



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

“Empleo de polielectrolitos inteligentes para desarrollar matrices
insolubles con capacidad bioseparativa de enzimas de importancia
Biotecnológica”

Presentada por: Lic. Nadia Voitovich Valetti

Rosario, Argentina

2015

“Empleo de polielectrolitos inteligentes para desarrollar matrices insolubles con capacidad bioseparativa de enzimas de importancia Biotecnológica”

Lic. Nadia Voitovich Valetti

Licenciada en Biotecnología, Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Departamento Tecnología, Área Procesos Biotecnológicos, y el Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos (IPROBYQ-CONICET), dependientes de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 01/04/2011 y el 11/12/2015, bajo la dirección del Dr. Guillermo A. Picó.

Nombres y firmas del Director y de los integrantes del Jurado de Tesis:

Director: Dr. Guillermo A. Picó.....

Jurado:.....

Jurado:.....

Jurado:.....

Defendida:.....

...Tan exacta como dos y dos son tres...

A Tomás

Agradecimientos

Al terminar esta etapa de mi vida me doy cuenta que nada de esto hubiera sido posible sin la colaboración directa o indirecta de muchas de las personas que me rodean. Por eso siento que es necesario agradecer a cada una de ellas.

En primer lugar a Guillermo, por aceptarme como su tesista, por estar siempre, por su paciencia, sus enseñanzas y su apoyo incondicional no sólo en el ámbito profesional sino también en lo personal. Gracias por darme la oportunidad de crecer profesionalmente haciendo lo que me gusta y por apoyar cada una de mis ideas aun cuando sabías que no iban a funcionar. Puedo decir que en estos años te convertiste en mi director y “papá” de la ciencia.

A Ale y Tomi, mi familia, por acompañarme en este camino, por la paciencia en estos últimos días de escritura, por esas sonrisas que me llenan el alma, por ese “mamá vení” y por todo el amor que me brindan día a día. Los amo inmensamente y son lo más hermoso que me pasó en mi vida.

A mis viejos y mis hermanos, por todo el esfuerzo que hicieron para que pueda estudiar y recibirme, por todo el amor que me dan día a día y por estar siempre cuando más los necesito. A mis abuelos, siempre presentes en mi corazón.

A mis amigas de la vida: Alit, Emi, Mari, Romi, Vale, Vero, siempre presentes acompañándome y aguantándome en todo. Las quiero con toda mi alma!

A toda la gente de Fisicoquímica y Procesos por tantas charlas, mates y risas compartidas. En especial a Bibi, Bery, Gise y Diana por tanta ayuda, consejos y

enseñanzas a lo largo de todos estos años. A Vale, ya que sin su ayuda no podría haber logrado casi nada de todo esto.

A Caren, Romi, Pilar, Cintia, Vicky, Brenda, Agos, Barbi por confiar en mí para empezar en su trabajo de investigación, por tantos días compartidos y por todo lo que me enseñaron.

A Germán, Romi, Andrea, Georgi, Mili, Nata, Mariu, Seba, Eze, Nacho, por tantos momentos hermosos, charlas, cervezas y risas. Por estar cuando los necesito y por hacer más lindas las largas jornadas de trabajo.

A Emi, por ser una compañera genial de locuras, de trabajo y de salidas. Una de las mejores cosas que me llevo de estos años de trabajo es nuestra amistad, que espero dure por muchísimos años más.

Estoy segura que me estoy olvidando de alguien, así que un agradecimiento enorme a todos los que formaron parte de esta etapa tan linda de mi vida!!

Publicaciones, presentaciones a congresos, becas y subsidios recibidos

Publicaciones en revistas internacionales con referato:

Nadia Voitovich Valetti, Julia Lombardi, Valeria Boeris, Guillermo Picó. Precipitation of chymotrypsin from fresh bovine pancreas using ι -carrageenan. *Process Biochemistry*, 47, (2012), 2570–2574.

Julia Lombardi, **Nadia Voitovich Valetti**, Guillermo Picó, Valeria Boeris. Obtainment of a highly concentrated pancreatic serine proteases extract from bovine pancreas by precipitation with polyacrylate. *Separation and Purification Technology*, 116, (2013), 170-174.

Nadia Voitovich Valetti, Valeria Boeris, Guillermo Picó. Characterization of chymotrypsin– ι -carrageenan complex in aqueous solution: A solubility and thermodynamical stability study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52, (2013), 45-51.

Nadia Voitovich Valetti, Guillermo Picó. A friendly method for *Raphanus sativus* L (wild radish) peroxidase purification by polyelectrolyte precipitation. *Separation and Purification Technology*, 119, (2013), 1–6.

Caren Rausch, **Nadia Voitovich Valetti**, Guillermo Picó. A new platform for chymotrypsin isolation from fresh bovine pancreas using an environmentally friendly polyelectrolyte: Alginate. *BioChemistry: An Indian Journal*, Volume 9, Issue 6, (2015), 213-220.

Nadia Voitovich Valetti, Caren Rausch, Guillermo Picó. A simple toll for *Raphanus sativus* L peroxidase purification and concentration by precipitation with polyacrylate. *BioTechnology: An Indian Journal*. Volume 12, Issue 1, (2015), 25-33.

Capítulo de Libro

Guillermo A. Picó y **Nadia Voitovich Valetti**. Chapter 8: Complexes formation between proteins and polyelectrolytes and their application in the downstream processes of enzyme purification in: *Polyelectrolytes: Thermodynamics and Rheology*. V. P. M., O. Bayraktar, G. Picó (Eds.) Springer- 2014.

Presentaciones a Congresos Internacionales

Guillermo A. Picó, **N. Voitovich Valetti**, L. Cappella, J. Lombardi and V. Boeris
Chymotrypsin interaction with polyanions: Thermodynamics, Solubility and size of the complexes. International Symposium of Polyelectrolytes. Laussane, Suiza, Julio 2012

Nadia Voitovich, M. Emilia Brassesco, M. Victoria Maglione, M. Julia Boggione, Beatriz Farruggia and Guillermo Picó. "Production and isolation of catalase and endoglucanase from *Aspergillus niger* by solid fermentation using agricultural wastes". Total Food 2014, Norwich, England.

Ana Catarina Santos Leite Da Silva, **Nadia Voitovich Valetti**, María Emilia Brassesco, José António Couto Teixeira, Guillermo Picó. Caracterización de matrices de polielectrolitos naturales con alta capacidad de adsorber proteínas y su aplicación para recuperar enzimas. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara, México 2015.

Aravena Pilar, **Voitovich Valetti Nadia**, Guillermo Picó. Estudio de la adsorción de Tripsina sobre una matriz insoluble de alginato y goma guar: su potencial aplicación a la purificación de la enzima a partir de fuentes naturales. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara, México, 2015.

Presentaciones a Congresos Nacionales

Nadia Voitovich Valetti, Ma. Emilia Brassesco y Guillermo Picó. “Estudio de la adsorción de Quimotripsina sobre una matriz insoluble de Alginato y Goma Guar”. 3° Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos. 2014. Santa Fe.

Caren Rausch, **Nadia Voitovich Valetti** y Guillermo Picó. “Caracterización de la interacción entre Quimotripsina y Alginato y su aplicación a la purificación y concentración de la misma a partir de páncreas bovino”. 3° Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos. 2014. Santa Fe.

María Emilia Brassesco, Ma. Victoria Maglione, **Nadia Voitovich Valetti**, Ma. Soledad Belluzo, Guillermo Picó. “Método simple para producir y aislar una enzima estratégica por su empleo en biotecnología: la catalasa fúngica”. XV Congreso y XXXIII Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 2013. Zavalla.

Romina Berino, **Nadia Voitovich Valetti**, Guillermo Picó. “Preparación y funcionalización de una matriz de chitosan-alginato para la adsorción de proteínas”. XV Congreso y XXXIII Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 2013. Zavalla.

Caren Rausch, **Nadia Voitovich Valetti**, Guillermo Picó. “Purificación y concentración de peroxidasa de rabanito (*Raphanus sativus L*) mediante precipitación con poliacrilato”. XV Congreso y XXXIII Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 2013. Zavalla.

Rausch Caren, Berino Romina, **Voitovich Valetti Nadia**, Guillermo Picó. “Estudio de la interacción de polielectrolitos naturales y sintéticos entre sí para el desarrollo de matrices bipoliméricas. VII Jornadas de Ciencia y Tecnología. UNR. 2013. Rosario.

Brassesco Maria Emilia, **Voitovich Valetti Nadia**, Belluzo María Soledad, Guillermo Picó. “Sistemas bifásicos acuosos para la purificación de catalas fúngica a partir de cultivos de *Aspergillus niger*”. VII Jornadas de Ciencia y Tecnología. UNR. 2013. Rosario.

Nadia Voitovich Valetti, Guillermo Picó. “Estudio de la interacción de la peroxidasa de rábano (*Raphanus sativus*) con polielectrolitos sintéticos: Eudragit® L100 y S100”. XVIII Congreso Argentino de Físicoquímica y Química Inorgánica (Cafqi). 2013. Rosario, Argentina.

Nadia Voitovich Valetti, Julia Lombardi, Valeria Boeris, Guillermo Picó. “Desarrollo de una metodología escalable empleando un polielectrolito amigable con el medio ambiente para recuperar quimotripsina de un residuo de la industria frigorífica”. II Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos. 2012. La Plata.

Julia Lombardi, **Nadia Voitovich Valetti**, Guillermo Picó, Valeria Boeris. “Purificación y concentración de proteasas pancreáticas por precipitación con poliacrilato”. II Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos. 2012. La Plata.

Micaela Galante, **Nadia Voitovich Valetti**, Julia Lombardi, Valeria Boeris, Guillermo Picó. “Adsorción de proteínas modelo sobre matrices bipoliméricas no comerciales”. XIII Congreso y XXXI Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 2011. Rosario.

Nadia Voitovich Valetti, Julia Lombardi, Valeria Boeris, Guillermo Picó. “Caracterización del proceso de precipitación-disolución de quimotripsina con polielectrolitos naturales y sintéticos”. V Jornada de Ciencia y Tecnología. UNR. 2011. Rosario.

Julia Lombardi, **Nadia Voitovich Valetti**, Valeria Boeris, Guillermo Picó. “Bioseparación de proteasas pancreáticas empleando métodos no contaminantes”. V Jornada de Ciencia y Tecnología. UNR. 2011. Rosario.

Nadia Voitovich Valetti, Julia Lombardi, Valeria Boeris, Guillermo Picó. “Caracterización del proceso de bioseparación de quimotripsina con tres polielectrolitos”. XI Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial. 2011. Buenos Aires.

Para la realización de esta tesis se recibieron las siguientes becas de entidades públicas:

- **Beca tipo I**, CONICET. Inicio: 1 de abril de 2011.
- **Beca tipo II**, CONICET. Inicio: 1 de abril de 2014.
- **AVE docente**, 2° llamado 2014. Subsidio recibido para realizar una estadía de investigación en el Laboratorio de Ingeniería y Química de Productos de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Estatal de Campinas. Fecha de inicio: 17/01/2015. Fecha de Finalización: 01/02/2015.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el marco de los siguientes subsidios:

- PICT 2013-271**. Proyectos Argentina innovadora 2020. Nuevas matrices poliméricas biodegradables de alta capacidad de adsorción y baja interacción con la biomasa para la purificación de enzimas de importancia biotecnológica.

- PICT bilateral 2012-428**. FonCyT (2013-2015). Escalado de producción de enzimas industriales y su recuperación con polielectrolitos naturales. MinCyT- CONICYT (México)

Índice

Índice.....	i
Abreviaturas, símbolos y palabras tomadas del extranjero.....	vii
i) Abreviaturas:.....	vii
ii) Palabras tomadas del extranjero	viii
1- Introducción.....	1
1.1- La bioseparación	1
1.1.1- Definición.....	1
1.1.2- Metodologías aplicadas para la bioseparación	4
1.2- Los polímeros de cadena flexible.....	6
1.2.1- Los polielectrolitos	8
1.2.2- Solubilidad en agua de los PE.....	8
1.2.3- Propiedades ácido-base de los PE.....	11
1.3- Interacciones entre PE y proteínas: su aplicación a la bioseparación.....	12
1.4- Formación de geles de PE y su aplicación a la bioseparación	16
1.4.1- Geles de PE	16
1.4.2- Adsorción de proteínas en matrices insolubles de PE	19
1.4.3- El proceso de adsorción.....	20
1.4.3.1- <i>Isotermas de adsorción</i>	22
1.4.3.2- <i>Cinética de adsorción</i>	25
1.5- Proteínas utilizadas durante este trabajo	27
1.5.1- Las proteasas.....	27
1.5.2- Tripsina	28
1.5.3- Quimotripsina	30

1.6- Polímeros utilizados durante este trabajo	31
1.6.1- Carragenano	31
1.6.1.1- Fuentes de obtención.....	31
1.6.1.2- Estructura.....	32
1.6.1.3- Propiedades.....	33
1.6.1.4- Usos comerciales.....	34
1.6.2- Alginato.....	34
1.6.2.1- Estructura y fuentes de obtención	34
1.6.2.2- Propiedades y aplicaciones.....	35
1.6.3- Goma Guar.....	37
1.6.3.1- Estructura y fuentes de obtención	37
1.6.3.2- Propiedades y aplicaciones.....	37
2- Objetivos.....	39
3- Materiales y Métodos	40
3.1- Reactivos químicos	40
3.2- Preparación de las soluciones de trabajo.....	40
3.2.1- Proteínas	40
3.2.2- Polímeros	41
3.2.3- Preparación de la matriz de Alg-GG	41
3.2.4- Entrecruzamiento de la matriz Alg-GG.....	42
3.2.5- Reactivos específicos.....	43
3.2.6- Soluciones Reguladoras de pH.....	44
3.3- Metodologías.....	44
3.3.1- Determinación de la actividad enzimática	44
3.3.1.1- QT.....	44
3.3.1.2- Trip.....	45
3.3.2- Determinación de la concentración de proteínas totales	46

3.3.2.1- Absorbancia a 280 nm.....	46
3.3.2.2- BCA.....	47
3.3.3- Determinación de polisacáridos libres.....	48
3.3.4- Estudio de la formación de los complejos insolubles QT-PE mediante medidas de turbidez.....	48
3.3.4.1- Diagramas de solubilidad en función del pH.....	48
3.3.4.2- Titulación turbidimétrica.....	49
3.3.4.3- Cinética de la formación de los agregados insolubles.....	50
3.3.4.4- Variaciones de tamaño del complejo QT-PE.....	51
3.3.5- Efecto de los PE sobre la actividad enzimática de la QT.....	52
3.3.6- Efecto de los PE sobre la estructura de la enzima.....	53
3.3.6.1- Espectros de emisión de fluorescencia de la proteína.....	53
3.3.6.2- Extinción de la fluorescencia nativa de la QT con acrilamida.....	54
3.3.6.3- Estudio de la estabilidad térmica de la proteína en ausencia y presencia del polímero.....	56
3.3.6.4- Efecto del polímero sobre la estabilidad química de la proteína.....	59
3.3.7- Caracterización de las matrices insolubles de Alg-GG.....	61
3.3.7.1- Insolubilidad de la matriz obtenida.....	61
3.3.7.2- Espectroscopia de infrarrojo.....	62
3.3.8- Estudio de la adsorción de QT y Trip sobre la matriz insoluble de Alg-GG.....	64
3.3.8.1- Determinación de las condiciones de adsorción.....	64
3.3.8.2- Caracterización de la cinética del proceso de adsorción.....	65
3.3.8.3- Isotermas de adsorción.....	66
3.3.8.4- Determinación de las condiciones de desorción.....	67
3.3.8.5- Cinética de la desorción.....	68
3.3.8.6- Reutilización de la matriz.....	69
3.3.8.7- Controles de actividad catalítica de las enzimas.....	69

3.3.9- Aplicación de los resultados obtenidos.....	70
3.3.9.1- Fuente de obtención de QT y Trip.....	70
3.3.9.2- Activación de la QT y Trip.....	70
3.3.9.3- Purificación de las proteínas a partir del Hmg.....	71
3.3.9.4- Disminución del volumen de redisolución del precipitado obtenido.....	72
3.3.9.5. SDS-PAGE.....	73
3.4. Manejo de los datos experimentales.....	73
3.5- Instrumental empleado.....	74
4- Resultados y Discusión: Capítulo 1: Precipitación de Quimotripsina utilizando polielectrolitos aniónicos.....	76
4.1- Estudio de la interacción QT-polímeros utilizando técnicas de espectroscopía UV-Visible.....	76
4.1.1- Diagramas de solubilidad.....	76
4.1.2- Titulación de la proteína con los polímeros.....	81
4.1.2.1- Determinación de la relación polímero/proteína para la interacción.....	81
4.1.2.2- Efecto de la fuerza iónica sobre la formación de los agregados.....	86
4.1.2.3- Seguimiento del proceso de precipitación mediante medidas de actividad enzimática.....	88
4.1.2.4- Variación del tamaño de los agregados QT-Carr con la concentración de polímero.....	91
4.1.3- Cinética del proceso de precipitación.....	93
4.2- Efecto de los polímeros sobre la estructura de la enzima.....	97
4.2.1- Espectros de emisión de fluorescencia.....	97
4.2.2- Extinción de la fluorescencia nativa de la QT.....	99
4.2.3- Estabilidad química de la enzima en presencia de los polímeros.....	104
4.2.4- Efecto del Carr sobre la estabilidad térmica de la QT.....	109
4.3- Aplicación de los resultados obtenidos a la purificación de QT a partir de páncreas bovino.....	112

4.3.1- Activación de las proteasas presentes en el Hmg.....	112
4.3.2- Precipitación de QT a partir de los Hmg activados.....	113
4.3.3- Disminución del volumen de re-disolución del precipitado obtenido	120
4.4- Conclusiones y discusión final: Capítulo 1: Precipitación de QT utilizando PE aniónicos.....	121
5- Resultados y Discusión: Capítulo 2: Adsorción de proteasas básicas sobre una matriz insoluble de Alginato y Goma Guar.....	124
5.1- Caracterización de la matriz obtenida.....	124
5.1.1- Estabilidad mecánica y retención de agua de la matriz	124
5.1.2- Estabilidad de las esferas frente a diferentes condiciones experimentales	125
5.1.3- FTIR de las matrices obtenidas.....	127
5.2- Adsorción de proteasas básicas sobre la matriz de Alg-GG tratada químicamente	129
5.2.1- Determinación de las condiciones de adsorción.....	130
5.2.2- Cinética de la adsorción.....	134
5.2.3- Isotermas de adsorción.....	143
5.2.4- Determinación de las condiciones y la cinética de desorción	150
5.2.5- Efecto del protocolo sobre las enzimas	153
5.2.6- Reutilización de la matriz	155
5.3- Aplicación de los resultados obtenidos.....	156
5.3.1- Determinación de la relación Hmg/masa de matriz a utilizar.....	156
5.3.2- Cinética de la adsorción y desorción	158
5.3.3- Eficiencia del proceso de purificación.....	160
5.3.4- SDS-PAGE.....	161
5.4- Conclusiones y discusión final: Capítulo 2: Adsorción de proteasas básicas sobre una matriz insoluble de Alginato y Goma Guar	164
6- Conclusión Final	168
7- Resumen	172

8- Anexos.....	181
8.1- Cinética de adsorción de QT	181
8.2- Cinética de adsorción de Trip.....	182
9- Referencias Bibliográficas	185

Abreviaturas, símbolos y palabras tomadas del extranjero

i) Abreviaturas:

Abs	Absorbancia
Alg	Alginato de sodio
BAPNA	N α -Benzoil-DL-Arginina-p-Nitroanilida
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina Sérica Bovina
BTEE	N-Bencil-L- Tirosin Etil-Éster
Carr	Carragenano
Cit	Buffer citrato de sodio
CPE	Complejo de polielectrolitos
CPP	Complejo proteína-polielectrolito
c.s.p	Cantidad suficiente para
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Epi	Epiclorhidrina; 1-Cloro-2,3-Epoxipropano
GG	Goma Guar
HAc/Ac ⁻	Buffer acético-acetato

Hmg	Homogenado
PCF	Polímero de cadena flexible
PE	Polielectrolito
P _i	Buffer fosfato de sodio
QT	α -Quimotripsina
R ²	Coefficiente de determinación
SCE	Sumatoria de cuadrados del error
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en medio desnaturalizante
Trip	α -Tripsina
Tris	2-Amino-2-Hidroximetil-propano-1,3-diol

ii) Palabras tomadas del extranjero

Buffer	Solución reguladora del pH
Delivery	Transporte
<i>Per se</i>	Por si mismo
Quencher	Extintor de la fluorescencia
Quenching	Proceso de extinción de la fluorescencia

Plateau	Zona de meseta donde el valor de una variable se mantiene constante
<i>Random coil</i>	Estructura al azar de un polímero en solución
Salting in	Fenómeno de incremento de la solubilidad de una molécula debido al aumento en la fuerza iónica del medio
Salting out	Fenómeno de disminución de la solubilidad de una molécula debido al incremento en la fuerza iónica del medio
SDS-PAGE	Del inglés: Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio.

INTRODUCCIÓN

1- Introducción

1.1- La bioseparación

1.1.1- Definición

Las operaciones que comprenden los procesos biotecnológicos a escala comercial se han dividido, tradicionalmente, en dos categorías:

- Operaciones previas (*upstream processing*), dentro de las cuales se incluyen los pasos de preparación de la proteína de interés ya sea mediante utilización de biorreactores, fermentadores o a partir de una fuente natural.
- Operaciones posteriores o bioseparaciones (*downstream processing*), que involucran la recuperación, purificación y concentración de los productos provenientes de la etapa anterior.

Con los avances de la ciencia moderna, principalmente en el campo de la biotecnología, la obtención de enzimas y otras proteínas de interés es materia corriente en gran parte de los laboratorios y empresas del mundo. En general, la macromolécula de interés se halla diluida en un sistema complejo junto con otras macromoléculas y, en algunos casos, otros componentes celulares. Uno de los principales desafíos con los que se encuentra la biotecnología moderna es encontrar la capacidad de separar y purificar la macromolécula de interés del resto de componentes no deseados.

El proceso de bioseparación de proteínas se refiere a la *separación*, *purificación* y *concentración* de una proteína a partir de un producto complejo de diversas procedencias como puede ser animal, microbiana, vegetal o artificial. El mismo ha adquirido mayor importancia en los últimos años debido a la creciente necesidad de disponer de grandes cantidades de proteínas con diversos grados de pureza dependiendo del uso final que se le vaya a dar.

