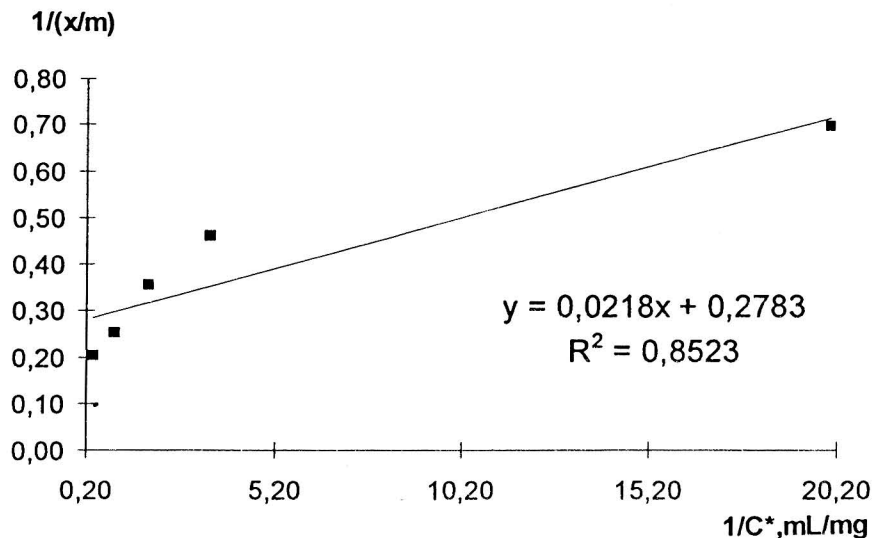


Figura 5. Resultados del ajuste de los datos experimentales de la isoterma de Langmuir. Datos de proteína adsorbida.

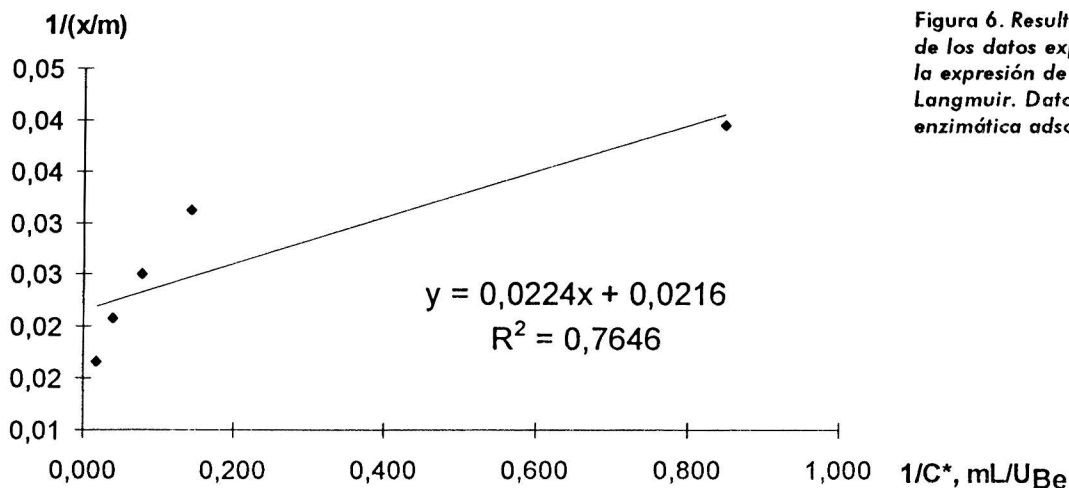


Figura 6. Resultados del ajuste de los datos experimentales a la expresión de la isoterma de Langmuir. Datos de actividad enzimática adsorbida.

A partir de estos datos, se construyeron los gráficos de $\log(x/m)$ vs. $\log c$, y de $1/(x/m)$, (proporcional a Γ), vs. $1/c$ para comprobar el ajuste de los datos experimentales obtenidos a las isotermas de Freundlich y de Langmuir respectivamente. Estos gráficos se muestran en las Figuras 5 a 8, en las que se ven los valores de las constantes de las diferentes isotermas estudiadas, correspondientes a la pendiente e intercepto de las rectas ajustadas en cada caso. Se observa que los datos experimentales corresponden mejor a la isoterma de Freundlich que a la de Langmuir, por lo que puede afirmarse que para el rango de concentraciones estudiadas, es la ecuación de Freundlich la que mejor describe este proceso.

Este resultado coincide con lo planteado por Ramsden (11), en cuanto a la inaplicabilidad de la isoterma de Langmuir en estos casos, debido probablemente a adsorción de forma irreversible de cierta cantidad de proteína.