La importancia del estudio de la bioseparación radica en que muchos de los métodos de separación conocidos permiten obtener proteínas con un grado de pureza aceptable a escala de laboratorio pero son muy difíciles de aplicar en macroescala. En la actualidad existe un creciente interés de las empresas en desarrollar procesos escalables y eficientes que permitan llevar rápidamente al mercado productos nuevos y económicos [1-2]. Es necesario destacar que el costo final del proceso de bioseparación es tan significativo como su eficiencia, ya que el mismo puede llegar a representar hasta el 80% del costo total de obtención del producto, como puede observarse en la tabla 1.1 [3-4].

Tabla 1.1: Influencia del costo promedio del proceso de bioseparación de diversos compuestos de interés sobre el costo final de los mismos

Producto	Influencia en el costo final (%)
Polímeros	40-50
Enzimas industriales	40-65
Proteínas terapéuticas	50-70
Anticuerpos monoclonales	50-70
Proteínas del plasma	70-80

Las etapas de separación pueden explotar las diferencias en las propiedades químicas, estructurales y funcionales entre la proteína de interés y otras proteínas de la mezcla en bruto. Estas propiedades incluyen el tamaño, forma, punto isoeléctrico, distribución de carga eléctrica, hidrofobicidad, solubilidad, densidad, afinidad de unión a ligando, metal de unión, asociación reversible, modificaciones post-traduccionales y las secuencias o estructuras específicas. Mediante la explotación de estas variaciones en las propiedades físicas y químicas entre las proteínas, varias metodologías pueden ser aplicadas para diseñar un esquema de purificación viable [5]. Dentro de este campo, el objetivo a lograr es el mayor grado de pureza posible con el menor número de operaciones unitarias. La disminución del número de pasos es crítica ya que en cada etapa de purificación aplicada se pierde parte de la proteína de interés y, además, para proteínas inestables la disminución del tiempo total del proceso es muy importante para mantener su estructura y actividad catalítica en el caso de enzimas [6].

Otro aspecto a tener en cuenta en cualquier proceso de bioseparación, ya sea a escala de laboratorio o macroescala, es el efecto que tenga el proceso sobre el medio ambiente. Una metodología que utilice productos tóxicos o contaminantes no podrá ser aplicada aun cuando rinda buenos resultados en cuanto a la purificación.

En resumen, un proceso bioseparativo eficaz será aquel que brinde un buen rendimiento y purificación, con el menor número de operaciones unitarias, que lleve el menor tiempo posible, menor costo y que tenga mínimo impacto sobre la estructura y actividad de la proteína de interés y el medio ambiente [4]. Estas

variables no pueden ser maximizadas todas al mismo tiempo de manera que, dependiendo del objetivo final que se le vaya a dar a la proteína, será la variable más importante a tener en cuenta.

1.1.2- Metodologías aplicadas para la bioseparación

Existen diversas metodologías disponibles para realizar bioseparación de proteínas, pero sólo algunas permiten su aplicación en macroescala. Entre ellas podemos nombrar [7]: la filtración con membranas, extracción líquido-líquido [8], precipitación usando polielectrolitos [9-10] y adsorción [11-13].

Estas metodologías son sencillas, requieren equipamientos simples y, en la mayoría de los casos, no utilizan grandes cantidades de reactivos. El grado de purificación y rendimiento alcanzado con las mismas por separado es bajo (variando entre 40-80% para el rendimiento y entre 1-6 para el factor de purificación), pero en combinación pueden dar muy buenos resultados.

Otras operaciones disponibles para realizar bioseparación son: la cristalización, precipitación con sales de amonio [14], y las técnicas cromatográficas: de afinidad [15], de intercambio iónico [14], filtración en gel [14], entre otras. La dificultad de poder aplicarlas a gran escala se debe al costo de las mismas generado por la elevada cantidad de reactivos necesaria, al equipamiento específico que requieren y a la gran cantidad de desechos que generan.

La tabla 1.II presenta un resumen de las técnicas de purificación de macromoléculas más empleadas.

Tabla 1.II: Metodologías usualmente empleadas para la purificación de macromoléculas.

Técnica	Fundamento de la separación	Resolución	Referencias
Precipitación con sulfato de amonio	Solubilidad	Baja	[16-17]
Precipitación con polielectrolitos	Carga, solubilidad	Baja	[18-21]
Filtración molecular	Tamaño, forma	Baja	[22]
Sistemas bifásicos acuosos	Solubilidad, hidrofobicidad	Baja/Media	[8, 23-25]
Cromatografía de intercambio iónico	Carga	Alta	[26-27]
Cromatografía de interacción hidrofóbica	Hidrofobicidad	Alta	[28]
Cromatografía de afinidad	Reconocimiento molecular	Alta	[29]

En este caso en particular, se desea desarrollar nuevas metodologías para la separación de proteínas de interés comercial utilizando polielectrolitos (PE) de manera que sea posible utilizar las técnicas desarrolladas como un primer paso en un proceso de purificación en macroescala.

1.2- Los polímeros de cadena flexible

Los polímeros son macromoléculas formadas por la repetición de unidades estructurales, denominadas monómeros, unidas entre ellas mediante enlaces covalentes hasta alcanzar un peso molecular desde 5 a 500 kDa [30].

Los polímeros de cadena flexible (PCF) constituyen un grupo amplio de sustancias que poseen diversos grupos funcionales. Su principal característica, que permite agruparlos dentro de este grupo, es la presencia de enlaces simples entre sus átomos lo que les da la posibilidad de rotar libremente alrededor del esqueleto de la molécula y adoptar diversas conformaciones. Esta característica permite que adquieran una estructura del tipo *random coil* en solución [31].

Aunque no hay una clasificación universal de los PCF, pueden clasificarse en base a cualquiera de las siguientes categorías [32]:

- la estructura de polímero (lineal, de cadena ramificada) ;
- el tipo de polimerización (suma, polímeros de condensación) ;
- biodegradabilidad.

Sin embargo, la mayoría de los autores coinciden en que los PCF se pueden agrupar en tres grandes grupos según la fuente de obtención, como se muestra en la Figura 1.1.

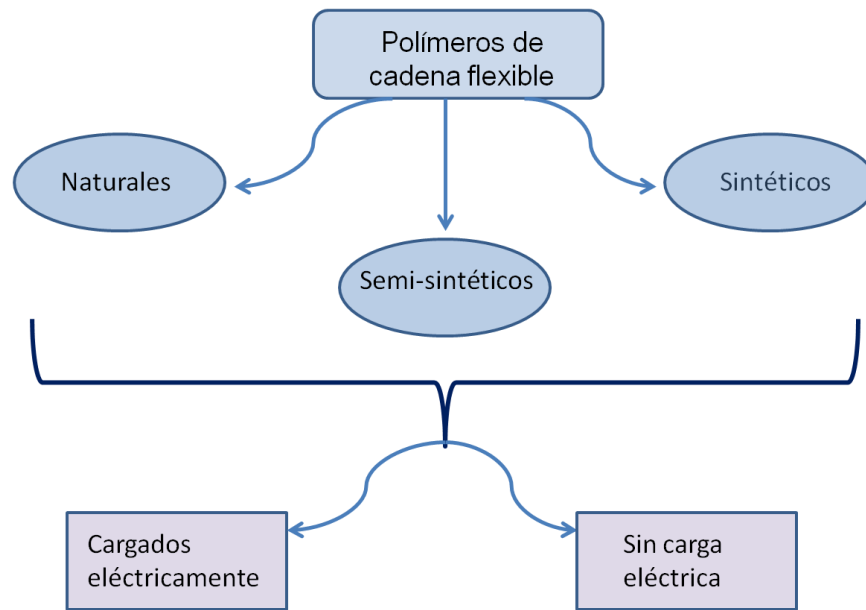


Figura 1.1: Clasificación de los PCF en base a su fuente de obtención y su carga eléctrica

Los PCF provenientes de la síntesis industrial no son degradables, por lo tanto no se pueden descartar en el medio ambiente; algunos son tóxicos y otros no lo son, como por ejemplo los polietilenglicoles. La mayoría de los polímeros provenientes de fuentes naturales son polisacáridos biodegradables y no tóxicos. No se encuentran en la naturaleza como se emplean, sino que derivan de un tratamiento químico que los modifica haciendo que sean solubles en un medio acuoso. Por lo antes expuesto, los PCF naturales han adquirido mayor importancia biotecnológica en los últimos tiempos.

Dentro de esta clasificación, además, los PCF pueden ser divididos en dos categorías, dependiendo del tipo de grupos funcionales presentes en la molécula: los que poseen grupos ionizables que les dan carga eléctrica (PE) y los que poseen sustituyentes sin carga eléctrica.

1.2.1- Los polielectrolitos

Los PE son macromoléculas que poseen un número relativamente grande de grupos funcionales que se encuentran cargados eléctricamente o, en determinadas condiciones, adquieren carga eléctrica [33]. Pueden ser tanto policationes, polianiones o polianfolitos, ya que la carga neta de los mismos depende de los grupos funcionales que poseen, los cuales pueden estar cargados negativa o positivamente [34].

Pueden ser sintéticos o naturales pero cuando la estructura secundaria está ausente en los segundos, no hay diferencias de comportamiento entre ellos [35]. La importancia de esta diferenciación, en este caso, se debe a que el desarrollo de métodos que utilicen PE naturales y no contaminantes es central a esta investigación. Ejemplos de PE sintéticos son: ácidos poliacrílicos y metaacrílicos, polivinilsulfonatos y las diferentes clases de Eudragit®. Dentro de los naturales podemos nombrar: chitosan, carragenano (Carr), alginato (Alg), carboximetilcelulosa, entre otros.

1.2.2- Solubilidad en agua de los PE

Dentro de los diversos tipos de PE conocidos, los que tienen aplicaciones biotecnológicas son aquellos solubles en medio acuoso. Un polímero es soluble en agua cuando posee suficientes grupos hidrofílicos a lo largo de su estructura. Los principales grupos presentes en los PE son los grupos aminos, amidas, carboxilo y sulfónicos. La solubilidad del PE depende del estado de carga de dichos grupos y, por lo tanto, de las condiciones del medio que afectan dicho estado como el pH y la concentración y tipo de sales presentes [36].

El efecto del pH sobre la solubilidad en agua de los PE es fácil de comprender: las variaciones del pH del medio producen cambios en el estado de ionización de los grupos hidrofílicos y, por lo tanto, del PE en conjunto. En la zona de pH donde el PE se encuentra cargado se producen repulsiones intra e intercatenarias que mantienen al mismo en una conformación extendida y, por lo tanto, soluble en agua. En la zona donde el PE es neutro, las cadenas de PE pueden interactuar entre ellas y llegar a formar agregados insolubles.

El efecto de la fuerza iónica se debe al apantallamiento de cargas que produce el agregado de una sal inerte al medio. A bajas concentraciones de sal se produce un fenómeno de aumento de la solubilidad debido a la presencia de los iones salinos (*“salting in”*). Cuando la concentración de sal inerte alcanza un valor crítico los iones afectan negativamente la solubilidad del polímero, en un fenómeno conocido como *“salting out”*. El comportamiento de los PE frente a las sales aquí descrito es general, pero depende también del tipo de sal utilizada.

Los efectos que dependen del tipo de ión se denominan efectos específicos de los iones. Lewith y Hofmeister demostraron, en 1888, que la precipitación de proteínas depende también del tipo de sal presente en el medio y que no se requiere igual concentración de distintas sales para alcanzar el mismo efecto sobre el PE [36-37]. Este comportamiento de los PE frente a las sales exhibe una tendencia llamada *“serie de Hofmeister”* y es más pronunciada para los aniones [38]. En la Fig. 1.2 se muestra dicha serie.

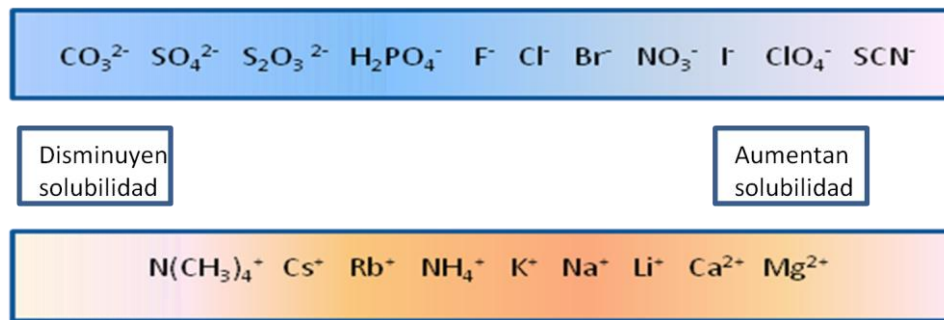


Figura 1.2: Serie de Hofmeister para aniones y cationes

Los iones ubicados a la izquierda son llamados cosmotrópicos y los ubicados a la derecha caotrópicos. Estos términos se refieren a la capacidad de los iones de alterar la malla de puentes de hidrógeno del agua. Los iones cosmotrópicos tienen un efecto “ordenador” sobre la estructura del agua, están fuertemente hidratados y tienen efectos estabilizantes y de “*salting out*” sobre las macromoléculas. Los caotrópicos, en cambio, son “destructores” de la estructura del agua y tienen efecto de “*salting in*” en las macromoléculas [38].

En la descripción anterior se habló de iones inertes, pero también los PE pueden interactuar con determinados iones, en general di o trivalentes, de una manera más específica y esto hace que cambie el comportamiento del PE frente a la sal. En general se requiere una concentración mucho menor de estos iones, con respecto a los inertes, para lograr la precipitación.

Otros factores que influyen sobre la solubilidad en agua de los PE son los factores intrínsecos al mismo como la hidrofobicidad, el largo de la cadena y la densidad de carga. Como es lógico, cuanto más hidrofóbico sea el PE menor será su solubilidad en agua. A su vez, los PE de cadenas más largas requieren mayores concentraciones de sal tanto para los fenómenos de *salting in* como de *salting out*.

Finalmente, el efecto de la densidad de carga también es sencillo de explicar: cuanto mayor densidad de carga tenga el PE mayor será su estabilidad y solubilidad en soluciones acuosas.

1.2.3- Propiedades ácido-base de los PE

Los grupos ionizables presentes en los PE les confieren a los mismos propiedades ácido-base en solución acuosa. Al poseer un mismo PE diversos grupos en la misma cadena (se trata de poliácidos o polibases) la teoría básica que explica el comportamiento ácido-base de dichos grupos aislados no puede ser aplicada directamente. En el caso de los PE, la energía requerida para cambiar el estado de protonación de la molécula depende del estado de ionización del mismo ya que, dependiendo de la densidad de cargas presentes en la superficie del PE, será la barrera de energía electrostática que habrá que superar para realizar el movimiento de cargas.

El trabajo adicional requerido para mover un protón en contra de la atracción electrostática se define mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{el} = N_a \cdot e \cdot \varphi \quad (1)$$

Donde: N_a es el número de Avogadro; e es la carga básica y φ es el potencial electrostático de la superficie del PE.

Además, para llegar a encontrar una ecuación que describa el comportamiento del PE se requiere de dos ecuaciones básicas del equilibrio ácido-base, con ligeras modificaciones:

$$pK_{a_{ap}(PE)} = pH + \log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) \quad (2)$$

$$\alpha = \alpha' + \frac{C_{H^+}}{C_{PE}} \quad (3)$$

Donde: $K_{a_{ap}(PE)}$ es la constante aparente de acidez del PE; α es el grado de disociación; α' es el grado de neutralización; C_{H^+} es la concentración molar de protones y C_{PE} es la concentración molar de PE.

A partir de las ecuaciones 1, 2 y 3 puede deducirse la fórmula para relacionar la constante de acidez aparente para el PE con la constante de acidez intrínseca (K_a^0):

$$pK_{a_{ap}(PE)} = pK_a^0 + 0,4343 \frac{\Delta G_{el}}{RT} \quad (4)$$

La constante ácida de los grupos ácidos en los PE suele ser diferente que las correspondientes a los ácidos de menor peso molecular. Entre otros factores que influyen sobre la acidez se encuentran la presencia de sustituyentes, grupos hidrofóbicos y los efectos conformacionales.

1.3- Interacciones entre PE y proteínas: su aplicación a la bioseparación

Los complejos proteína-PE (CPP) se producen como resultado de una reacción de equilibrio donde se intercambian iones y se producen interacciones nuevas [39]. La formación de los mismos se da debido a un conjunto de fuerzas no covalentes que actúan en conjunto. Las principales interacciones son del tipo electrostáticas entre los grupos cargados eléctricamente presentes en ambas macromoléculas. La formación de puentes hidrógeno entre la proteína y el PE

también es importante para la formación de los complejos como así también las interacciones hidrofóbicas [35].

Existen evidencias experimentales para asegurar que estos tipos de interacciones son las más importantes para la formación de los CPP. Para el caso de las interacciones electrostáticas la disminución y, en algunos casos, el impedimento para la formación de los complejos en presencia de concentraciones elevada de sales y la dependencia con el pH para la formación de los mismos es la principal evidencia experimental encontrada [19-20, 40]. Para el caso de las interacciones hidrofóbicas su importancia se deduce a partir de la dependencia con la temperatura de la entropía y entalpía de la interacción proteína-PE [35, 41].

Termodinámicamente, la principal fuerza conductora en la formación del CPP para el caso de los PE fuertes es la reducción en la energía electrostática total del sistema debido a la liberación de los contraiones luego de la formación del complejo. Para el caso de los PE débiles, en cambio, el proceso de formación del CPP se hace favorable debido a la disminución de la entalpía del sistema a causa de la atracción electrostática que se genera [42].

Los CPP pueden encontrarse en diversos estados dependiendo del grado de solvatación de los mismos [35]. Los posibles estados son:

- **Complejos solubles**, los cuales están fuertemente hidratados. En estos el 5-15% del volumen hidrodinámico del complejo está ocupado por proteínas. En general, hay un exceso de carga en el complejo que le da la posibilidad de interactuar con el solvente [35].

- **Coacervados**, se da una separación de fases líquido-líquido [43]. Están menos hidratados y se generan cuando la carga neta se aproxima a cero. Contienen entre 20-30% de proteína y polímero.
- **Precipitados**, se da una separación de fases líquido-sólido. Se forman cuando hay alta complementariedad e interacciones más fuertes entre la proteína y el PE. Las condiciones del sistema que favorecen su formación son: PE con alta densidad de carga, pH alejados del pI y bajas fuerzas iónicas [35].
- **Multicapas de PE**, es otro tipo de estado sólido en donde la proteína se encuentra en una red de moléculas de PE que forman capas. La proteína se inserta en la multicapa como un componente adicional de la misma o reemplazando a moléculas de PE las cuales son desplazadas.
- **Geles de PE**, sólo se da en PE que poseen la capacidad de formar geles. Se pueden dar dos situaciones: en una la proteína se incorpora en un gel preformado y, en la otra, la proteína misma participa en la formación del gel [35].

Todos los estados en los cuáles se presentan los CPP pueden aplicarse a la bioseparación. Durante este trabajo en particular se aprovechó la capacidad de formación de complejos insolubles entre la proteína y el PE, los que pueden ser separados del resto de los componentes del sistema por una simple decantación.

La formación de CPP insolubles puede describirse molecularmente como un proceso en tres pasos, como se muestra en la Figura 1.3. En el primero, se da la interacción entre las cargas eléctricas libres del PE y las de la proteína, el complejo formado es soluble e involucra a varias moléculas de proteína unidas a una misma molécula de PE. En un segundo paso, los complejos solubles interaccionan entre sí mediante las cargas eléctricas libres que poseen y dan lugar a complejos insolubles que pueden precipitar fácilmente. Finalmente, los complejos insolubles pueden interaccionar entre ellos y perder hidratación para dar lugar a la formación de macroagregados [44-45].

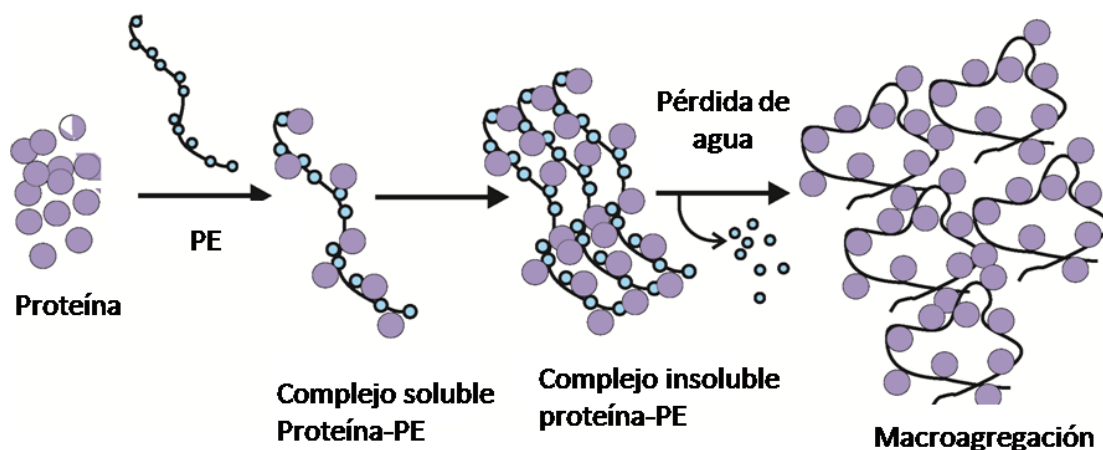


Figura 1.3: Mecanismo de formación de los CPP

Cada uno de los pasos en la formación de los CPP depende fuertemente del pH y la fuerza iónica del medio del trabajo. Dubin y col. [46] estudiaron la influencia de estos dos factores sobre la formación de los CPP e identificaron dos valores de pH críticos en la formación de los CPP que se encuentran fuertemente influenciados por el tipo y concentración de sales presentes en el medio: el pH_c , el cual es el pH al cual

comienza la formación de los complejos solubles y el pH_{ϕ} que corresponde al valor de pH donde comienza la separación de fases macroscópica.

Finalmente, es importante destacar que, para poder utilizar estos polímeros en un proceso de purificación de proteínas, se deben reunir ciertas características. El polímero, por su parte, debe ser económico, no tóxico y de fácil disponibilidad en el mercado. Por otro lado, la interacción entre polímero y proteína no debe ser demasiado fuerte, de forma tal que no haya desnaturalización ni pérdida de la estructura y actividad biológica de la proteína, y el complejo obtenido pueda ser fácilmente dissociable.

1.4- Formación de geles de PE y su aplicación a la bioseparación

1.4.1- Geles de PE

Algunos PE pueden formar geles debido a la capacidad que poseen sus sustituyentes laterales de complejar determinados iones, en general, divalentes [47]. El mecanismo primario de esta gelificación ionotrópica involucra las cadenas de PE extendidas las cuales adoptan conformaciones regulares y dimerizan debido a la coordinación que se produce entre sus grupos cargados y el ión (Figura 1.4) [47].

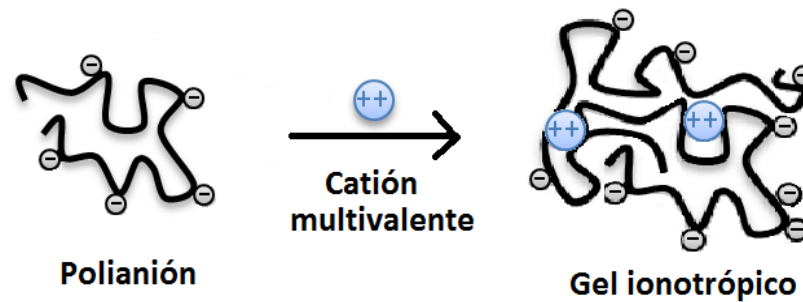


Figura 1.4: Mecanismo de gelificación ionotrópica

Hay diversos polímeros que presentan esta capacidad y entre ellos podemos nombrar: Alg, ciertas clases de Carr, pectina, goma guar (GG). La posibilidad de formar geles con estos PE permite, por ejemplo, su utilización como micropartículas para el transporte de drogas de liberación controlada en el interior del organismo [48-51] y su utilización en la purificación de macromoléculas [13].

Otra posibilidad para obtener geles es mediante la formación de complejos entre PE. Los PE de carga opuesta pueden interactuar en solución para formar complejos de PE (CPE) solubles o insolubles (Figura 1.5). La ganancia en entropía del sistema debido a la liberación de las restricciones es la principal fuerza conductora para la formación de los mismos [52]. En general los CPE se forman por interacción electrostática entre las cadenas de PE, aunque también pueden estar presentes fuerzas de Van der Waals, puente hidrógeno e interacciones hidrofóbicas [34].

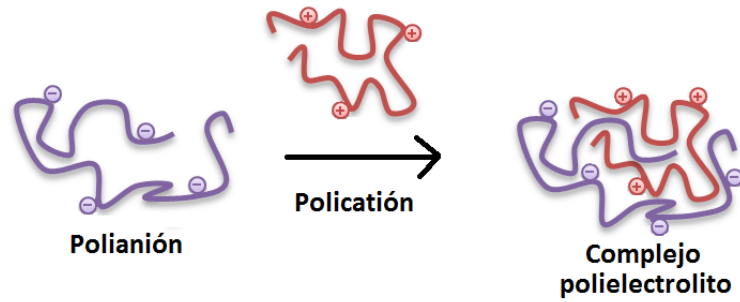


Figura 1.5: Esquema general de la formación de CPE

La estequiometría y el tipo de ordenamiento obtenido finalmente depende del tipo de PE utilizado, de la densidad de cargas del mismo y de cualquier condición del medio que afecte el estado de cargas del PE como es el pH, la fuerza iónica y la relación de concentraciones entre los PE. A su vez, dependiendo de dichas condiciones, un mismo conjunto de PE puede formar CPE con diferentes formas y estequiometrías.

Una de las desventajas de trabajar con los geles detallados anteriormente es que, si se modifican las condiciones del medio, los mismos pueden disolverse. Para el caso de los geles obtenidos mediante gelificación ionotrópica, eliminar del medio el ión que produjo la insolubilización lleva a la rápida disolución del gel formado. Mientras que, para el caso de los CPE, la solubilidad de los mismos es altamente sensible al pH y la fuerza iónica del medio en que se encuentran.

Para sortear este problema, puede llevarse a cabo un entrecruzamiento de los mismos con algún reactivo químico como glutaraldehído o epiclorhidrina (1-Cloro-2,3-epoxipropano; Epi), de forma tal que se formen interacciones covalentes entre las moléculas de polímero (Figura 1.6) [53]. De esta forma la matriz será estable en

ausencia de los iones que formaron el complejo, o frente a variaciones de pH o fuerza iónica.

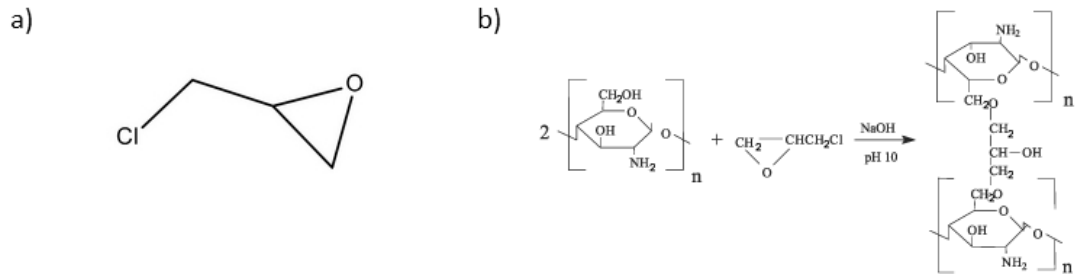


Figura 1.6: a) Estructura de la Epi, b) Entrecruzamiento de Chitosan tratado con Epi.

1.4.2- Adsorción de proteínas en matrices insolubles de PE

Uno de los principales cuestionamientos que se plantean al utilizar la precipitación con PE para la purificación de proteínas es el hecho de que la proteína purificada queda en solución junto con el PE utilizado para la precipitación. Una alternativa eficaz para evitar este inconveniente es la utilización de matrices insolubles de PE sobre las cuáles la proteína de interés sea adsorbida. Una vez adsorbida, la proteína puede ser desorbida de la matriz por un cambio en las condiciones del medio que afecten el estado de carga de alguna de ellas o de ambas. Luego de la desorción la proteína quedará en la fase líquida y la matriz en la fase sólida. Esta metodología presenta dos ventajas importantes con respecto a la precipitación utilizando PE: la posibilidad de obtener la proteína sin el polímero y la posibilidad de re-utilizar la matriz formada para posteriores procesos de adsorción. Además, como ya se mencionó, es sencilla, económica y fácilmente escalable.

Diversos materiales se emplean para la obtención de matrices utilizadas para adsorción de proteínas, entre ellos podemos nombrar: núcleos de metal recubiertos por polímeros y matrices comerciales formadas por polisacáridos con grupos ácidos, básicos o hidrofóbicos en su superficie (Sepharosa®, Strem Line®) [11]. El principal problema que plantea la utilización de estas matrices es su elevado costo y su corta vida útil. Polímeros naturales como Chitosan, Alg, Carboximetilcelulosa y sintéticos como poliacrilatos han mostrado capacidad de formar matrices insolubles con diferentes propiedades bioadsorbentes [54-56]. Las matrices así formadas presentan cualidades tales como alta capacidad de unirse selectivamente a proteínas, regenerabilidad y ofrecen la posibilidad de ser preparadas con diferentes configuraciones geométricas, de distintos tamaños y permeabilidades.

1.4.3- El proceso de adsorción

La adsorción es una de las operaciones más utilizadas para la etapa de concentración y purificación de macromoléculas a partir de homogenados de tejidos animales y vegetales o a partir de caldos de cultivo.

En el proceso de adsorción se encuentran dos protagonistas principales: el adsorbente y el adsorbato. Según las características que posean cada uno de estos componentes se podrán obtener distintas características para el proceso de adsorción.

Pueden distinguirse cuatro etapas fundamentales en el proceso de adsorción (Figura 1.7): una primera etapa de contacto entre adsorbato y adsorbente seguida de la adsorción propiamente dicha. Luego, una etapa de lavado para eliminar impurezas

y material adsorbido inespecíficamente y finalmente, una etapa de elución para recuperar el adsorbato en fase líquida. Una quinta etapa, que no siempre es posible pero que tiene una gran importancia desde el punto de vista económico y de disminución de desechos, es la regeneración de la matriz adsorbente para ser utilizada en un nuevo ciclo de adsorción.

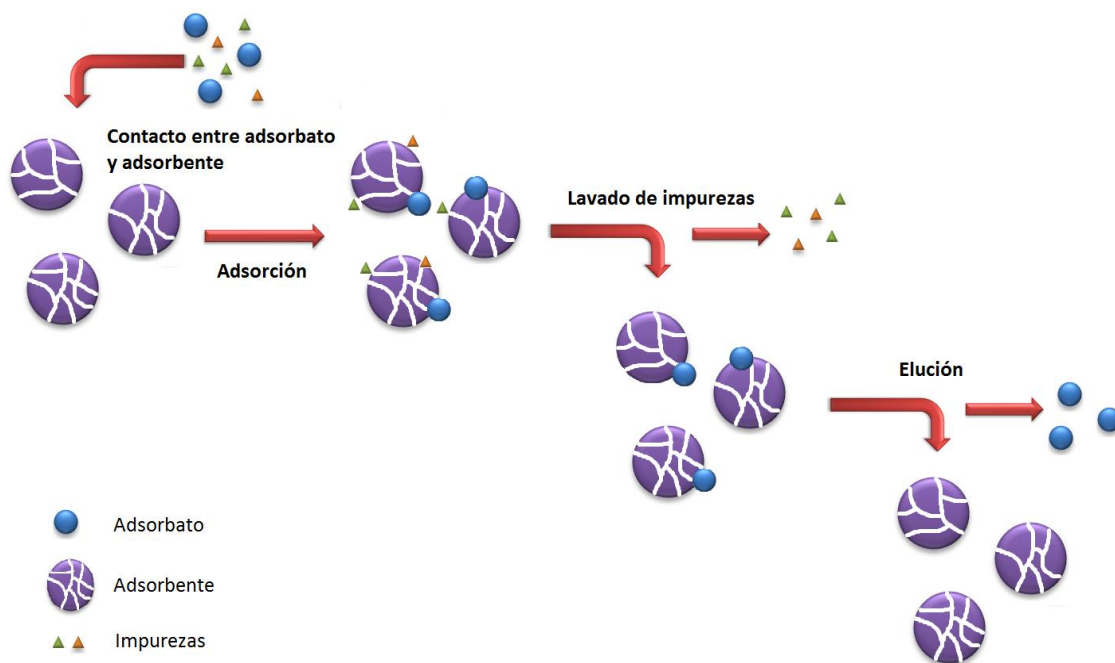


Figura 1.7: Esquema simplificado del proceso de adsorción

La adsorción sobre los sólidos se clasifica en adsorción física (fisiosorción) y adsorción química (quimiosorción) aunque no hay una clara división entre las mismas. En la adsorción física, el adsorbato se mantiene unido a la superficie del adsorbente por medio de fuerzas de Van der Waals relativamente débiles. En la quimiosorción se produce una reacción química en la superficie del adsorbente y el adsorbato se mantiene unido a través de enlaces químicos relativamente fuertes. Otra característica importante es que la adsorción física no es específica mientras

que la quimiosorción es similar a las reacciones químicas ordinarias en cuanto a su elevada especificidad [57].

El proceso de adsorción física es un fenómeno de superficie en el cual las moléculas de soluto (adsorbato) se concentran en una superficie sólida (adsorbente) debido a fuerzas intermoleculares entre el adsorbato y el adsorbente. Las fuerzas intermoleculares implicadas, en general, son del tipo de Van der Waals, electrostáticas o interacciones hidrofóbicas. Debido a la naturaleza de estas fuerzas, el fenómeno de adsorción es fácilmente reversible.

La adsorción de proteínas puede realizarse trabajando en sistemas en batch, en columna y en lecho expandido. Dependiendo del tipo de sistema con el que se trabaje serán los parámetros de interés a determinar. Para un proceso en batch como el que se estudió en este caso la caracterización del sistema se realiza mediante el estudio de las isothermas y la cinética de la adsorción.

1.4.3.1- Isothermas de adsorción

Las isothermas de adsorción representan gráficamente la capacidad de adsorción (Q) en función de la concentración de adsorbato en la fase líquida, en el equilibrio y a temperatura constante [58]. La obtención de las isothermas de adsorción es importante ya que permiten evaluar la capacidad de adsorción de un determinado sistema, bajo distintas condiciones. Además, existen diversos modelos matemáticos de isothermas que permiten ajustar los datos experimentales y obtener parámetros que, dependiendo del modelo utilizado, permiten describir el tipo de adsorción y obtener los parámetros termodinámicos del proceso.

Existen diferentes modelos matemáticos para las isothermas de adsorción cada uno basado en consideraciones, supuestos y aproximaciones diferentes. Los modelos más utilizados para el modelado de los datos experimentales son los de Langmuir y Freundlich debido a su simplicidad y facilidad de interpretación [58]. En la Figura 1.8 se presenta un resumen de algunos de los modelos de isothermas más utilizados.

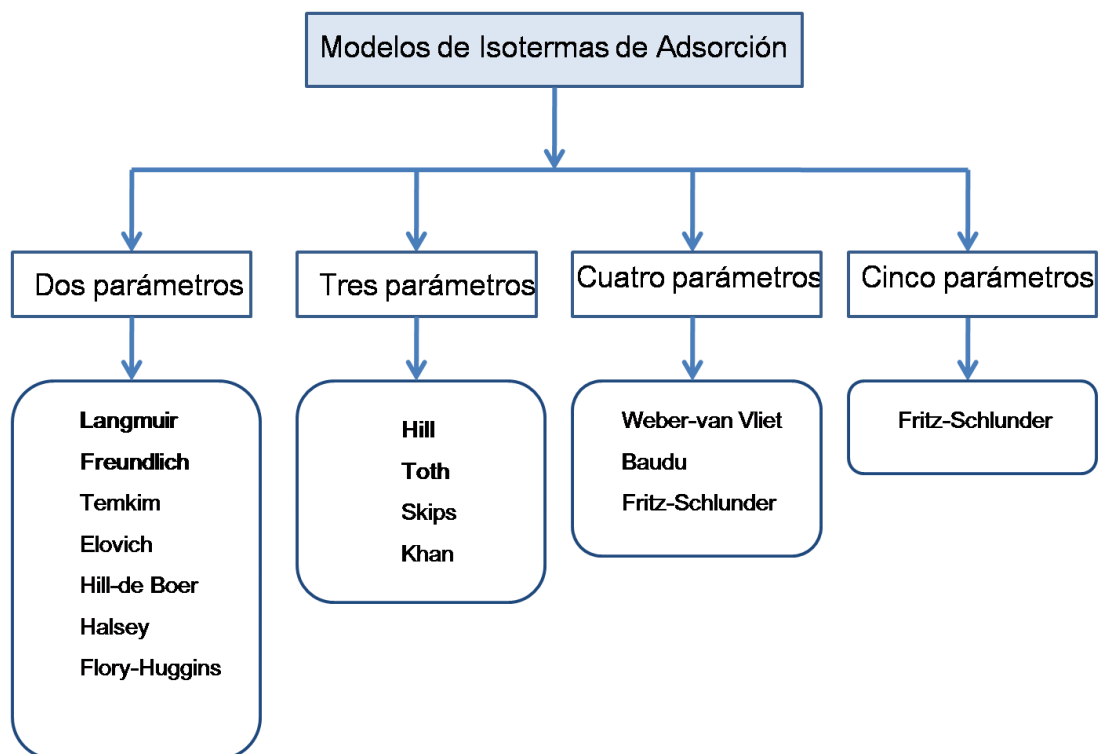


Figura 1.8: Principales modelos de isothermas de adsorción.

Adaptado de S. Rangabhashiyam y col. [59]

Como puede observarse, existen muchos modelos que intentan explicar matemáticamente el fenómeno de adsorción. A continuación se detallan los modelos más significativos seleccionados para el trabajo realizado.

El modelo de **Langmuir** describe cuantitativamente la formación de una monocapa de adsorbato sobre la superficie externa del adsorbente. Es una de las isothermas más utilizadas y se encuentra representada en la siguiente ecuación:

$$q_e = \frac{Q_0 K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (5)$$

Donde: C_e es la concentración de equilibrio de adsorbato (mg/L), q_e es la cantidad de adsorbato adsorbida por gramo de adsorbente en el equilibrio (mg/g), Q_0 se refiere a la capacidad máxima de la monocapa (mg/g) y K_L es la constante de Langmuir (L/mg) [59]. La aplicación de este modelo se basa en las siguientes hipótesis [60]:

- Sólo se adsorbe una monocapa de adsorbato.
- La adsorción tiene lugar en sitios específicos y los mismos son homogéneos.
- Una vez que un sitio está ocupado, no hay más adsorción en el mismo.
- La energía de la adsorción es constante y no depende del número de sitios ocupados.
- No hay interacción entre las moléculas adsorbidas en sitios vecinos.

El modelo de **Freundlich**, por otra parte, es empírico y se utiliza para describir la adsorción en multicapas, con interacción entre las moléculas adsorbidas. El modelo supone que los sitios más fuertes se ocupan primero y que la fuerza de la interacción disminuye a medida que los sitios son ocupados [58]. La ecuación que describe al mismo es la siguiente:

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \quad (6)$$

Donde: q_e y C_e tienen el mismo significado que en el modelo de Langmuir, K_F es la constante de Freundlich ($\text{mg}^{1-(1/n)}\text{L}^{1/n}\text{g}^{-1}$) y n representa la intensidad de la adsorción.

Finalmente, el modelo de Hill describe la adsorción competitiva no ideal [61]. El mismo fue desarrollado para explicar la unión del O₂ a la hemoglobina pero luego fue aplicado a diferentes sistemas [62]. El modelo asume a la adsorción como un fenómeno cooperativo donde la unión del ligando en un sitio del adsorbente puede influenciar a los demás sitios de unión en el mismo. El modelo de isoterma de Hill se encuentra expresado matemáticamente de la siguiente manera:

$$q_e = \frac{q_{SH} C_e^{n_H}}{K_D + C_e^{n_H}} \quad (7)$$

Donde: q_{SH} es la máxima capacidad de adsorción del adsorbente (mg/L), K_D es la constante de Hill y n_H es el coeficiente de cooperatividad de Hill para la interacción [59].

1.4.3.2- Cinética de adsorción

La velocidad a la cual la adsorción tiene lugar es de fundamental importancia cuando se diseñan sistemas de adsorción en batch, por ello es importante establecer la dependencia de la misma con el tiempo bajo diferentes condiciones de trabajo [63]. Existen diferentes modelos cinéticos para el ajuste de los datos experimentales, los mismos se presentan en la tabla 1.III.

Tabla 1.III: Modelos cinéticos aplicados al proceso de adsorción en batch.

Modelo cinético	Ecuación	Parámetros
Pseudo-primer orden [64]	<p>Forma no lineal:</p> $q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \quad (8)$ <p>Forma lineal:</p> $\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (9)$	<p>q_t(mg/g)=cantidad de adsorbato adsorbida a un tiempo t</p> <p>q_e(mg/g)= máxima capacidad de adsorción del adsorbente en esa condición</p> <p>k_1(min⁻¹)= Constante de velocidad de pseudo-primer orden</p> <p>t (min)= tiempo</p>
Pseudo- segundo orden [65]	<p>Forma no lineal:</p> $q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t} \quad (10)$ <p>Forma lineal:</p> $\frac{t}{q_t} = \left(\frac{1}{k_2 q_e^2} \right) + \frac{t}{q_e} \quad (11)$	<p>q_t, q_e y t poseen el mismo significado que en el modelo de pseudo-primer orden</p> <p>k_2(g.mg⁻¹.min⁻¹)= constante de velocidad del modelo</p> <p>$k_2 \cdot q_e^2$= velocidad inicial de adsorción</p>
Weber- Morris [63]	$q_t = k_i t^{\frac{1}{2}} \quad (12)$	<p>k_i(mg.g⁻¹.min^{-0,5})= coeficiente de difusión interno</p>

El modelo de pseudo-primer orden asume que la etapa limitante del proceso de adsorción será la transferencia de masa desde el seno de la solución hacia la superficie del adsorbente [66]. El de pseudo-segundo orden plantea al proceso de adsorción como una reacción química en la cual la etapa limitante de la velocidad es la interacción del adsorbente y el adsorbato ya sea mediante formación de enlaces covalentes o mediante interacción iónica [67]. El modelo de Weber-Morris, por su parte, considera que el paso limitante de la velocidad en los sistemas que ajustan a dicha ecuación es la difusión intra-partícula de las moléculas de adsorbato en el adsorbente [67].

1.5- Proteínas utilizadas durante este trabajo

1.5.1- Las proteasas

Las proteasas son enzimas que actúan escindiendo enlaces peptídicos de las proteínas. Existen diferentes tipos, entre ellos las serin proteasas. Se denominan así porque tienen un mecanismo catalítico común caracterizado por la posesión de un residuo de Serina reactivo esencial para su actividad enzimática ya que es el que ataca el enlace péptido para dar lugar a la formación de un intermediario acilo-enzima [68]. Otro rasgo distintivo de esta clase de enzimas es la presencia de una “Tríada catalítica” de Asparagina-Histidina-Serina esencial para su mecanismo catalítico [69]. Las serin proteasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y fueron encontradas en todos los organismos vivos e incluso en muchos virus [68].

Dentro de este grupo se encuentran, entre otras, la Tripsina (Trip), la Quimotripsina (QT) y la Elastasa. Éstas son enzimas digestivas sintetizadas por las células pancreáticas y segregadas por el conducto pancreático en el interior del duodeno. Todas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos, pero con especificidades diferentes por las cadenas laterales que flanquean el enlace a escindir.

La mayoría de las enzimas proteolíticas se biosintetizan como precursores inactivos algo más grandes conocidos como **zimógenos**. En el caso de las enzimas digestivas la razón de esto es clara: si estas enzimas se sintetizaran en sus formas activas, digerirían los tejidos donde se formaron.