Comportamiento de la alúmina antes y después del tratamiento a 800 °C

Como se observa en las Tablas 2 y 3, en el caso de la alúmina tratada térmicamente, hay aproximadamente la misma actividad enzimática adsorbida por gramo de soporte que en el caso de la alúmina no tratada, ya que al someter al soporte a una temperatura de 800 °C, se eliminan todo tipo de proteínas o componentes orgánicos que puedan encontrarse adsorbidos en ella, y como consecuencia, es posible la recuperación del soporte después de su utilización.

Conclusiones

Los resultados planteados anteriormente, permiten concluir que:

- Se debe mojar previamente la alúmina antes de efectuar la inmovilización, para poder estimar la adsorción de la enzima como la diferencia entre la concentración inicial y final en el sobrenadante.

11. Ramsden JJ. Experimental methods for investigating protein adsorption kinetics at surfaces. 88 Quarterly Reviews of Biophysics 1994; 27: 41-105.

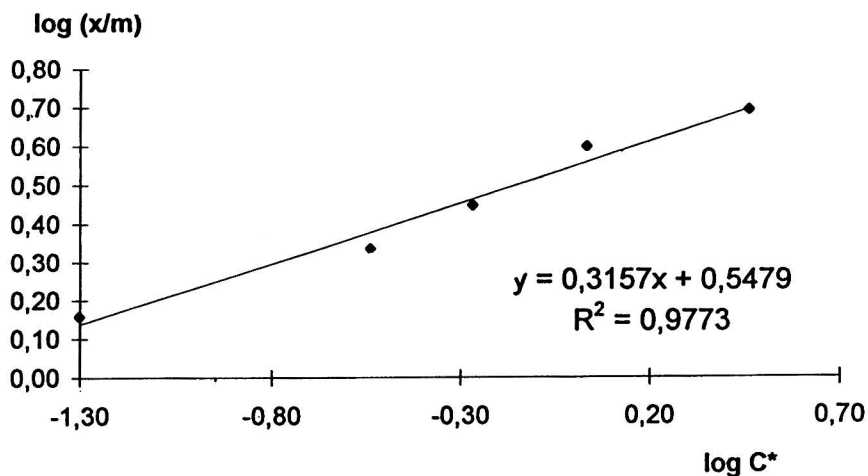


Figura 7. Resultados del ajuste de los datos experimentales a la expresión de la isoterma de Freundlich. Datos de proteína adsorbida.

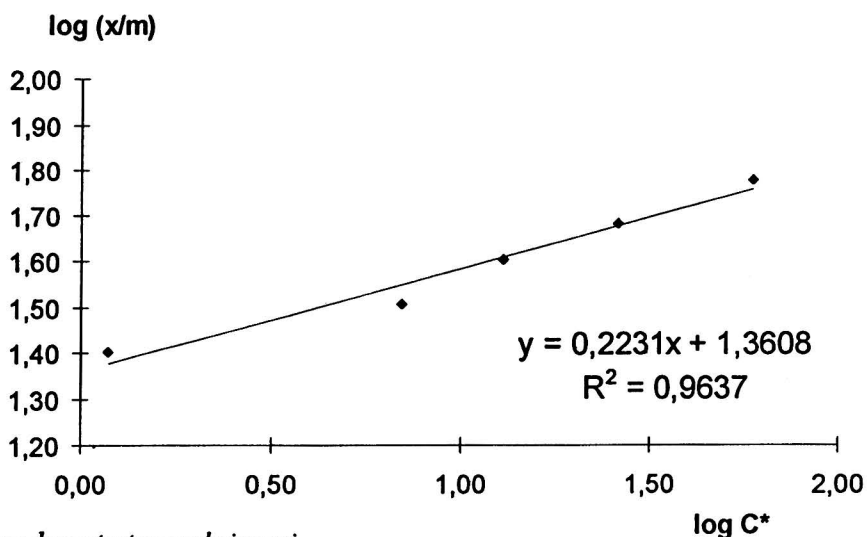


Figura 8. Resultados del ajuste de los datos experimentales a la expresión de la isoterma de Freundlich. Datos de actividad enzimática adsorbida.

- Se toma como tiempo de contacto para la inmovilización 2 horas.
- Al aumentar la concentración inicial aumenta la adsorción de la enzima al soporte, hasta alcanzar un valor de saturación.
- En el rango de concentraciones estudiadas, se encontró que los datos experimentales se ajustan satisfactoriamente a la isoterma de adsorción de Freundlich, no sucediendo lo mismo con la isoterma de Langmuir.
- Se puede recuperar la alúmina utilizada por tratamiento térmico de la misma a 800 °C, lo cual hace atractivo este soporte desde el punto de vista económico.