1.5.2- Tripsina

La digestión de las proteínas comienza en el estómago con ácidos hidrolíticos y enzimas como la Pepsina, y se completa en el intestino. Una vez allí, el páncreas provee una serie de enzimas que cortarán a las cadenas polipeptídicas, siendo la Trip una de estas. Ésta escindiré el enlace peptídico del lado C-terminal de residuos de Lisina y Arginina una vez que haya pasado de su forma inactiva, el Tripsinógeno, a su forma catalíticamente activa.

El Tripsinógeno está formado por un único polipéptido de 229 aminoácidos unidos por puentes disulfuro [70]. Este zimógeno se convierte en su forma activa por la Enteropeptidasa (o Enteroquinasa), una enzima proteolítica secretada por las células intestinales. Ésta hidroliza un pequeño hexapéptido del extremo amino terminal del zimógeno, dando como resultado a la β -Trip activa, de 223 aminoácidos.

Subsiguientes autólisis pueden producir otras formas activas con dos o más cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. La forma predominante es la α -Trip, con dos cadenas polipeptídicas (Figura 1.9). La Trip libre puede ahora catalizar la conversión de más Tripsinógeno en Trip, induciendo una activación por autocatálisis. La Trip luego activa el Quimotripsinógeno, las Procarboxipeptidasas y la Proelastasa (zimógenos de la QT, Carboxipeptidasas y Elastasa respectivamente) [71].

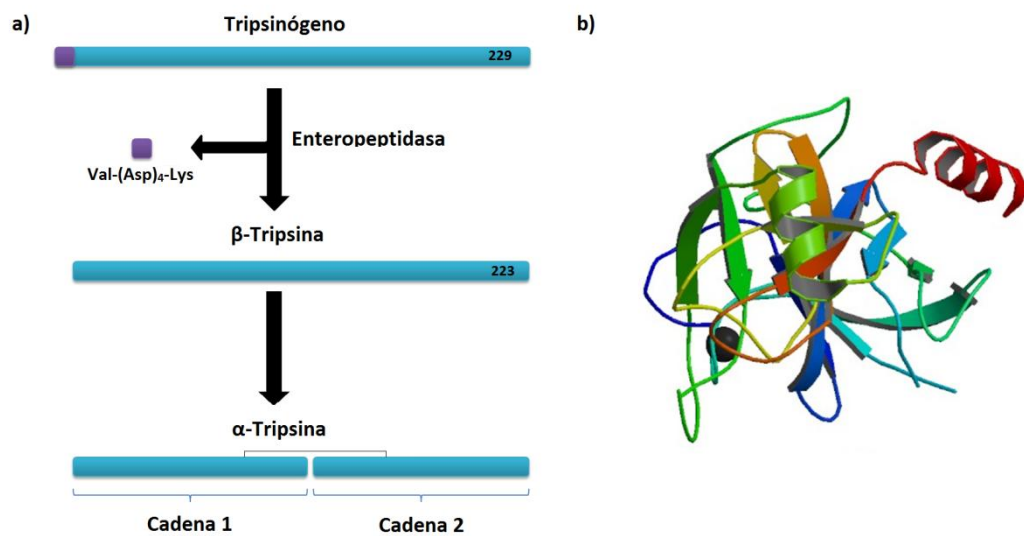


Figura 1.9: a) Activación proteolítica del Tripsinógeno, b) Estructura tridimensional de la Trip.

La Trip es una proteína globular, con láminas beta que forman estructuras de barril beta, aunque también posee regiones alfa hélice y puentes disulfuro. Su peso molecular es de aproximadamente 24 kDa, su pH óptimo de actividad está entre 7,50 - 8,50, y su punto isoeléctrico es de 11,00 [72].

Entre las diversas aplicaciones que posee podemos nombrar la producción de detergentes, ablandamiento de cueros y carnes, producción de alimentos infantiles, clarificación de cervezas. En la industria farmacéutica se utiliza para el tratamiento de

edemas y heridas y en suplementos dietarios. Finalmente, en investigación básica se la utiliza para secuenciación de proteínas debido a la alta especificidad que posee por su sitio de corte.

1.5.3- Quimotripsina

La α -quimotripsina (QT) es una de las principales serin proteasas de los sistemas digestivos de los mamíferos y otros animales. Es sintetizada como un precursor inactivo, el quimotripsinógeno, el cual se transforma por un proceso de proteólisis parcial, en la proteína activa QT.

La activación ocurre en dos pasos: en el primero de ellos la Trip corta el enlace entre los AA 15 y 16. El péptido amino terminal permanece unido a la molécula mediante un enlace disulfuro entre los AA 1 y 122. El producto así generado se denomina π -QT. En el segundo paso de la activación la π -QT autocatalíticamente rompe el enlace entre los residuos 145 y 146 y elimina los residuos 14 y 15 para dar lugar a la proteína activa: α -QT, una proteína tripeptídica interconectada por 5 puentes disulfuro intra e inter-catenarios [73] (Figura 1.10). El PM final de la QT es de 25,7 KDa y su pl 9,10.

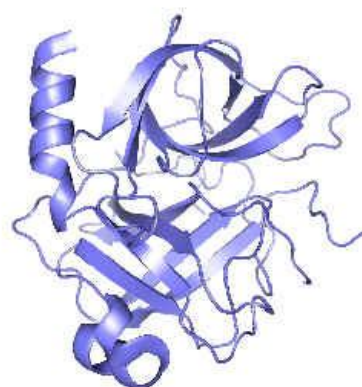


Figura 1.10: Estructura tridimensional de la QT

En el sistema digestivo la QT facilita la hidrólisis de los enlaces peptícos por reacciones hidrolíticas. Los principales sustratos de la enzima son los AA aromáticos y la metionina que son hidrolizados en el carboxilo terminal. Es importante destacar que la reacción catalizada por la QT es termodinámicamente favorable pero no ocurre en ausencia de un catalizador.

Sus principales usos son en la industria agroalimentaria, formulaciones infantiles y en el tratamiento de cueros [74]. Además, es utilizada en investigación básica como enzima modelo y en la secuenciación de proteínas.

1.6- Polímeros utilizados durante este trabajo

1.6.1- Carragenano

1.6.1.1- Fuentes de obtención

Carr es un nombre genérico para una familia de polisacáridos sulfatados extraídos de ciertas especies de algas rojas (*Rhodophita*) como por ejemplo: *Gigartina*, *Crispus*, *Hypnea*, *Eucheuma* y *Chondrus* [75]. Sin embargo, las principales especies de algas utilizadas para la obtención de este polímero a nivel comercial son *Eucheuma cottonii* y *E. spinosum* [76].

Los Carr son clasificados en seis categorías las cuales tienen en cuenta estructura, propiedades y fuentes de obtención. Las formas básicas son: Iota (ι), Kappa (κ), Lambda (λ), Theta (θ), Mu (μ) y Nu (ν). De estos, los más importantes desde el punto de vista comercial son Iota, Lambda y Kappa.

1.6.1.2- Estructura

Los Carr son polisacáridos lineales de alto peso molecular formados por unidades repetitivas de galactosa y 3,6- anhidrogalactosa, pudiendo ambas estar sulfatadas o no. Las unidades repetitivas se encuentran unidas por enlaces glicosídicos alternados del tipo α -(1,3) y β -(1,4) [76].

Los diferentes tipos de Carr se diferencian por el contenido de 3,6- anhidrogalactosa y de sulfato que contienen y es importante destacar que los distintos tipos pueden interconvertirse entre sí mediante tratamiento con álcalis [77].

Las estructuras de los diferentes Carr se muestran en la Figura 1.11.

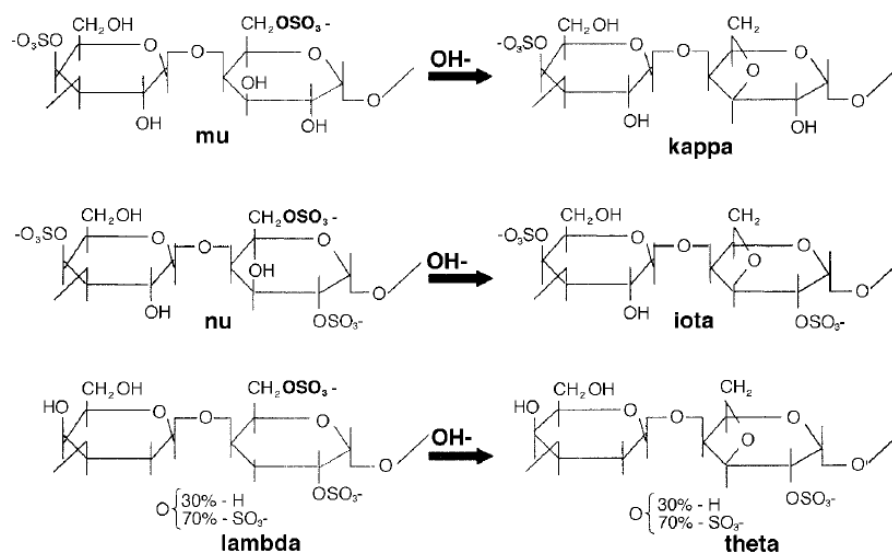


Figura 1.11: Estructura de las unidades repetitivas básicas que forman los diferentes tipos de Carr. Se muestra también la interconversión de un tipo a otro posibilitada por el tratamiento con álcalis. Adaptado de Imeson, AP [76].

Al tratarse de un compuesto extraído a partir de una fuente natural, el Carr es un material polidisperso con masas moleculares que varían dependiendo del tipo de Carr y del lote de fabricación.

1.6.1.3- Propiedades

Las variaciones observadas en estructura para los diferentes Carr les dan propiedades fisicoquímicas diferentes. Presentan, por ejemplo, variaciones en la capacidad de gelación, hidratación, temperaturas de melting, entre otros [76].

En general, todos los Carr son biodegradables, no tóxicos y solubles en agua e insolubles en solventes orgánicos, aceites y grasas. Su solubilidad en agua se encuentra fuertemente afectada por el contenido de sulfato y por los cationes asociados al polímero [75]. La capacidad de formar geles y la viscosidad de las soluciones del polímero depende del tipo de Carr utilizado y de los cationes presentes. En este trabajo se utilizó el ι -Carr. En la tabla 1.IV se presentan las principales características fisicoquímicas del mismo [76].

Tabla 1.IV: Resumen de algunas características fisicoquímicas del ι -Carr.

Propiedad	ι -Carr
<i>Solubilidad</i> en agua caliente (80°) En agua fría (20°)	Buena Sólo son solubles las sales de Na ⁺ .
<i>Estabilidad en ácidos</i>	Los geles son estables.
<i>Gelación</i> Efecto de cationes Textura del gel	Geles más fuertes en presencia de Ca ²⁺ Elástica
<i>Reactividad con proteínas</i>	No presentan reacciones de tipo específicas con proteínas. Sí interaccionan inespecíficamente.

1.6.1.4- Usos comerciales

Los Carr son ampliamente utilizados en la industria alimenticia debido a sus propiedades gelificantes y estabilizantes [75-76, 78-80]. Son también usados en la industria cosmética, farmacéutica y médica [81-82]. Presentan utilidad en la investigación como agentes generadores de inflamación, en biosensores y como polímeros para la bioseparación e inmovilización de proteínas [83-86].

1.6.2- Alginato

1.6.2.1- Estructura y fuentes de obtención

Los Alg son polímeros de abundancia en la naturaleza y se encuentran principalmente como componentes estructurales en las algas pardas marinas (donde pueden llegar a representar el 40% de su peso seco) y como polisacáridos en las cápsulas de las bacterias del suelo [87].

Se trata de una familia de copolímeros lineales compuestos por bloques de ácido β -D-Manúronico (M) y α -L-gulurónico (G) unidos por enlaces (1,4). Los bloques pueden estar compuestos de residuos G consecutivos, residuos M consecutivos o residuos M y G alternados (Figura 1.12). Dependiendo la fuente de la cual se extrae el Alg, el mismo posee diferente contenido de M y G como así también posee diferencias en el largo de los bloques [88].

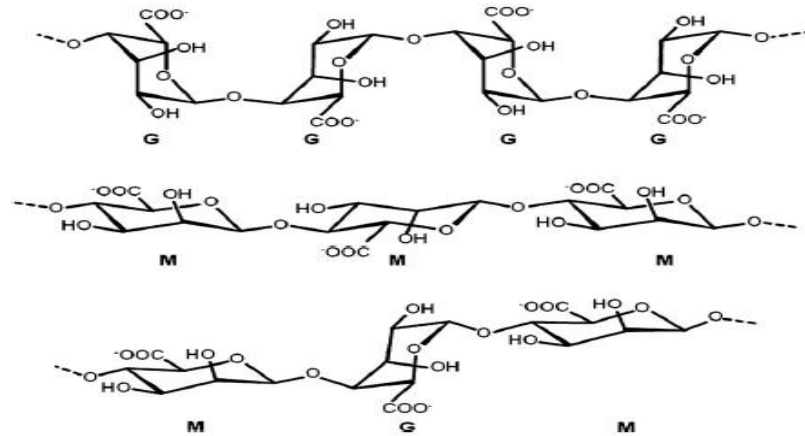


Figura 1.12: Estructura química del bloque G, bloque M y bloque alternado en el Alg.

El peso molecular de los Alg varía entre 32 y 400 kDa. Si bien su solubilidad en agua se verá afectada por la fuerza iónica del medio, que ejercerá un efecto importante especialmente en la extensión de la cadena del polímero y en su viscosidad [89], el factor que afecta principalmente a la solubilidad del mismo es el pH del solvente, que determinará la presencia o no de cargas en los residuos que lo componen. Las constantes de disociación de los monómeros de los ácidos manurónicos y gularónicos son de 3,38 y 3,65 respectivamente. Por lo tanto, los Alg tienden a estar cargados negativamente en un amplio rango de pH [90].

1.6.2.2- Propiedades y aplicaciones

El Alg es soluble en agua a pH mayores a 3,50, mientras que a pH menor a 3,00 forma hidrogeles debido a la protonación de los grupos carboxilo [88]. También posee la capacidad de formar geles en presencia de cationes divalentes como el Ca²⁺, que puede coordinarse con dos cadenas simultáneamente en un proceso de gelificación ionotrópica o entrecruzamiento iónico.

Esta capacidad de los Alg de hidratarse en agua dando lugar a soluciones viscosas, dispersiones o geles permite utilizarlos como espesantes, estabilizantes, gelificantes y formadores de películas. También se ha encontrado que son muy útiles para la bioseparación de proteínas, estando en su forma gelificada [13, 91] o en solución [85, 90, 92]. Además, tienen múltiples aplicaciones en la remoción de contaminantes del agua [93].

La industria alimentaria hace amplio uso de los Alg ya que son polímeros comestibles que prácticamente carecen de sabor. Se utilizan por ejemplo para obtener piezas de fruta para su uso en repostería, o incluso piezas con forma definida como aros de cebolla o guindas. También se emplean en la fabricación de aceitunas rellenas de anchoa o de pimiento.

Asimismo, son utilizados en la industria farmacéutica para el *delivery* de drogas [94-96]. Son bien tolerados en contacto con la piel, refrescantes y lubricantes. Además, se incorporan en jabones y cremas de afeitar como suavizantes y estabilizantes de espuma. Otros usos de los Alg son en soldaduras, vendajes bioactivos, moldes dentales, dispensadores de herbicidas, entre otros [97-99].

Por último, este polímero posee las ventajas de estar ampliamente disponible, ser biodegradable y no tóxico.

1.6.3- Goma Guar

1.6.3.1- Estructura y fuentes de obtención

La GG, también conocida como Goma Cyamopsis, es un polímero natural obtenido a partir del endosperma de la semilla de la planta de guar (*Cyamopsis tetragonaloba*).

Está compuesta por cadenas largas y rectas de unidades de α -D-manopiranosido unidas mediante enlaces glicosídicos β -D-(1-4). Unidos a lo largo de la cadena, hacia ambos lados, se encuentran unidades de α -D-Galactopiranososa (Figura 1.13). El peso molecular de la GG es difícil de estimar pero se puede decir que se encuentra en el rango de 200-300 kDa. [100].

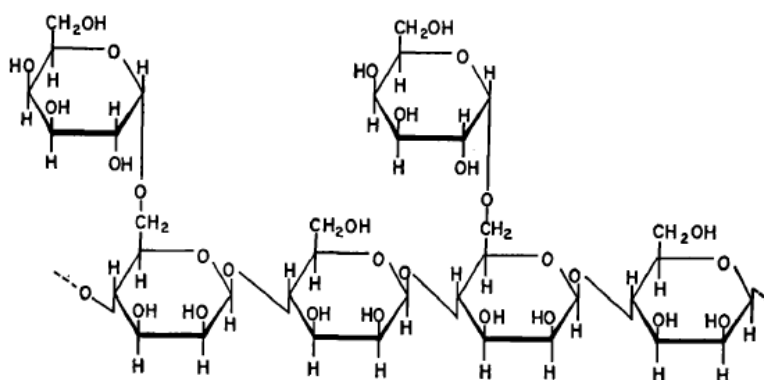


Figura 1.13: Estructura de la GG.

1.6.3.2- Propiedades y aplicaciones

La GG es soluble en agua dando soluciones de elevada viscosidad y de elevada estabilidad. Además, posee la capacidad de formar geles en presencia de borato de sodio o Ca^{2+} [101]. Los grupos hidroxilo de los residuos de manopiranosido

pueden ser modificados fácilmente, mediante esterificaciones, carboxilaciones, etc, por lo que esta goma es altamente versátil y útil en una gran variedad de aplicaciones industriales [102].

Es no tóxica y biodegradable. Es utilizada como estabilizante y espesante en diversos productos alimenticios, en cosmética, en pastas dentífricas y cremas de afeitar, en la industria de la cerámica como agente fijador y espesante, en la preparación de matrices para adsorción de enzimas y en la industria farmacéutica para el *delivery* de drogas y como aglutinante en la manufactura de comprimidos [100-101, 103-104].

OBJETIVOS

2- Objetivos

El objetivo principal de este trabajo de tesis es el desarrollo de tecnologías bioseparativas no contaminantes, basadas en el empleo de polímeros de cadena flexible cargados eléctricamente (polielectrolitos) para la formación de matrices insolubles que puedan ser empleadas, luego, en la bioseparación en macroescala de enzimas de importancia biotecnológica.

Este objetivo general se logrará a partir de los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudiar la interacción entre polielectrolitos naturales y sintéticos, con capacidad de formar matrices insolubles, con diferentes enzimas de uso masivo en diferentes procesos biotecnológicos.
- 2) Estudiar la formación de matrices insolubles entre polielectrolitos de carga eléctrica opuesta.
- 3) Caracterizar la interacción entre esas matrices insolubles con diferentes enzimas de importancia biotecnológica. En este sentido se analizará la capacidad que tienen estas matrices de adsorber / desorber enzimas.
- 4) Aplicar la información obtenida al desarrollo de una estrategia de purificación de las enzimas propuestas. Se plantea sistematizar y analizar la información proveniente de los resultados obtenidos a partir de los objetivos específicos anteriores, con el fin de lograr un diseño racional de las condiciones óptimas para el aislamiento y la purificación de las proteínas en estudio.

**MATERIALES
Y MÉTODOS**

3- Materiales y Métodos

3.1- Reactivos químicos

- **Proteínas:** α -Quimotripsina pancreática bovina (QT); Tripsina pancreática porcina (Trip) y Albúmina sérica bovina (BSA). Todas adquiridas en Sigma-Aldrich y utilizadas sin purificación previa.
- **Polímeros:** ι -Carragenano (Carr) tipo II, grado comercial; Alginato de sodio (Alg) y Goma Guar (GG). Todos adquiridos en Sigma-Aldrich en forma de polvo y utilizados sin purificación previa.
- **Sustratos:** N-Bencil-L-tirosin etil-éster (BTEE), $N\alpha$ -benzoil-DL-arginina- p -nitroanilida (BAPNA) y ácido binciconínico (BCA). Todos adquiridos en Sigma Aldrich y utilizados sin purificación previa.
- Kit de marcadores de pesos moleculares para electroforesis, compuesto por Fosforilasa b, Albúmina, Ovoalbúmina, Anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y α -lactoalbúmina provisto por GE Healthcare Bio-Sciences (Little Chalfont, UK).
- Todos los demás reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

3.2- Preparación de las soluciones de trabajo

3.2.1- Proteínas

- **QT y Trip:** Se prepararon por pesada directa de la droga sólida (25 mg) y posterior disolución en 1 ml de HCl 1 mM. En los casos donde fue necesario,

se prepararon diluciones de dicha solución stock utilizando HCl 1 mM. En todos los casos, fueron almacenadas a -20 °C y previo a su utilización se verificó que no presentaran turbidez ni partículas en suspensión.

- **BSA:** Se preparó por pesada directa de la droga sólida (10 mg) y posterior disolución en buffer fosfato (Pi) 10 mM, pH 7,00. Las diluciones de dicha solución stock se prepararon utilizando el mismo buffer que para su preparación.

3.2.2- Polímeros

Todos los polímeros utilizados durante este trabajo (Alg, Carr y GG) son solubles en agua. Para la preparación de las soluciones de los mismos se pesó una cantidad adecuada de la droga sólida y se disolvió en agua destilada. Se prepararon soluciones madre de las siguientes concentraciones: Alg 0,5 %P/V; Carr 0,5 %P/V y GG 0,5 %P/V. Para el trabajo experimental se utilizaron diluciones de dichas preparaciones y, en los casos donde fue necesario, se agregó buffer a la solución de polímero para la regulación del pH del mismo.

3.2.3- Preparación de la matriz de Alg-GG

Para la obtención de las esferas de Alg-GG se preparó, en primer lugar, una solución de ambos polímeros. Para ello se disolvió, en un principio, GG en agua destilada, para obtener una solución con una concentración final de 0,5 %P/V. Una vez que se alcanzó la completa disolución, se agregó Alg para una concentración final de 0,2 %P/V y la mezcla se dejó durante 24 hs con agitación constante para lograr su homogeneización.

Las esferas se obtuvieron al gotear la solución de ambos polímeros desde una jeringa con una aguja de 0,8 mm de diámetro, en una solución de CaCl_2 100 mM y se dejaron durante 24 hs, con agitación constante, en dicha solución. Una vez finalizado el tiempo de incubación fueron sometidas al proceso de entrecruzamiento y el grupo de esferas control (sin entrecruzar) fue transferido a una solución de CaCl_2 6 mM. En la Figura 3.1 se resume el protocolo de preparación de las esferas.

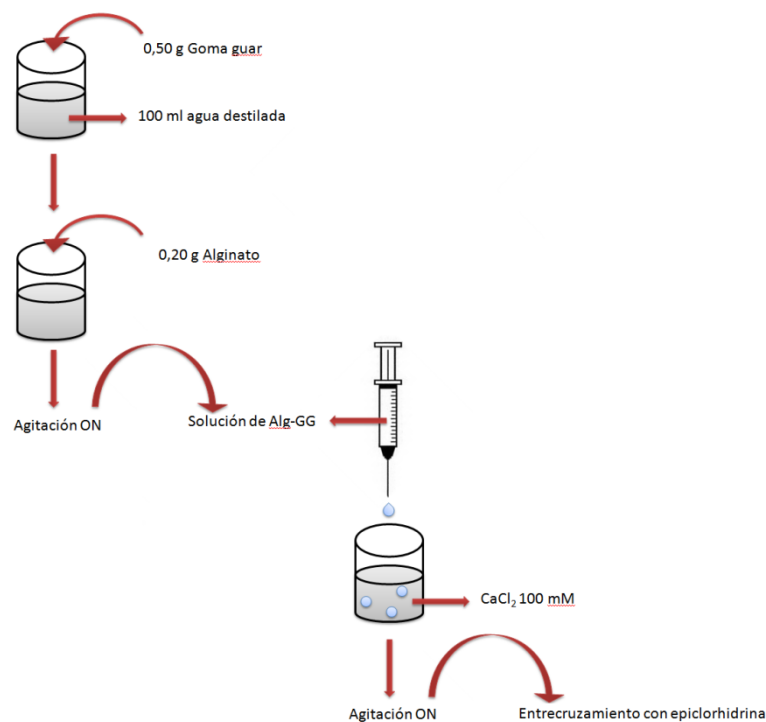


Figura 3.1: Protocolo de preparación de la matriz de Alg-GG.

3.2.4- Entrecruzamiento de la matriz Alg-GG

El entrecruzamiento se realizó utilizando una adaptación del protocolo de Roy *et al.* [103]. 10 g de esferas de Alg-GG fueron transferidos a 50 mL de una solución de etanol 50 %P/V con CaCl_2 100 mM e incubados en la misma por 30 min a 45 °C. Luego, se transfirió la matriz a 50 mL de etanol absoluto conteniendo CaCl_2 100 mM y se incubó por 30 min a 45 °C. Una vez finalizada, se agregaron 2,65 mL de Epi en

alícuotas pequeñas y con agitación constante. Pasados 10 min a 45 °C se agregaron 5 mL de NaOH 5 N y se dejó que transcurra la reacción incubando a 30 °C con agitación constante durante 16 hs. El entrecruzamiento se finalizó mediante el agregado de ácido acético hasta que el pH del sistema llegara a 7,00.

La matriz así obtenida fue lavada exhaustivamente con una mezcla 3:1 de etanol absoluto/agua destilada, seguido por tres lavados con etanol absoluto y tres con agua destilada. Este protocolo es importante ya que permite eliminar cualquier resto de reactivo o polímero sin reaccionar que haya quedado en el medio. La matriz así obtenida fue re-suspendida en 50 mL de buffer de trabajo y mantenida a 8 °C hasta su uso. Previo a su utilización se verificó la integridad de las esferas.

3.2.5-Reactivos específicos

- **BTEE:** Se preparó una solución madre 19 mM mediante pesada directa de la droga sólida y posterior disolución en metanol al 50 %. La misma fue almacenada a -20 °C y previo a su uso se verificó que no posea partículas en suspensión.

Para las medidas de actividad enzimática se utilizó una dilución de la solución madre siguiendo la siguiente proporción: cada 100 mL finales se utilizaron 2 mL de solución madre, 20 mL de metanol y agua c.s.p. Esta solución de trabajo se preparó fresca al momento de realizar las mediciones.

- **BAPNA:** Se preparó una solución madre 0,1 M por pesada directa de la droga sólida y posterior disolución en Dimetil sulfóxido. Esta solución madre fue almacenada a -20 °C y previo a su uso se verificó la estabilidad de la misma.

Para la realización de las mediciones de actividad se utilizó una dilución 1/100 de la solución madre en buffer Tris (2-Amino-2-Hidroximetil-propano-1,3-diol)-HCl 200 mM pH 8,20.

- **BCA:** Para la preparación de la solución madre de BCA se pesaron 0,5 g de la droga sólida y se disolvieron en 50 mL de buffer conteniendo: 1 g de carbonato de sodio, 0,08 g de tartrato de sodio, 0,2 g de NaOH y 0,5 g de bicarbonato de sodio. El pH final de la solución así preparada debe ser 11,25. Para las medidas se utilizó una dilución 1/10 de dicha preparación.

3.2.6- Soluciones Reguladoras de pH

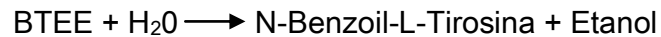
Durante el trabajo experimental se utilizaron distintos tipos de buffer según la zona de pH en la que se necesitaba la regulación. Las soluciones buffer Tris-HCl, P_i , citrato (Cit) y acético/acetato (HAc/Ac⁻) fueron preparadas a partir de Tris, fosfato de sodio, ácido cítrico y ácido acético de calidad analítica. El pH de las soluciones fue ajustado utilizando HCl o NaOH según correspondiera en cada caso.

3.3- Metodologías

3.3.1- Determinación de la actividad enzimática

3.3.1.1- QT

La actividad de la QT fue determinada siguiendo el método de Wirnt [105]. El mismo se basa en la descomposición del sustrato BTEE por la enzima, según la siguiente reacción:



El producto de la hidrólisis (N-Benzoil-L-Tirosina) presenta un máximo de absorción a 256 nm. La gráfica de incremento de la Abs a 256 nm en el tiempo es directamente proporcional a la concentración de QT presente, siempre y cuando se utilice sustrato en exceso.

Las medidas se realizaron determinando el incremento en la Abs a 256 nm cada 1 s durante 90 s, trabajando con una concentración final de BTEE de 0,24 mM en buffer Tris-HCl 200 mM, pH 8,20 y CaCl₂ 200 mM (excepto que se indique lo contrario). Se realizó una curva de calibración para verificar el rango de linealidad del método.

En los casos en los que se consideró necesario, se calcularon las unidades de actividad por mL de enzima, siguiendo la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mL de enzima}} = \frac{\Delta \text{Abs}_{256} \times V_{mr} \times FD}{0,964 \times V_{Enz}} \quad (13)$$

Donde: V_{mr} es el volumen de la mezcla de reacción; FD es el factor de dilución de la muestra; 0,964 es el coeficiente de extinción milimolar de la N-Benzoil-L-Tirosina a 256 nm y V_{enz} es el volumen de muestra utilizado para la medida.

3.3.1.2- Trip

La actividad catalítica de Trip fue determinada utilizando el método de Gildberg y Overbo modificado [106]. El mismo se basa en la capacidad que presenta la enzima de hidrolizar el BAPNA según la siguiente reacción:



El seguimiento de la reacción se realizó espectrofotométricamente a través de medidas de Abs del producto de la reacción, p-Nitroanilina, de color amarillo, que absorbe a 400 nm (coeficiente de adsortividad milimolar: 10). Se registró la Abs a 400 nm a intervalos de 1 s durante 2 min. Se trabajó en condiciones de exceso de sustrato de manera que la pendiente de la recta obtenida al graficar $\text{Abs}_{400\text{nm}}$ vs tiempo sea directamente proporcional a la cantidad de Trip presente en el medio. La reacción se llevó a cabo en buffer Tris-HCl 100 mM, pH 8,20, con una concentración de sustrato de 1 mM y una cantidad adecuada de muestra de manera de trabajar dentro del rango lineal del método. Se realizó una curva de calibración con Trip para verificar el rango de linealidad en las condiciones de trabajo.

3.3.2- Determinación de la concentración de proteínas totales

Para la determinación de proteínas totales se utilizaron 2 métodos basados en principios totalmente diferentes. La elección de uno u otro se basó en las muestras con las que se estaba trabajando.

3.3.2.1- Absorbancia a 280 nm

Cuando se trabajó con proteína comercial de alto grado de pureza, la concentración de proteínas se determinó mediante medidas de Abs a 280 nm (donde absorben los residuos Tirosina, Triptófano y, en menor medida, la Fenilalanina y los puentes disulfuro presentes en la proteína) [107]. Esta metodología fue seleccionada

debido a su sencillez y a que brinda la posibilidad de recuperar la muestra luego de la medición.

Se realizó una curva de calibración utilizando diferentes diluciones de una solución stock de QT o Trip 10 mg/ml para conocer el rango de linealidad del método.

3.3.2.2- BCA

Cuando fue necesario determinar la concentración total de proteínas en muestras complejas se utilizó el método del BCA. El mismo se basa en la medición de la Abs de la muestra a 562 nm luego de agregarle BCA y CuSO_4 . La reacción observada se debe a la formación de un complejo púrpura entre el BCA y los iones cuprosos (Cu^{1+}) que se generan debido a la reacción entre el Cu^{2+} y las proteínas, en medio alcalino (reacción de Biuret). La producción de Cu^{1+} es una función de la cantidad de proteínas presentes en la muestra y del tiempo de incubación, lo que permite determinar el contenido de las mismas en la muestra desconocida previa realización de una curva de calibración utilizando un estándar [108].

Para la medición se mezclaron, en primer lugar, la solución de trabajo de BCA y CuSO_4 (4 %P/V), en una relación de 98 mL del primero y 2 mL del segundo cada 100 mL de solución. Esta preparación se separó en alícuotas de 1 ml a las cuales se les agregó un volumen adecuado de la muestra (no mayor al 5% del volumen de reactivo). Los tubos obtenidos se incubaron durante 30 min a 37°C , se dejó que alcanzaran temperatura ambiente y se procedió a determinar su Abs a 562 nm.

Se realizó una curva de calibración utilizando BSA para conocer el rango de linealidad del método.

3.3.3- Determinación de polisacáridos libres

La concentración de polisacáridos libres en el medio se determinó utilizando el método colorimétrico desarrollado por Dubois *y col* [109]. El mismo se basa en el color amarillo-naranja que se genera cuando los polisacáridos reaccionan con fenol y ácido sulfúrico.

Para las medidas se colocaron en un tubo de ensayo 14 μ L de fenol 80 %V/V; 1,40 mL de H₂SO₄ concentrado; una cantidad adecuada de muestra y agua destilada c.s.p. 2 mL. Los tubos se incubaron a 37 °C por 30 min y, una vez que alcanzaron temperatura ambiente, se determinó su Abs a 480 y 490 nm. A la primer longitud de onda se cuantifican las pentosas y a la segunda las hexosas presentes en la muestra. Además se realizaron curvas de calibración de cada uno de los polímeros, con el objetivo de encontrar el rango de linealidad del método.

3.3.4- Estudio de la formación de los complejos insolubles QT-PE mediante medidas de turbidez

3.3.4.1- Diagramas de solubilidad en función del pH

Se realizó la titulación de la mezcla polímero-proteína con NaOH y HCl de concentraciones adecuadas que permitan obtener varios pH dentro del rango. Para este paso se preparó una solución de partida de polímero-proteína la cual se dividió en dos alícuotas: a una de ellas se la tituló con NaOH y a la otra con HCl. Se registró

ante cada agregado el pH y la turbidez de la muestra, medida como Abs a 420 nm. En todos los casos se registró también el pH y la turbidez inicial. El procedimiento se realizó en presencia de diferentes fuerzas iónicas, generadas por adición de NaCl a la muestra, para comprobar el efecto de la misma sobre la formación del complejo. Como control se realizó el diagrama de solubilidad de la proteína y cada uno de los polímeros (Carr y Alg) por separado.

Estas experiencias permiten determinar el rango de pH donde los polímeros y la proteína son solubles pero el complejo no lo es.

3.3.4.2- Titulación turbidimétrica

Se realizó la titulación de una solución de concentración fija de proteína con volúmenes conocidos de solución de polímero de concentración conocida. Ante cada agregado, se tomó una alícuota de la muestra y se registró la turbidez a 420 nm. La alícuota se devolvió al sistema para el siguiente agregado.

El procedimiento se efectuó con diferentes concentraciones iniciales de proteína, a diferentes pHs y con diferentes fuerzas iónicas, con el objetivo de estudiar la influencia de dichas variables sobre el comportamiento del sistema. Para mantener el pH constante durante la titulación se utilizó el mismo buffer, en igual concentración, para regular el pH de ambas soluciones.

En todos los casos se trabajó a temperatura constante de 25 °C y con agitación continua para evitar la formación de partículas de gran tamaño que interfieran con las mediciones.

Durante el procesamiento de los datos se llevó a cabo, en primera instancia, un gráfico de turbidez a 420 nm en función de la concentración de polímero adicionada. Este gráfico es útil porque nos permite, conociendo la cantidad de proteína presente, estimar la cantidad de polímero necesario para alcanzar el máximo de precipitación. Dependiendo de la forma presentada por los datos los mismos fueron ajustados a una ecuación sigmoidea o hipérbola. Y, a partir de los mismos, se calculó la relación polímero/proteína aproximada para la formación del complejo (e), según se muestra en la figura 3.2.

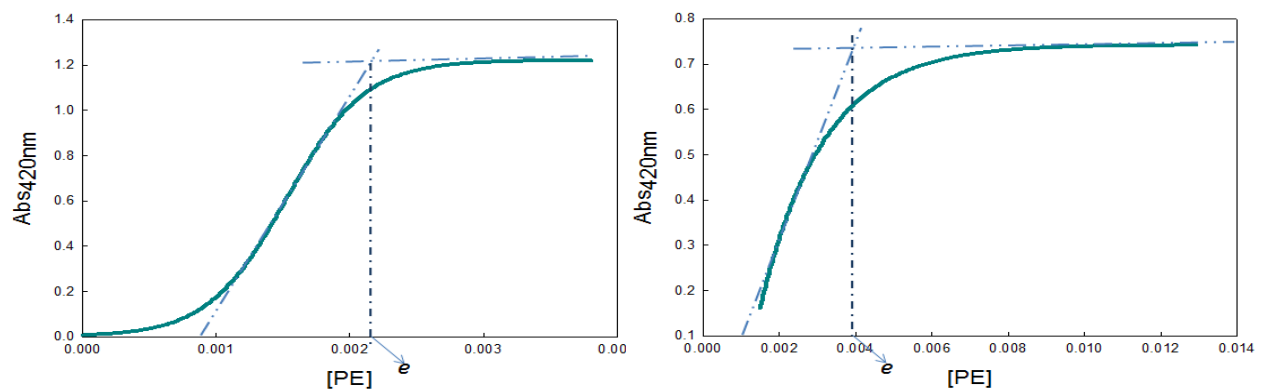


Figura 3.2: Determinación de la relación proteína/polímero en el máximo de precipitación para sistemas con comportamiento a) Sigmoideo b) Hiperbólico

3.3.4.3- Cinética de la formación de los agregados insolubles

Las reacciones químicas y las asociaciones entre compuestos ocurren a diferentes velocidades que dependen del tipo de reacción, de la concentración de los reactivos, del pH, temperatura, fuerza iónica del medio, entre otros. El estudio de la velocidad con la que ocurre una reacción y la influencia de distintos factores sobre la

misma nos permite, entre otras cosas, conocer el tiempo requerido para el transcurso del proceso.

En este caso en particular, se desea conocer la cinética de la formación de agregados insolubles QT-PE y su dependencia con el pH y la fuerza iónica del medio. Para lograr esto, se prepararon soluciones de proteína en concentración conocida y se les agregó un volumen constante de polímero (Carr o Alg). Para evitar cambios en el pH, ambas soluciones fueron preparadas en el mismo buffer. Se procedió a registrar la turbidez de la muestra, medida como Abs a 420 nm, en función del tiempo. Para evaluar el efecto de diferentes variables, las medidas se realizaron con diferentes concentraciones iniciales de QT y a diferentes pHs y fuerzas iónicas. Los datos obtenidos fueron graficados como Abs₄₂₀ vs tiempo.

3.3.4.4- Variaciones de tamaño del complejo QT-PE

El cambio de tamaño del complejo QT-Carr fue seguido a partir de la dependencia de la turbidez de la muestra (τ) con la longitud de onda (λ) según la siguiente ecuación:

$$\alpha = -\frac{\delta(\log\tau)}{\delta(\log\lambda)} \quad (14)$$

Por medidas de Light Scattering Dinámico se ha demostrado una excelente correlación entre el parámetro α y el tamaño de las partículas [110]. Sin embargo, el valor de α no permite determinar el tamaño exacto de las mismas, sino su variación relativa ante las diferentes condiciones del medio. Debido a que nuestro objetivo es

determinar las variaciones de tamaño del complejo QT-PE frente a cambios en las condiciones de trabajo, estas medidas son una forma simple de obtener los datos.

Para el estudio de las variaciones de tamaño se realizó una titulación turbidimétrica de una solución de QT, en agitación constante, con volúmenes conocidos de una solución de polímero, ambas al mismo pH. Ante cada agregado de titulante se dejó que el sistema llegue al equilibrio y se tomó una alícuota. Se midió la Abs en el rango entre 420 y 700 nm, y la alícuota se devolvió al sistema. El barrido de longitud de onda se hizo en este rango ya que en ésta región del espectro no hay interferencia por absorción de los grupos cromóforos de las proteínas.

Los datos obtenidos fueron procesados y graficados como $\log \tau$ vs $\log \lambda$. La pendiente de dicho gráfico es el parámetro α , que varía inversamente con el tamaño de las partículas. El mismo procedimiento fue realizado a diferentes pH y en presencia de diferentes fuerzas iónicas, dadas por la adición de NaCl al medio.

3.3.5- Efecto de los PE sobre la actividad enzimática de la QT

Uno de los pasos más importantes en el proceso de purificación de una enzima es la verificación de que el protocolo no afecte negativamente la actividad enzimática de la misma. Un protocolo de purificación que dé como resultado una enzima pura pero sin actividad es tan indeseable como un protocolo que no purifique a la misma.

Trabajos previos con otros sistemas han encontrado resultados diversos sobre el efecto de los PE en la actividad enzimática [18, 111-113]. Para verificar que el

proceso de precipitación/redisolución del complejo QT-PE no afectara la actividad de la enzima, se realizó una titulación de la proteína con el PE en condiciones de precipitación. Para ello, se preparó una batería de tubos con una concentración constante de QT y a cada uno de ellos se le agregó PE (Alg o Carr) en concentración creciente. Se dejó en contacto el sistema durante 15 min para luego centrifugar y separar el sobrenadante del precipitado. Este último fue re-disuelto utilizando buffer Tris-HCl 200 mM, pH 8,20. Se midió la actividad enzimática inicial, en el sobrenadante y el precipitado re-disuelto.

Los datos fueron procesados como % de actividad QT en sobrenadante y precipitado con respecto a la actividad inicial y, por balance de masas, se pudo concluir acerca del efecto del PE sobre la enzima.

3.3.6- Efecto de los PE sobre la estructura de la enzima

3.3.6.1- Espectros de emisión de fluorescencia de la proteína

Las proteínas poseen, en sus cadenas de aminoácidos, fluoróforos naturales como son el Triptófano, la Tirosina y la Fenilalanina. En general, el espectro de emisión de fluorescencia de las proteínas se encuentra dominado por la emisión de los Triptófanos, excepto en los casos donde la misma no posea residuos de dicho aminoácido en su estructura primaria.

La emisión de fluorescencia por parte de las proteínas es altamente sensible a la polaridad del solvente, a la unión de sustratos, a reacciones de asociación y a la desnaturalización [114]. Uno puede esperar, por lo antes expuesto, que el espectro

de emisión de las mismas cambie si el polímero induce cambios de cualquier tipo en su estructura.

Para estudiar el efecto de los polímeros sobre la fluorescencia nativa de la enzima se obtuvieron los espectros de emisión de la misma en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de polímero, en condiciones de solubilidad (buffer Tris-HCl 200 mM, pH 8,20), para que las partículas de mayor tamaño formadas en la precipitación no interfieran con las mediciones.

Los espectros fueron obtenidos mediante excitación de la muestra a 280 nm y midiendo la emisión en el rango de 300-400 nm, utilizando cubeta de cuarzo de 1cm de camino óptico.

3.3.6.2- Extinción de la fluorescencia nativa de la QT con acrilamida

La extinción o “*Quenching*” de la fluorescencia se refiere a cualquier proceso que disminuya la intensidad de fluorescencia de una sustancia [114]. Existen diversas sustancias que pueden actuar como “*Quenchers*” y, según el compuesto utilizado, existen diferentes mecanismos de extinción de la fluorescencia. Entre ellos se encuentran: reacciones en el estado excitado, re-arreglos moleculares, transferencia de energía, formación de complejos en el estado basal del fluoróforo y *quenching* colisional.

El *quenching* colisional tiene lugar cuando el fluoróforo en el estado excitado es desactivado luego del contacto con el *quencher* en solución. Las sustancias que

actúan como *quencher*s colisionales para el caso de las proteínas son el oxígeno, los halógenos y la acrilamida, entre otros.

En este caso en particular, se utilizó como extintor de la fluorescencia a la acrilamida. Dicha sustancia es un extintor colisional de la fluorescencia nativa de proteínas y tiene la capacidad de difundir al interior de las mismas lo que posibilita su acceso a los Triptófanos superficiales e internos de la proteína.

El *quenching* colisional de una sustancia es descrito por la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (15)$$

Donde: F y F_0 son las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia del extintor, k_q es la constante bimolecular del quenching, τ_0 es el tiempo de vida media del fluoróforo en ausencia del *quencher*, $[Q]$ es la concentración de extintor y K_D es la constante de quenching de Stern-Volmer.

Una representación lineal de F_0/F vs $[Q]$ se denomina gráfico de Stern-Volmer y es indicativo de una única clase de fluoróforos, todos igualmente accesibles al quencher [114].

En algunos casos se observan desviaciones positivas de dicha ecuación, generalmente cuando la extinción es grande. En estos casos, la extinción de la fluorescencia es descrita por el modelo de la "Esfera de Acción". El mismo asume la existencia de una esfera de volumen dentro de la cual la probabilidad de *quenching* es unitaria; si un fluoróforo es excitado cuando un *quencher* se encuentra muy cerca,

el mismo es extinguido inmediatamente y es inobservable. Los únicos fluoróforos que se observaran serán aquellos que no tengan moléculas de *quencher* cercanas. Este tipo de mecanismo de extinción de la fluorescencia es descrito por la ecuación modificada de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D[Q])e^{\left(\frac{[Q]VN}{1000}\right)} \quad (16)$$

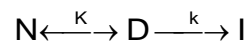
Donde: V es el volumen de la esfera; N es el número de Avogadro y el resto de los parámetros tienen igual significado que en la ecuación 15.

Para observar si la presencia del polímero afecta de alguna manera el entorno de los Triptófanos de la QT, se estudió la extinción de la fluorescencia de la misma en presencia y ausencia de los polímeros. Para esto, una concentración fija de proteína fue titulada con el *quencher* en presencia de diferentes concentraciones de PE. Se trabajó con concentración fija de proteína en buffer Tris-HCl 200 mM, pH 8,20. Los datos obtenidos fueron graficados y se realizó el ajuste de los mismos a las ecuaciones detalladas anteriormente.

3.3.6.3- Estudio de la estabilidad térmica de la proteína en ausencia y presencia del polímero

En la mayoría de los casos, el proceso de desnaturalización térmica de proteínas monoméricas involucra dos pasos: el primero es el despliegue de la forma nativa (N) para dar la proteína desplegada (D) y el segundo es la alteración irreversible de la forma D para dar lugar a la forma desnaturalizada irreversiblemente.

El modelo más simple que explica este esquema es el de Lumry y Eyring [115]:



El primer paso de este esquema se encuentra gobernado por una constante de equilibrio químico, mientras que el segundo es un proceso que depende del tiempo y es mejor descrito por una ecuación cinética [116]. Si la constante cinética para la segunda etapa es lo suficientemente pequeña, entonces puede suponerse que el modelo involucra sólo el equilibrio entre las formas N y D y es denominado “modelo de dos estados”.

Para estudiar el proceso de desnaturalización térmica de la QT en ausencia y presencia del polímero se eligió seguir el cambio en la Abs a 280 nm de la enzima al variar la temperatura del sistema desde 20°C hasta 80°C. La velocidad de calentamiento fue de 1 °C/min de manera de mantener al sistema en equilibrio termodinámico [117].

Se eligió seguir el proceso de desnaturalización mediante esta técnica ya que es conocido que la posición del máximo de absorción de un cromóforo está relacionada con la polarizabilidad del medio. Como los aminoácidos aromáticos están más expuestos en la forma D, la posición del pico de absorción para la forma D no es la misma que para la forma N. Esto resulta en que el coeficiente de absortividad molar a 280 nm de la especie D es mayor al de la especie N.

A partir de los datos de Abs obtenidos puede calcularse la fracción de proteína desnaturalizada (α) mediante:

$$\alpha = \frac{Abs_i - Abs_D}{Abs_N - Abs_D} \quad (17)$$

Donde: Abs_N y Abs_D son las Abs de las especies nativas y desnaturalizadas, respectivamente, y Abs_i es la Abs una dada temperatura.

A partir del ajuste no lineal del gráfico de α vs. T puede determinarse la temperatura para la cual las concentraciones de N y D son iguales ($\alpha=0,5$), denominada "Temperatura de Melting" (T_m).

Además, conociendo α , puede calcularse la constante de equilibrio para el proceso de desnaturalización térmica:

$$K = \frac{\alpha}{1-\alpha} \quad (18)$$

Y, conociendo la constante de equilibrio a las diferentes temperaturas, puede calcularse el cambio de energía libre para la desnaturalización:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln k \quad (19)$$

Además, puede obtenerse el cambio en la entropía de la desnaturalización (ΔS°) como:

$$\Delta S^\circ = - \left(\frac{\delta \Delta G^\circ}{\delta T} \right) \quad (20)$$

Finalmente, puede calcularse el cambio de entalpía a cada temperatura:

$$\Delta H^\circ = \Delta G^\circ + T \Delta S^\circ \quad (21)$$

3.3.6.4- Efecto del polímero sobre la estabilidad química de la proteína

La desnaturalización de una proteína puede ser inducida por diversos factores, entre ellos se encuentran agentes químicos como la urea o el cloruro de guanidina. Si bien el mecanismo de la desnaturalización depende del compuesto utilizado, existen dos modelos propuestos para explicar las bases moleculares de la desnaturalización química de las proteínas por estos compuestos. Uno de ellos explica la desnaturalización en base a una interacción directa y favorable entre el desnaturalizante y la proteína. El otro se basa en la modificación de la estructura de puentes de hidrógeno del agua y la consecuente debilitación de las interacciones hidrofóbicas [118]. Sea cual sea el mecanismo por el cual se da la desnaturalización, se conoce que estos compuestos estabilizan el estado desnaturalizado de la proteína con respecto a la forma nativa debido a que los residuos laterales de los aminoácidos y el esqueleto peptídico de las proteínas son más estables en soluciones que los contienen y, para la mayoría de las proteínas, el estado desnaturalizado presenta mayor exposición al medio de dichas estructuras [117].

La presencia de polímeros en el medio puede incrementar o disminuir la estabilidad química de una proteína. Para determinar la estabilidad de una proteína basta con registrar, a distintas concentraciones de agente desnaturalizante, alguna propiedad que varíe cuando la misma se despliega. En este caso se realizaron las curvas de estabilidad química de la proteína en presencia y ausencia de polímero y se registraron los espectros de emisión de fluorescencia (excitando a 280 nm) de la

muestra ante diferentes agregados de agente desnaturizante, en este caso urea [119].

A partir de los máximos de emisión de fluorescencia a cada concentración de agente desnaturizante se puede obtener la fracción de proteína desnaturizada (α), según la siguiente ecuación:

$$\alpha = \frac{\lambda_i - \lambda_N}{\lambda_D - \lambda_N} \quad (22)$$

Donde: λ_i es la longitud de onda del máximo de emisión de fluorescencia de la proteína expuesta a una concentración i de agente desnaturizante; λ_N es la longitud de onda del máximo de emisión de la proteína en estado nativo, es decir, en ausencia de urea y λ_D es la longitud de onda del máximo de emisión de fluorescencia de la proteína en su estado desnaturizado, esto es, a concentraciones de urea elevadas.

A partir de estos datos pueden calcularse los valores de los parámetros termodinámicos para el proceso de desnaturización química de la QT, en ausencia y presencia de los polímeros, con ecuaciones simples, pero sólo si la desnaturización de la proteína sigue un modelo de dos estados, como se explicó en el apartado 3.3.6.3. La constante de equilibrio para la desnaturización se calculó utilizando la ecuación 18 y, conociendo esta constante, puede obtenerse la energía libre de Gibbs a partir de la ecuación 19.

Finalmente, al representar los ΔG^0 de equilibrio obtenidos frente a la concentración de agente desnaturizante, los puntos se ajustan a una línea recta con la siguiente forma:

$$\Delta G^{\circ} = \Delta G^{\circ}_{H_2O} - m [\text{urea}] \quad (23)$$

Donde: ΔG° es la energía libre de Gibbs de equilibrio, $\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ se obtiene de la extrapolación de los datos y representa la energía libre de Gibbs en ausencia de agente desnaturizante (en este caso urea) y, por lo tanto, da idea de la estabilidad proteica y, finalmente, m es una constante de proporcionalidad que está relacionada con el cambio de área apolar expuesta al disolvente durante la desnaturización [120].

Experimentalmente, el estudio de la desnaturización química de la QT se llevó a cabo realizando una batería de tubos con una concentración fija de enzima en buffer Tris-HCl 200 mM, pH 8,20 (condición de no precipitación) y agregando concentraciones crecientes de urea (0- 11 M). Posteriormente, se incubaron por dos horas y se procedió a medir los espectros de emisión de fluorescencia de cada uno de los sistemas. El procedimiento se realizó también en presencia de diferentes concentraciones de cada uno de los polímeros en estudio.

3.3.7- Caracterización de las matrices insolubles de Alg-GG

3.3.7.1- Insolubilidad de la matriz obtenida

Con el objetivo de determinar si la reacción de entrecruzamiento fue exitosa se realizaron pruebas de estabilidad de las esferas obtenidas. Para ello se sometió a la matriz entrecruzada covalentemente a diferentes condiciones experimentales que podrían dar lugar a su disolución. Como control, en todos los casos, se utilizaron

esferas que no fueron sometidas al proceso de entrecruzamiento covalente. Las condiciones ensayadas se detallan a continuación:

- EDTA 0,10 M
- Buffer Pi 50 mM-HAc/Ac⁻ 50 mM, pHs: 3,00; 4,00; 5,00; 6,00 y 7,00.

Todos los sistemas se prepararon de la misma manera: las esferas fueron exhaustivamente lavadas con agua destilada, fraccionadas en alícuotas de masa constante y se les agregó un volumen fijo de la solución a ensayar. Los tubos fueron colocados por 24 hs en un agitador orbital, con una velocidad de agitación de 30 rpm.

Finalizada la incubación se realizó, en primer lugar, una inspección visual de los tubos con el objetivo de observar si la matriz había sufrido algún tipo de cambio. Luego, se procedió a medir la cantidad de polisacárido disuelto en el sobrenadante utilizando un método colorimétrico para la determinación de azúcares [109].

3.3.7.2- Espectroscopia de infrarrojo

La región infrarroja (IR) del espectro se encuentra entre 13.000-10 cm⁻¹. La misma se divide en 3 regiones diferentes, según la frecuencia que se analice: *IR cercano* (NIR) entre 13.000-4000 cm⁻¹, *IR medio* entre 4000-400 cm⁻¹ e *IR lejano* entre 400-10 cm⁻¹ [121]. En general, la mayoría de las aplicaciones analíticas se dan en la región del IR medio.

La espectroscopia IR se basa en el hecho de que, en las moléculas, los movimientos de rotación y vibración moleculares tienen niveles de energía discretos. Las frecuencias resonantes o frecuencias vibracionales son determinadas por la

forma de las superficies de energía potencial molecular, las masas de los átomos implicados y, eventualmente, por el acoplamiento vibrónico asociado. También pueden estar, en una primera aproximación, relacionadas con la fuerza del enlace. Así, las frecuencias de las vibraciones pueden ser asociadas con un tipo particular de unión. Es importante destacar que, para que un modo vibracional de una molécula sea activo al IR, debe estar relacionado con cambios en el dipolo permanente [122].

Cuando una muestra se somete a la radiación IR y la frecuencia de excitación de un enlace o grupo de enlaces coincide con alguna de las frecuencias incluidas en las ondas del haz incidente, se produce la absorción. Lo que se registra es la cantidad de energía absorbida en cada longitud de onda. Esto puede lograrse escaneando el espectro con un haz monocromático que cambia de longitud de onda a través del tiempo, o empleando una Transformada de Fourier (FT) para medir todas las longitudes de onda a la vez [123]. A partir de esto se obtiene un espectro de transmitancia o absorbancia el cual muestra a cuáles longitudes de onda la muestra absorbe el IR y permite, en algunos casos, determinar qué tipo de enlaces se encuentran presentes. En muchos casos, los espectros son complejos y presentan un gran número de bandas, por lo que resulta difícil asignar a cada una de las bandas un tipo específico de enlace. Sin embargo, aún cuando no pueda determinarse exactamente a qué tipo de movimiento atómico se debe cada banda, los espectros de IR siguen dando información muy valiosa para análisis cuantitativos y cualitativos.

En este caso, se utilizaron los espectros de FT-IR para comparar las matrices de Alg-GG tratadas químicamente y sin tratar. Las muestras fueron liofilizadas previamente y, para la preparación de las pastillas, se mezclaron aproximadamente

5,0 mg de matriz con 150 mg de KBr homogeneizando el sistema en mortero de ágata. Las pastillas se prepararon por presión del material utilizando una prensa hidráulica.

3.3.8- Estudio de la adsorción de QT y Trip sobre la matriz insoluble de Alg-GG

3.3.8.1- Determinación de las condiciones de adsorción

Con el objetivo de encontrar las condiciones de trabajo que rindieran una mayor adsorción de las proteínas de interés, se procedió a estudiar el porcentaje de proteína adsorbida sobre una masa fija de matriz bajo diferentes condiciones experimentales. Las variables elegidas para el estudio fueron el pH y la fuerza iónica. La elección se basa en que dichos parámetros son los más influyentes en un proceso de interacción electrostática como el que se espera que suceda en este caso [124].

Para el estudio se prepararon sistemas con una masa conocida e igual de matriz y se llevaron a volumen final constante con los diferentes buffers ensayados para la adsorción. Los sistemas se dejaron en agitación por una hora de manera que la matriz se lave bien con la solución de trabajo. Una vez equilibrada la matriz, se agregó proteína en igual concentración a cada uno de ellos. Los tubos fueron dejados por 2 hs bajo agitación orbital de 30 rpm a 25 °C. Este tiempo es suficiente, según medidas de cinética, para que los sistemas lleguen al equilibrio.

Para los cálculos se utilizó el método de depleción, que consiste en medir la concentración de proteína inicial y final en el sobrenadante y, mediante diferencia de las mismas, se obtiene la cantidad de proteína adsorbida en las diferentes

condiciones [124-125]. Los datos fueron expresados como q_e (mg de proteína adsorbida/ g matriz) vs medio de adsorción. La concentración de QT en el sistema fue determinada por medidas de Abs a 280 nm, mientras que la Trip se determinó por medidas de actividad enzimática.

Se realizaron en cada condición controles de matriz sin proteína y de proteína sin matriz. Todas las experiencias fueron realizadas por triplicado.

3.3.8.2- Caracterización de la cinética del proceso de adsorción

Para el estudio de la cinética del proceso de adsorción se incubó una cantidad constante de matriz con enzima y se midió la cantidad de proteína remanente en el sobrenadante a lo largo del tiempo. Los tubos fueron mantenidos en agitación y a temperatura constante durante el transcurso de la experiencia. La cinética se determinó a diferentes pHs, con diferentes concentraciones iniciales de proteína y a dos temperaturas (25 y 8 °C).

Los datos fueron expresaron como mg de enzima adsorbidos/ g de matriz hidratada vs tiempo. Las cinéticas de adsorción obtenidas fueron analizadas con diferentes modelos cinéticos, a saber: pseudo-primer orden o modelo de Lagergen [126], pseudo-segundo orden o modelo de Ho y Mckay [65] y modelo intra-particular de Weber y Morris [127]. Las ecuaciones de ajuste y los parámetros correspondientes a cada modelo cinético estudiado se detallaron en la sección 1.4.3.2.

3.3.8.3- Isotermas de adsorción

Una vez determinadas las mejores condiciones para la adsorción y la cinética de la misma, se procedió a realizar las isotermas de adsorción para las enzimas sobre la matriz de Alg-GG.

El procedimiento para obtener isotermas de adsorción consiste en trabajar con muestras con una cantidad fija de adsorbente y concentraciones de adsorbato crecientes. Por lo tanto, se preparó una batería de tubos con una cantidad constante de matriz (0,100 g aprox.) y a cada uno de ellos se le agregó una concentración diferente de una solución stock de QT o Trip, según corresponda. Las muestras fueron colocadas en un agitador orbital a 30 rpm con temperatura constante y se dejaron equilibrar por 2 hs. Se determinó la concentración de proteína inicial y en el equilibrio en cada tubo. Las isotermas se obtuvieron a 2 temperaturas: 8 y 25 °C.

Los datos obtenidos fueron ajustados a diferentes modelos de adsorción hasta encontrar el mejor ajuste, de manera de obtener los parámetros fisicoquímicos del proceso. Los modelos de isotermas utilizados fueron detallados en la sección 1.4.3.1.

Por otra parte, los datos obtenidos a ambas temperaturas dan la posibilidad de obtener los parámetros termodinámicos del proceso de adsorción. Para ello, en primer lugar, es necesario obtener las constantes de equilibrio termodinámico para la adsorción definidas como:

$$K_o = \frac{a_{ads}}{a_{eq}} \approx \frac{C_{ads}}{C_{eq}} \quad (24)$$

Donde: a_{ads} y a_{eq} son la actividad de la enzima adsorbida y en la fase líquida en el equilibrio, respectivamente; C_{ads} es la concentración de enzima adsorbida por unidad de masa de matriz y C_{eq} es la concentración de enzima en la fase líquida en el equilibrio. K_o se obtiene por extrapolación a $C_{ads}=0$ del gráfico de $\ln (C_{ads}/C_{eq})$ vs C_{ads} [93].

El cambio de entalpía para el proceso puede obtenerse a partir de la ecuación de Van't Hoff:

$$\ln \frac{K_{o,T1}}{K_{o,T2}} = \frac{\Delta H^\circ}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (25)$$

Donde: $K_{o,T1}$ y $K_{o,T2}$ son las constantes para la adsorción a cada una de las temperaturas y R es la constante universal de los gases (1,987 cal/K mol).

El resto de los parámetros termodinámicos se calcularon aplicando las ecuaciones 19 y 21.

3.3.8.4- Determinación de las condiciones de desorción

Cuando un proceso de adsorción se optimiza con el objetivo de purificar una proteína, la desorción de la misma es casi tan importante como su adsorción. Por ello, se realizaron pruebas con el fin de encontrar las condiciones experimentales que rindieran la mejor desorción de las proteínas de interés.

Se prepararon sistemas con una cantidad fija de matriz, buffer de adsorción y cantidad fija de enzima. Los tubos se incubaron con agitación orbital a 25 °C. Una vez alcanzado el equilibrio de adsorción, se separó la matriz del sobrenadante y se

realizaron varios lavados con el buffer de adsorción (hasta alcanzar una concentración de proteína despreciable en el lavado). Finalmente, se colocó en cada tubo un volumen constante de los diferentes buffers de desorción y se dejó el sistema en agitación orbital por 2 hs, con el objetivo de estar seguros de haber alcanzado el equilibrio de desorción. En todos los sistemas se midió la concentración de proteína inicial y final luego de la adsorción, en los lavados y final luego de la desorción. Los datos obtenidos fueron expresados como % enzima desorbida vs. medio de desorción.

Las condiciones ensayadas para la desorción se eligieron en base a resultados obtenidos en las experiencias anteriores y a la bibliografía consultada. Se utilizó buffer P_i pH 7,00 o Tris-HCl pH 8,20 con diferentes fuerzas iónicas dadas por la adición de NaCl al medio (0 mM, 150 mM, 300 mM, 500 mM, 750 mM y 1 M) y, en algunos sistemas, se adicionó al medio propilenglicol al 20 % P/V [128].

3.3.8.5- Cinética de la desorción

Para obtener el tiempo requerido para alcanzar la máxima concentración de proteína desorbida, se realizaron las medidas de cinética para la desorción. Para ello se realizó el mismo protocolo que en la determinación de las condiciones de desorción pero, en este caso, se midió la cantidad de enzima desorbida en función del tiempo transcurrido. Estas medidas fueron realizadas únicamente para la condición que rindió el mayor porcentaje de desorción.

3.3.8.6- Reutilización de la matriz

La determinación del número de ciclos de adsorción-desorción que pueden llevarse a cabo con esta matriz insoluble de Alg-GG es de gran importancia a nivel económico, si se la pretende utilizar en procesos de purificación a mayor escala.

Para esta determinación, se realizaron sucesivos ciclos de adsorción con la misma matriz. Cada ciclo consistió en dejar adsorber la proteína hasta alcanzar el equilibrio de adsorción a 25°C, separar el sobrenadante, realizar sucesivos lavados de la matriz con el buffer de adsorción y, finalmente, desorber la enzima utilizando buffer de desorción. Se midió la actividad enzimática de la proteína (QT o Trip) para determinar la concentración al inicio y al final de cada uno de estos pasos. Cabe aclarar que no se aplicó ningún paso de regeneración de la matriz entre cada ciclo, simplemente se lavó y se la incubó nuevamente en el buffer de adsorción.

3.3.8.7- Controles de actividad catalítica de las enzimas

Llegado este punto es importante destacar que en cada uno de los ítems detallados anteriormente para el estudio de los procesos de adsorción y desorción de QT y Trip, se realizaron los controles de actividad correspondientes con el objetivo de verificar que ninguna de las condiciones utilizadas afectase negativamente la actividad enzimática de las enzimas.

Las condiciones ensayadas fueron:

- Enzima en los diferentes buffers de adsorción
- Enzima en buffer de adsorción con matriz

- Enzima en los diferentes buffers de desorción

En cada caso se midió la actividad a través del tiempo. Todos los sistemas fueron realizados por triplicado y los datos fueron expresados como % de actividad vs. Tiempo. Como control se tomó la actividad inicial en cada condición.

3.3.9- Aplicación de los resultados obtenidos

3.3.9.1- Fuente de obtención de QT y Trip

Como fuente natural de obtención de ambas enzimas se utilizó páncreas bovino proveniente de una industria frigorífica local. Luego de extraído del animal, se lo congeló inmediatamente. Una vez en el laboratorio, se lo lavó con solución isotónica para luego cortarlo en pequeños trozos que fueron mezclados con buffer Tris-HCl 200mM pH 8,20 o con buffer HAc/Ac⁻ 25mM pH 5,00, en una proporción 1:3 en ambos casos. Las mezclas resultantes fueron procesadas durante 5 min en un homogeneizador Minipimer a una velocidad de 4000 rpm. Los extractos crudos así obtenidos fueron filtrados con gasa y posteriormente centrifugados para eliminar los restos de grasa y tejidos.

3.3.9.2- Activación de la QT y Trip

En el homogenado (Hmg) preparado se encuentran el Quimotripsinógeno y el Tripsinógeno, precursores inactivos de la QT y de la Trip, respectivamente, por lo que se requirió de un paso de activación previo a la medición de las mismas. Para la activación de los zimógenos se llevó, en el caso del Hmg preparado en buffer HAc/Ac⁻ pH 5,00 al pH de máxima actividad de las enzimas (pH 8,20), luego se adicionó al

Hmg una pequeña alícuota de tripsina (0,025 mg/mL), se lo mantuvo siempre en un baño de hielo y se le fue corrigiendo el pH en caso de ser necesario. El tiempo requerido para completar la activación fue determinado midiendo la actividad de QT y Trip a distintos intervalos, hasta obtener el máximo valor [9]. En el caso del Hmg realizado en buffer Tris-HCl, el protocolo es el mismo, sólo que no fue necesario el paso inicial de llevado a pH de máxima actividad, debido a que ya fue preparado en dicha condición.

Una vez finalizada la activación, el extracto obtenido fue llevado a pH 5,00, separado en alícuotas y mantenido a -30 °C hasta su utilización.

3.3.9.3- Purificación de las proteínas a partir del Hmg

Una vez activado el Hmg, se procedió a realizar el proceso de precipitación o adsorción de las proteínas a partir del mismo. Para ello se usaron las condiciones que rindieron los mejores resultados durante la puesta a punto de los protocolos con las proteínas puras.

Para evaluar la eficacia del proceso se midieron: proteínas totales y actividad de QT o Trip en sobrenadante y precipitado o adsorción y desorción, según corresponda. Con estos datos se calcularon dos parámetros importantes que dan idea de la efectividad del proceso: el Rendimiento y el Factor de purificación, según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Rendimiento}(\%) = \frac{[\text{Enzima}]_{\text{Precipitado rediseuelto (o desorbida)}}}{[\text{Enzima}]_{\text{Hmg}}} \times 100 \quad (26)$$

$$\text{Factor de purificación} = \frac{\text{Actividad específica}_{\text{Precipitado rediseuelto (odesorbida)}}}{\text{Actividad específica}_{\text{Hmg}}} \quad (27)$$

Donde:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{unidades de enzima}}{\text{mg de proteínas}} \quad (28)$$

3.3.9.4- Disminución del volumen de redisolución del precipitado obtenido

En todo protocolo de purificación es de primaria importancia obtener un buen rendimiento y purificación pero también es deseable que el producto final se obtenga en el menor volumen posible.

Con el objetivo de encontrar el menor volumen final posible para la redisolución total de la enzima purificada, se procedió a preparar tubos con igual volumen de Hmg y a precipitar la QT a partir de los mismos. El precipitado así obtenido fue separado por centrifugación y re-disuelto en volúmenes crecientes de buffer. En todos los casos se midió actividad de QT en sobrenadante y precipitado re-disuelto.

3.3.9.5. SDS-PAGE

Para comprobar la pureza de las proteínas obtenidas en el proceso, se realizó un SDS-PAGE con las diferentes fracciones obtenidas durante la aplicación de los protocolos de purificación antes descritos.

El SDS-PAGE fue realizado utilizando un sistema vertical. Las concentraciones utilizadas fueron de 10 % para el gel de concentración y 13 % para el de resolución. El tiempo de corrida fue de 180 min con una intensidad de 20 mA para el gel de concentración y 25 mA para el de resolución. Las proteínas fueron teñidas utilizando Coomassie Blue.

3.4. Manejo de los datos experimentales

El ajuste de los datos experimentales, usando las ecuaciones adecuadas a cada experiencia, fue realizado mediante el programa de PC de ajuste no lineal Sigma Plot para Windows, versión 12.0.

La mayoría de las mediciones fueron realizadas por triplicado y el error asociado fue calculado como la desviación estándar de las mismas.

En los casos en los que fue necesario ajustar los datos obtenidos experimentalmente a ecuaciones correspondientes a modelos teóricos para explicar los comportamientos del sistema, el mejor ajuste fue considerado como aquel que presente un coeficiente de determinación (R^2) más cercano a la unidad y la menor

sumatoria de cuadrados del error (SCE) [129-130]. Las ecuaciones correspondientes a dichos parámetros se presentan a continuación:

$$r^2 = \left(\frac{(q_{e,modelo} - q_{e,exp})^2}{\sum (q_{e,modelo} - \bar{q}_{e,exp})^2 + (q_{e,modelo} - q_{e,exp})^2} \right) \quad (29)$$

Donde: $q_{e,modelo}$ corresponde a los valores de q_e obtenidos por el modelo; $q_{e,exp}$ se refiere a los valores de q_e obtenidos experimentalmente y $\bar{q}_{e,exp}$ es la media de los valores de $q_{e,exp}$ obtenidos.

$$SCE = \sum_i^p (Q_{e,modelo} - Q_{e,exp})^2 \quad (30)$$

Donde: $Q_{e,modelo}$ es la capacidad teórica de adsorción brindada por el modelo y $Q_{e,exp}$ es la capacidad de adsorción en el equilibrio obtenida experimentalmente.

3.5- Instrumental empleado

- Las medidas de absorción se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Jasco V 550 de doble haz con cubeta termostatzada con efecto peltier. En todos los casos se utilizó una cubeta termostatzada de 1 cm de camino óptico.
- Las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman Serie 2 utilizando cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Los datos obtenidos fueron corregidos usando un software provisto por el fabricante del equipo.

- Las medidas de FT-IR se realizaron utilizando un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum one sobre pastillas de KBr, en la región comprendida entre 4000 y 400 cm^{-1} .

**RESULTADOS
Y DISCUSIÓN:
CAPÍTULO 1**

4- Resultados y Discusión: Capítulo 1: Precipitación de Quimotripsina utilizando polielectrolitos aniónicos.

4.1- Estudio de la interacción QT-polímeros utilizando técnicas de espectroscopía UV-Visible

4.1.1- Diagramas de solubilidad

Es conocido que las interacciones entre proteínas y PE para dar lugar a complejos insolubles se encuentran fuertemente influenciadas por el pH y la fuerza iónica del medio de trabajo [19-20, 35, 131]. Por ello, se comenzó el estudio de la interacción entre la QT y ambos polímeros analizando el efecto del pH y la fuerza iónica sobre la solubilidad de cada uno de ellos por separado y de la combinación de la enzima con cada uno de los polímeros. Los resultados obtenidos para los sistemas se muestran en las Figuras 4.1 y 4.2.

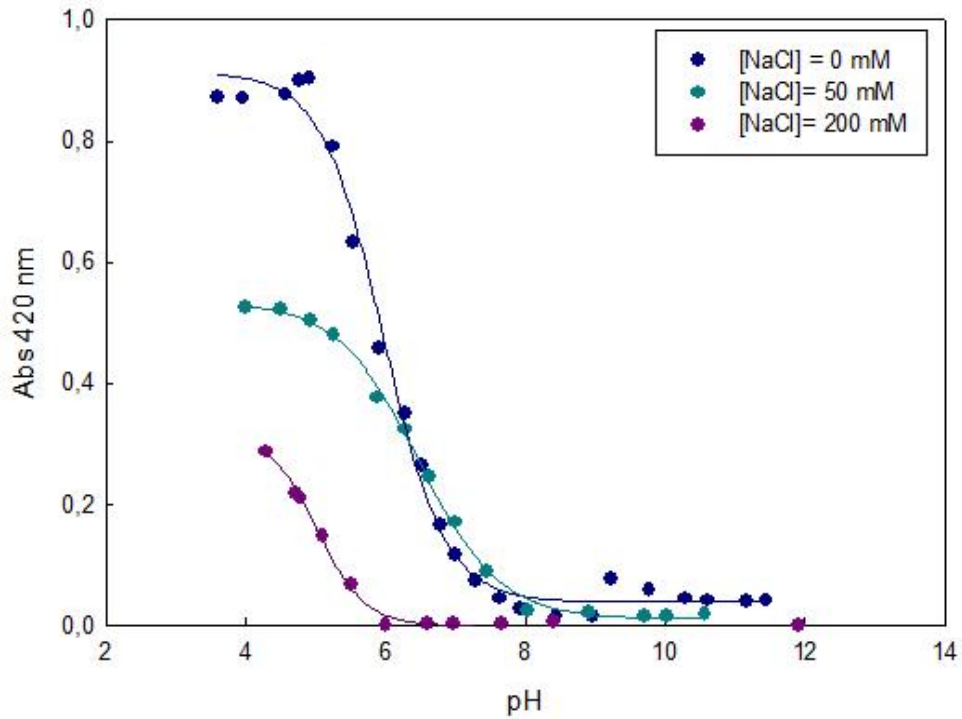


Figura 4.1: Efecto del pH y la fuerza iónica del medio sobre la formación de los agregados QT-Carr. Medio HAc/Ac⁻ 10 mM/P_i 10 mM. Temperatura: 25 °C.

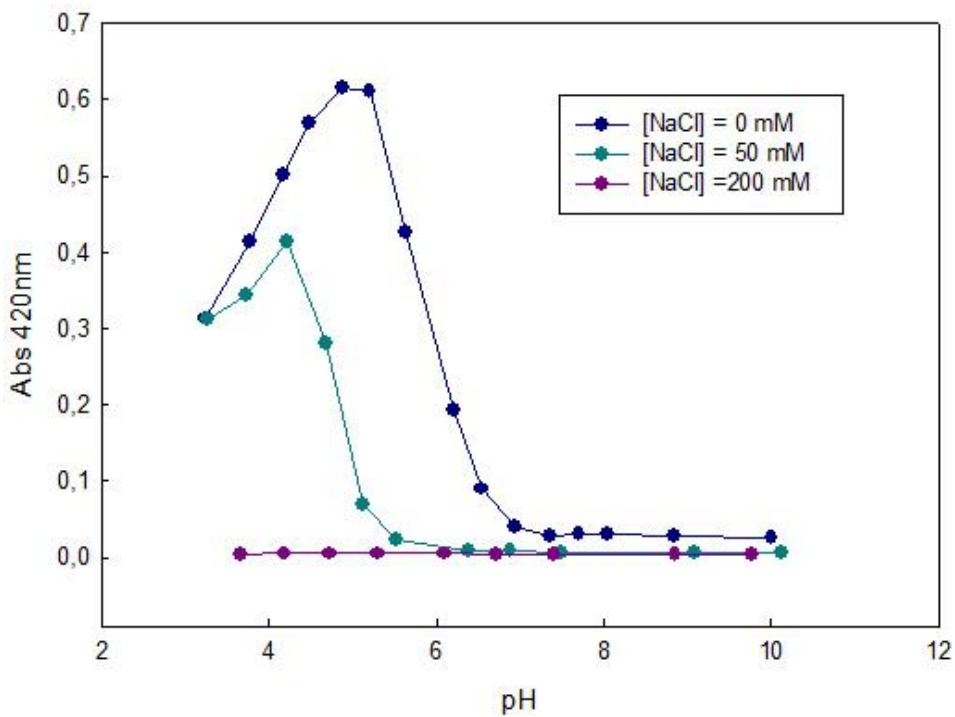


Figura 4.2: Efecto del pH y la fuerza iónica del medio sobre la formación de los agregados QT-Alg. Medio HAc/Ac⁻ 10 mM/P_i 10 mM. Temperatura: 25 °C.

Como puede observarse, el pH y la fuerza iónica del medio tienen un marcado efecto sobre la formación de los complejos insolubles QT-PE. En ausencia de NaCl, para ambos sistemas, la mezcla es soluble a pH básicos superiores a 8,00 y comienza a insolubilizarse al disminuir el pH a partir de dicho valor, lo que se evidencia a partir del incremento en la turbidez del sistema a 420 nm. Para el caso de la precipitación utilizando Carr (Figura 4.1), los datos presentan forma sigmoidea y la máxima turbidez se obtiene a pHs inferiores a 5,50. Cuando el agente precipitante es el Alg (Figura 4.2), los datos presentan una tendencia similar a una Gaussiana, alcanzando su máximo de precipitación a pH 5,00 y disminuyendo al alejarse de dicho valor tanto hacia valores de pH inferiores o superiores.

Los resultados obtenidos son los esperables y pueden explicarse teniendo en cuenta el estado de cargas de cada una de las moléculas implicadas. La QT posee un punto isoeléctrico de 9,10 por lo que, a pHs cercanos a 8,00, la misma comienza a perder su densidad de carga positiva. El Carr y el Alg son PE aniónicos, el primero posee carga negativa en todo el rango de pH estudiado y el segundo posee un pKa en el rango de 3,40-3,70, según la fuente de obtención. Teniendo en cuenta estas características de los componentes del sistema, y recordando que las interacciones entre proteínas y PE para dar lugar a complejos insolubles son principalmente del tipo electrostáticas entre los grupos con carga eléctrica opuesta presentes en ambas macromoléculas, los resultados pueden ser interpretados como se describe a continuación.

A pHs menores a 8,00, los grupos amino presentes en la QT se encuentran protonados y poseen carga eléctrica positiva mientras que ambos polímeros poseen carga eléctrica negativa, ya que sus grupos ácidos se encuentran desprotonados. Como la enzima y los PE tienen carga eléctrica opuesta interactúan entre ellos dando lugar a la formación de complejos insolubles. El incremento en la turbidez de los sistemas al disminuir el pH por debajo de 8,00 se debe al incremento en la carga positiva de la enzima mientras los polímeros mantienen su carga casi constante. Para el caso de Alg, la disminución de la turbidez del sistema a pHs por debajo de 5,00 puede deberse a la disminución en la carga eléctrica del mismo, debido a la protonación de los grupos carboxilo presentes en la molécula. Esta disminución no se observa cuando el agente precipitante es el Carr debido a que el mismo posee grupos ácidos fuertes cuya carga eléctrica no varía en el rango de pHs de trabajo. Por otro lado, y en ambos casos, a pHs básicos superiores a 8,00 la ausencia de turbidez se debe a la pérdida de carga eléctrica positiva de la enzima debido a la desprotonación de sus grupos amino.

Cuando las experiencias se repiten en presencia de mayores fuerzas iónicas, dadas por la adición de NaCl al medio, en ambos sistemas se obtiene una disminución en la turbidez máxima obtenida en todo el rango de pH estudiado, consistente con una menor formación de complejo insoluble QT-PE (Figuras 4.1 y 4.2). Puede observarse que, en el caso del Alg, la interacción es de naturaleza electrostática ya que una concentración de 200 mM de NaCl anula completamente la formación de complejos insolubles en todo el rango de pH estudiado. Cuando el sistema contiene Carr, la presencia de NaCl disminuye la turbidez obtenida, pero la

formación de complejos insolubles no es anulada aún en presencia de una concentración de 200 mM de dicha sal. Para este caso, la interacción tiene un componente electrostático pero otro tipo de interacciones también participan en la formación de los complejos insolubles, posiblemente interacciones hidrofóbicas.

Es importante destacar que, en el rango de pH de trabajo, la enzima y los PE no presentaron regiones de insolubilidad *per se* por lo que puede concluirse que la turbidez observada se debe únicamente a la formación de complejos insolubles QT-PE.

Para cada una de las curvas obtenidas pueden obtenerse dos valores de pH de importancia: pH_{ϕ} y pH_c . El primero hace referencia al pH correspondiente al comienzo de la fase de asociación primaria y el segundo al pH de comienzo de formación de los agregados de mayor tamaño [132]. La tabla 4.I muestra los resultados obtenidos.

Tabla 4.I: pH_c y pH_{ϕ} para las interacciones QT-Alg y QT-Carr en presencia de diferentes fuerzas iónicas

[NaCl] (mM)	QT-Alg		QT-Carr	
	pH_c	pH_{ϕ}	pH_c	pH_{ϕ}
0	5,91	7,03	5,78	8,21
50	4,81	6,31	6,48	7,65
200	NA	NA	5,40	7,46

NA= No aplicable

Puede verse a partir de estos datos que, para ambos sistemas, se observa una leve disminución en los valores de pH_{ϕ} y pH_c al variar la fuerza iónica del sistema. La única excepción encontrada es el valor de pH_c obtenido para el sistema QT-Carr con una concentración de NaCl de 50 mM.

Finalmente, debido a que las condiciones del medio que afectan la relación de cargas en la proteína y en el polímero producen cambios notables en la formación de los agregados, puede concluirse que los resultados obtenidos concuerdan con un mecanismo netamente electrostático de formación de los complejos QT-Alg y con un mecanismo parcialmente de este tipo para el sistema QT-Carr. Además, los resultados obtenidos permiten concluir que el rango de pH adecuado para realizar la precipitación de la enzima con Alg es entre 4,50-5,25 mientras que, cuando el PE utilizado es el Carr, se puede trabajar a pHs menores a 5,00. Por otro lado, puede concluirse que ambos sistemas pueden ser re-disueltos mediante cambios en el pH o la fuerza iónica del medio de trabajo.

4.1.2- Titulación de la proteína con los polímeros

4.1.2.1- Determinación de la relación polímero/proteína para la interacción

Con el fin de determinar la cantidad de polímero necesaria para precipitar una dada cantidad de QT, se realizó la titulación de una concentración fija de enzima con agregados sucesivos de una solución de polímero de concentración conocida. El tiempo entre agregados fue estandarizado a 1 min de manera de dar lugar a la formación de los complejos. Las titulaciones se realizaron con diferentes concentraciones iniciales de QT con el objetivo de verificar si la relación

polímero/proteína para la precipitación se mantiene constante al variar la cantidad de enzima presente. Los pHs de trabajo se seleccionaron de acuerdo a los datos obtenidos al realizar los diagramas de solubilidad. Cuando el agente precipitante fue el Alg se trabajó a un único pH (5,00) y cuando se utilizó Carr se trabajó a tres pHs (4,00; 4,50 y 5,00). Los resultados se muestran en las Figuras 4.3 y 4.4. Para el caso de la titulación con Carr sólo se muestran los resultados obtenidos a pH 5,00 ya que en el resto de los pHs se obtuvieron tendencias similares.

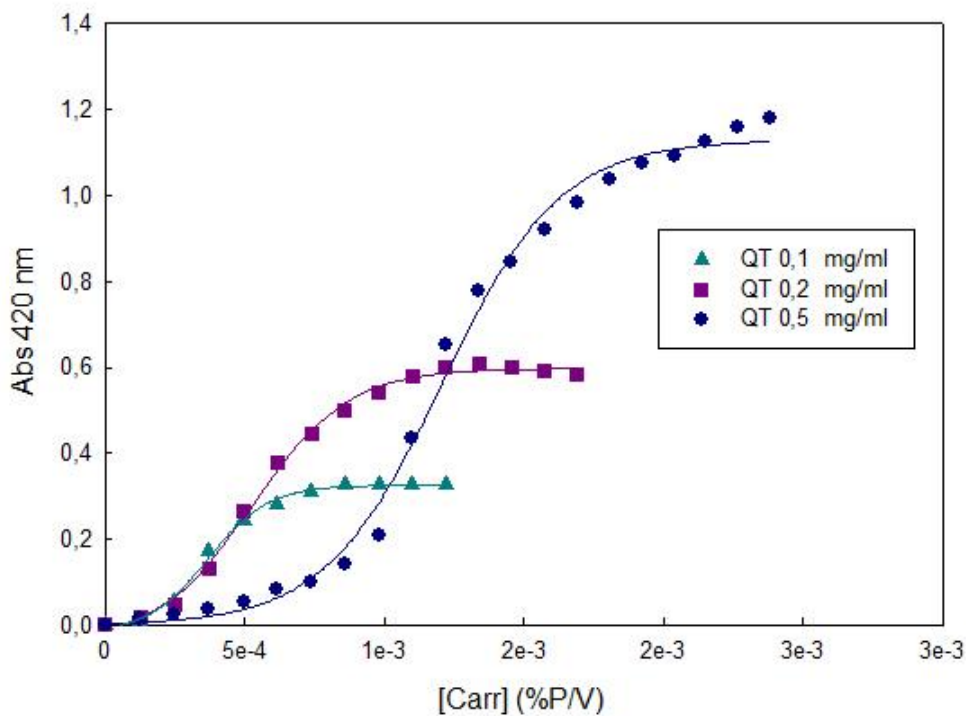


Figura 4.3: Titulación de QT con Carr a pH 5,00. Medio HAc/Ac- 25 mM pH 5,00. Temperatura 25 °C. Se muestran los datos experimentales y el ajuste de los mismos a una función sigmoidea de 4 parámetros.

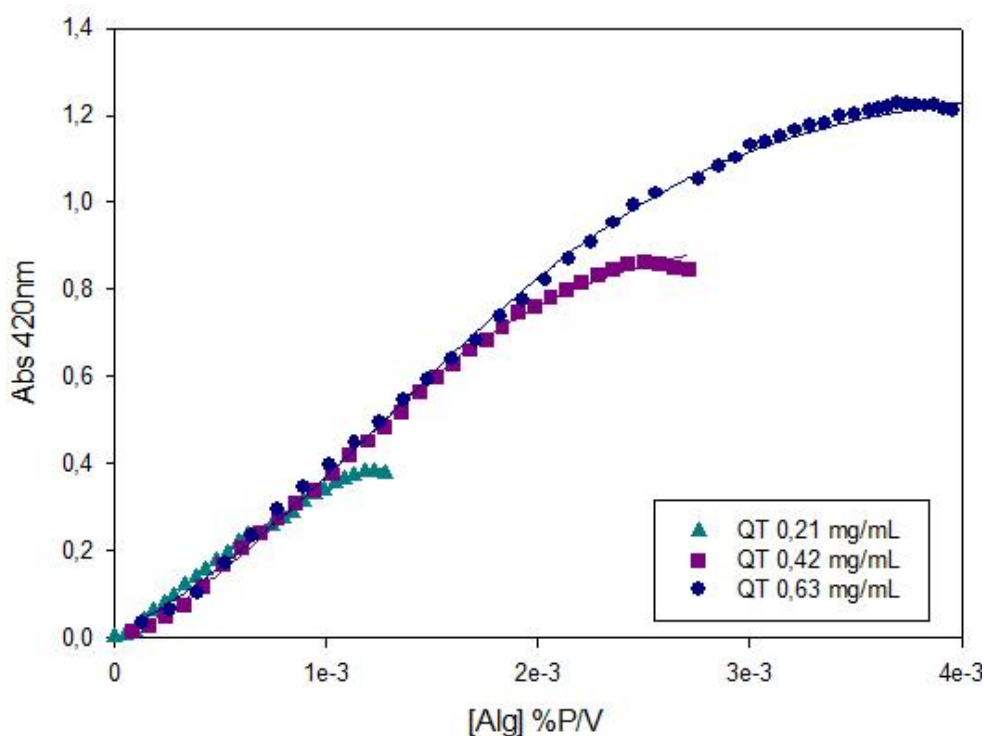


Figura 4.4: Titulación de QT con Alg a pH 5,00. Medio HAc/Ac⁻ 25 mM, pH 5,00. Temperatura 25 °C. Se muestran los datos experimentales y el ajuste de los mismos a una función sigmoidea de 4 parámetros.

Con ambos polímeros, los datos obtenidos presentan un comportamiento de tipo sigmoideo, lo que estaría indicando que se requiere de una concentración crítica de polímero para dar lugar a la formación de complejos insolubles. A su vez, puede observarse que el incremento en la concentración inicial de proteína conlleva a un incremento en la turbidez máxima obtenida, lo que es lógico, ya que con el incremento en dicho valor se espera obtener una mayor cantidad de complejo insoluble. Además, todas las curvas presentan, a elevadas concentraciones de polímero, una región donde la turbidez se mantiene constante a pesar del agregado de más titulante. Esto indica que el sistema ha alcanzado el máximo de precipitación y que no hay posibilidad de más formación de partículas insolubles.

A partir del procesamiento de los datos como se indicó en la sección 3.3.4.2, se puede obtener la concentración de polímero necesaria para alcanzar la turbidez máxima y, a partir de ésta, obtener la cantidad mínima cantidad de PE necesaria para alcanzar el máximo rendimiento de la precipitación frente a una concentración determinada de enzima en el medio. Por otro lado, a partir del ajuste de los datos a una función sigmoidea es posible obtener el valor $[PE]_{0,5}$. El mismo se define como la concentración de polímero necesaria para alcanzar la mitad de la turbidez máxima y es un parámetro muy útil para comparar diferentes sistemas o el mismo sistema en distintas condiciones. En la tabla 4.II se muestran los valores resultantes del procesamiento de los datos para el sistema QT-Carr.

Tabla 4.II: Relaciones Proteína-Polímero para la formación del complejo QT-Carr. Medio buffer HAc/Ac⁻ 25 mM. Temperatura 25 °C.

[QT] (mg/mL)	pH 4,00		pH 4,50		pH 5,00	
	[Carr] _{0,5} (%P/V)	Carr/ QT (mg/mg)	[Carr] _{0,5} (%P/V)	Carr/ QT (mg/mg)	[Carr] _{0,5} (%P/V)	Carr/ QT (mg/mg)
0,1	$(6,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	0,06	$(7,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	0,12	$(3,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	0,06
0,2	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	0,08	$(8,5 \pm 0,7) \cdot 10^{-4}$	0,08	$(5,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	0,05
0,5	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$	0,04	$(1,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$	0,04	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$	0,03

Como se observa en la tabla 4.II, la cantidad de polímero requerida para precipitar 1 mg de QT disminuye al aumentar la concentración inicial de enzima en el medio. Por otro lado puede verse que esta relación es levemente menor a pH 5,00 en todos los casos. La $[carr]_{0,5}$ se incrementa a medida que aumenta la concentración de proteína en el medio y, en todos los casos, dicho valor es menor cuando se trabaja a pH 5,00.

Los resultados obtenidos para el sistema QT-Alg se muestran en la tabla 4.III.

Tabla 4.III: Relaciones Proteína-Polímero para la formación del complejo QT-Alg. Medio buffer HAc/Ac⁻ 25 mM, pH 5,00. Temperatura 25°C.

[QT] (mg/ml)	[Alg] _{0,5} (%P/V)	Alg/QT (mg/mg)
0,21	$(3,1 \pm 0,7) \cdot 10^{-4}$	0,05
0,42	$(1,00 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$	0,05
0,63	$(1,36 \pm 0,06) \cdot 10^{-3}$	0,05

Puede verse que el comportamiento de este sistema es diferente al anterior. En este caso la cantidad de polímero necesaria para precipitar 1 mg de enzima se mantiene constante al variar la concentración inicial de QT. La $[Alg]_{0,5}$ se incrementa con el aumento en la cantidad de enzima presente en el sistema, pero dicho incremento es proporcional al aumento en la concentración de QT. Estos resultados

están de acuerdo con los obtenidos para otros sistemas proteína-PE y es un dato muy interesante ya que, al mantenerse la relación independientemente de la cantidad de enzima presente, es posible aplicar las relaciones obtenidas a sistemas con otras concentraciones de QT.

Si se comparan los resultados de ambos sistemas al mismo pH (5,00), se observa que el Carr tiene mayor capacidad de unir QT que el Alg cuando la enzima se encuentra en mayor cantidad. Esto era esperable ya que el Carr tiene una mayor densidad de cargas eléctricas negativas en su superficie disponibles para interactuar con los grupos amino cargados positivamente de la QT.

4.1.2.2- Efecto de la fuerza iónica sobre la formación de los agregados

Como se indicó anteriormente, se observa un marcado efecto de la fuerza iónica del medio sobre la formación de los complejos proteína-polímero. Con el objetivo de poder tener más datos sobre este efecto, se realizaron las titulaciones de QT con ambos PE en presencia de diferentes fuerzas iónicas dadas por la adición de NaCl al medio. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 4.5 y 4.6. En ambos casos se presentan los datos obtenidos experimentalmente y el ajuste de los mismos a una función sigmoidea de 4 parámetros.

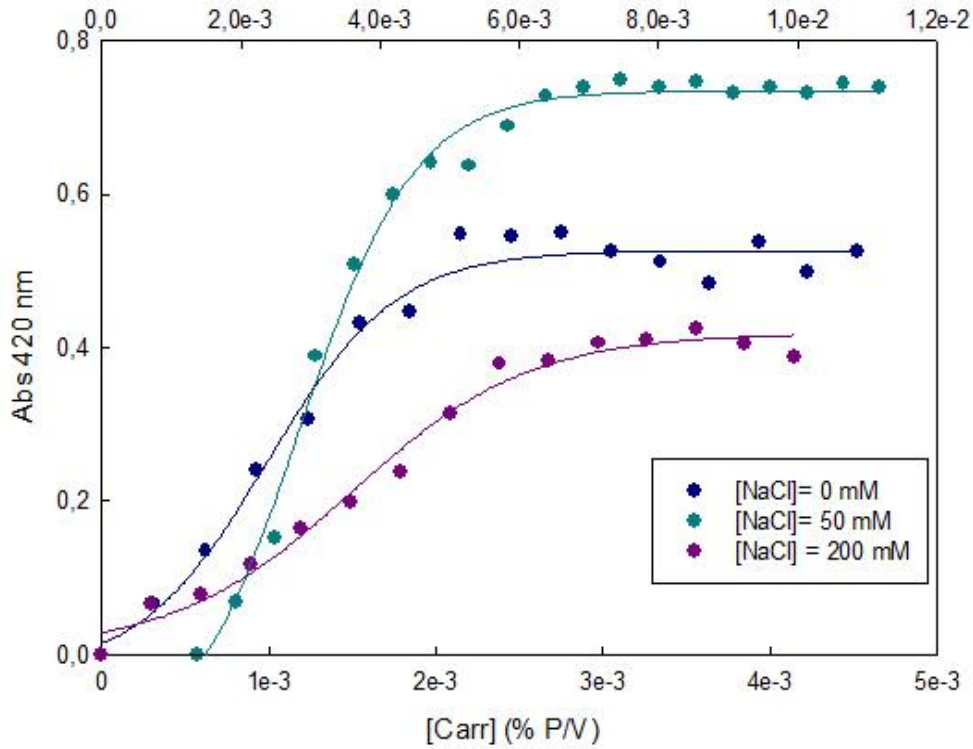


Figura 4.5: Titulación de QT (0,5 mg/mL) con Carr. Medio HAc/Ac: 25 mM pH 5,00. Temperatura 25 °C. El eje X superior corresponde a las curvas con 0 y 50 mM de NaCl y el eje inferior corresponde a la curva con 200 mM de NaCl.

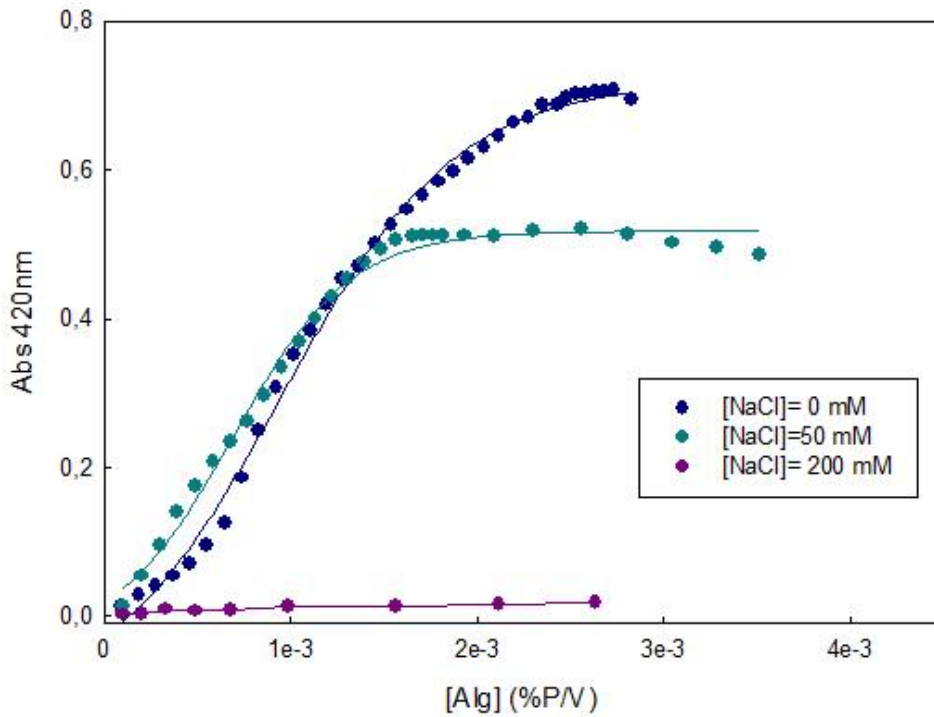


Figura 4.6: Titulación de QT (0,5 mg/mL) con Alg. Medio HAc/Ac: 25 mM pH 5,00. Temperatura 25 °C.

A partir de los datos mostrados en las Figuras 4.5 y 4.6 puede concluirse que la tendencia encontrada al realizar los diagramas de fase se mantiene: la incorporación de NaCl al medio de trabajo disminuye gradualmente la formación del complejo insoluble QT-PE.

Para el sistema QT-Alg (Figura 4.6) no se observa turbidez en todo el rango de concentraciones de polímero estudiadas al llegar a una concentración de sal de 200 mM. Este resultado avala la hipótesis de un mecanismo electrostático de formación del complejo. Puede verse también que el agregado de NaCl al medio cambia la forma de la curva de titulación, pasando de sigmoidea a hiperbólica. Esto puede deberse a que la presencia de sales anule el efecto cooperativo que se observa en la precipitación en ausencia de fuerza iónica.

Para el caso del Carr, aún frente a una concentración de NaCl de 200 mM se sigue observando formación de complejos insolubles aunque la turbidez máxima obtenida disminuye casi a la mitad de la observada en ausencia de sales. Estos resultados son una prueba más de que la formación del complejo QT-Carr tiene un componente electrostático pero existen también otros tipos de interacciones que colaboran en la formación de los agregados.

4.1.2.3- Seguimiento del proceso de precipitación mediante medidas de actividad enzimática

Con el objetivo de comprobar si la aparición de turbidez en los sistemas se debía efectivamente a la precipitación de la enzima, las curvas de titulación se

realizaron nuevamente pero mediante medidas de actividad enzimática. Para ello, se prepararon baterías de tubos con una concentración fija de enzima y cantidades crecientes de cada uno de los polímeros. Luego de 10 min de incubación, se centrifugaron los sistemas para separar los sobrenadantes de los precipitados. Estos últimos fueron re-disueltos con buffer Tris-HCl 200 mM pH 8,20, condición elegida a partir de los datos obtenidos al realizar los diagramas de solubilidad de ambos sistemas. Se midió actividad enzimática de QT inicial, en el sobrenadante y en el precipitado re-disuelto.

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 4.7 y 4.8. Es importante aclarar que para el caso del Carr se muestran los resultados obtenidos a pH 4,00 ya que en los demás pH (4,50 y 5,00) se observó la misma tendencia en los datos.

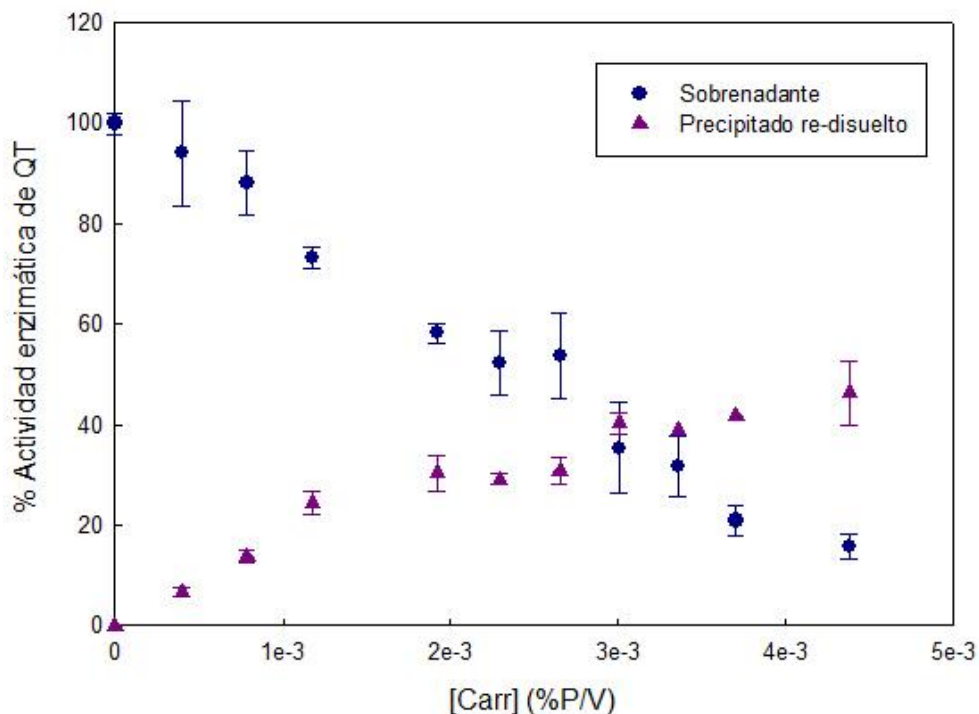


Figura 4.7: Titulación de QT con Carr seguida por medidas de actividad enzimática. Medio: a) sobrenadante: HAc/Ac⁻ 25 mM pH 4,00; b) precipitado: Tris-HCl 200 mM pH 8,20. [QT]= 0,5 mg/mL. Temperatura 25 °C.

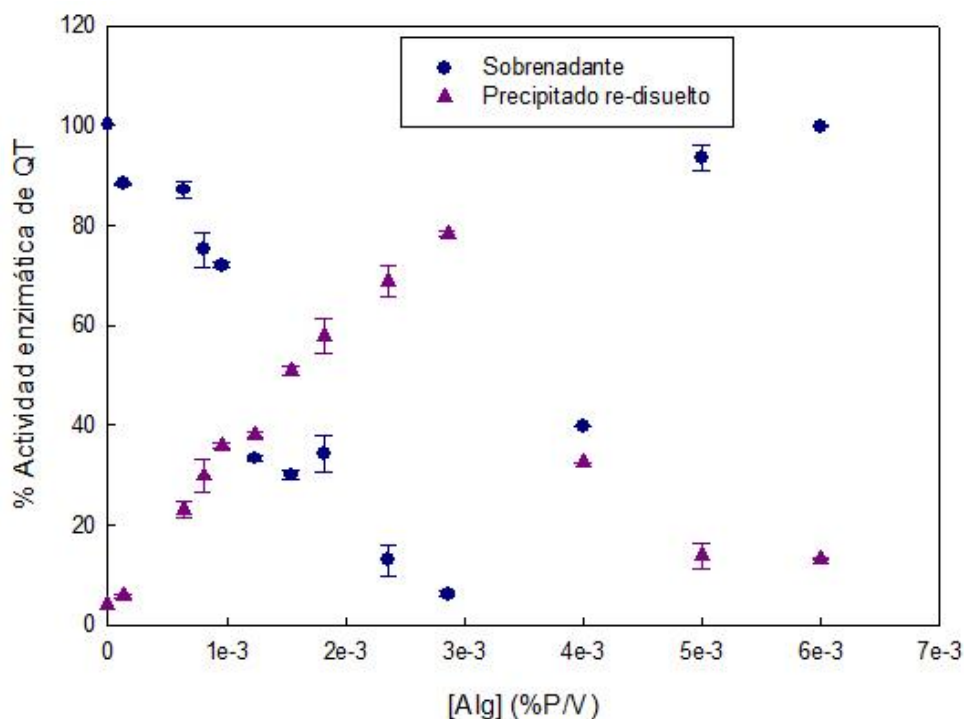


Figura 4.8: Titulación de QT con Alg seguida por medidas de actividad enzimática. Medio: a) sobrenadante: HAC/Ac- 25 mM pH 5,00; b) precipitado: Tris-HCl 200 mM pH 8,20. [QT]= 0,5 mg/mL. Temperatura 25 °C.

Como puede observarse, el agregado de polímero en cantidades crecientes disminuye gradualmente la actividad en el sobrenadante a la vez que la misma aumenta en el precipitado re-disuelto. A partir de los datos obtenidos puede concluirse que la turbidez observada al realizar los diagramas de fases y las titulaciones se debe, efectivamente, a la precipitación de la enzima de interés. Puede observarse también que, con ninguno de los PE ensayados, se obtiene un 100 % de precipitación de la QT, quedando en el sobrenadante entre un 10-50 % de la enzima inicial, aún frente a concentraciones elevadas de polímero.

No obstante, es importante notar que en la precipitación con Alg, a altas concentraciones del mismo, se observa un aumento de la actividad QT en el

sobrenadante y una disminución de la misma en el precipitado re-disuelto. Esto puede deberse a que la interacción Alg-Alg se ve más favorecida que la interacción Alg-QT cuando la concentración del PE está por encima de cierto valor. También puede deberse al incremento en la fuerza iónica del medio dada por el mismo PE, ya que esto produciría un apantallamiento de las cargas disminuyendo la atracción entre la QT y el Alg. Un comportamiento similar fue observado en el estudio de la precipitación de la QT con otros PE [10].

En la precipitación control (en ausencia de PE) se obtuvo un rendimiento del 4 %, es decir que la QT precipita, en muy baja cantidad, a través de una simple centrifugación. En presencia de polímero se obtuvo un rendimiento máximo de enzima precipitada de 74 % para el caso del Alg y para el caso del Carr del 50 %, 60 % y 50 % según el pH del medio utilizado para la precipitación (4,00; 4,50 y 5,00 respectivamente) incrementándose, en todos los casos, notablemente la precipitación de la enzima con respecto al control.

Es importante destacar que, en todos los casos, se realizaron los controles correspondientes y se verificó que en el rango de concentraciones de polímeros de trabajo y en los pHs seleccionados para la realización de las curvas de titulación la actividad de la enzima no se ve afectada (datos no mostrados).

4.1.2.4- Variación del tamaño de los agregados QT-Carr con la concentración de polímero

Como se detalló en la sección 3.3.4.4, la variación de tamaño de los agregados QT-Carr fue estudiada mediante la realización de la curva de titulación de

una concentración fija de enzima con agregados sucesivos del PE. Ante cada agregado de titulante se registró la absorbancia del sistema en el rango de 420 a 650 nm. Mediante el procesamiento de los datos utilizando la ecuación 14 se obtuvo el parámetro α , el cual es inversamente proporcional al tamaño de las partículas formadas. A continuación se presentan los resultados obtenidos a pH 4,50 ya a que pH 4,00 y 5,00 los datos presentaron la misma tendencia.

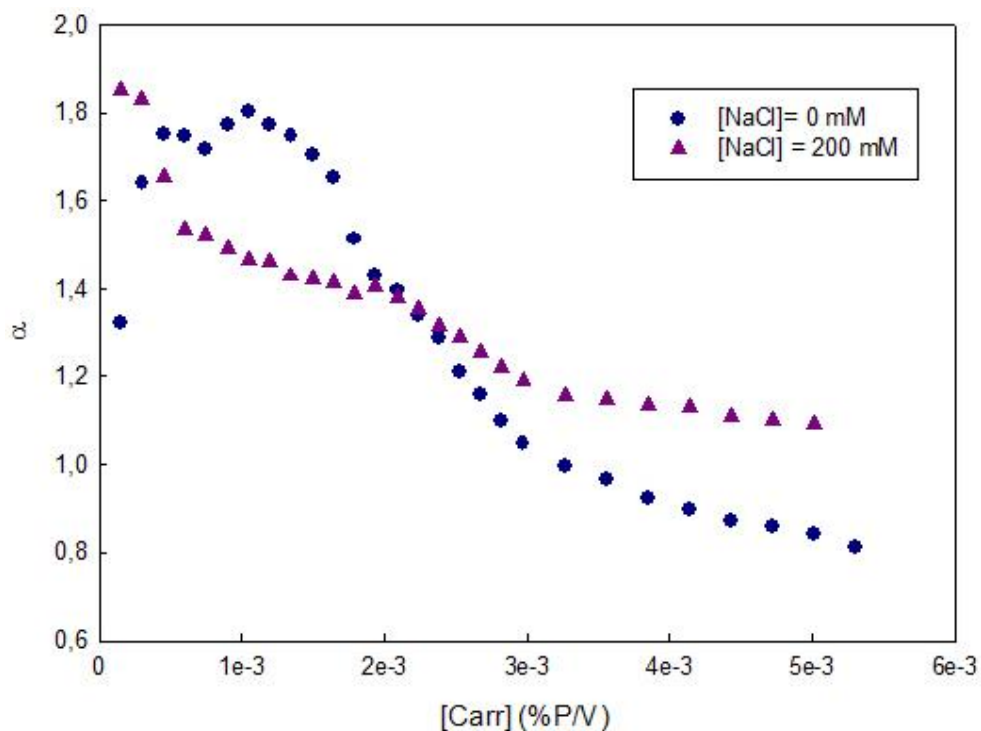


Figura 4.9: Variación relativa del tamaño de los complejos QT-Carr con la concentración de polímero del medio. Medio HAc/Ac⁻ 25 mM pH 4,50 con diferentes concentraciones de sal agregada. [QT]= 0,5 mg/mL. Temperatura 25 °C.

Como puede observarse en la figura 4.9, α disminuye con el aumento de la concentración de polímero en el medio, lo que estaría indicando un aumento en el tamaño de los complejos QT-Carr al aumentar la concentración de este último. Este resultado es consistente con la mayor formación de agregados insolubles al aumentar

la cantidad de agente precipitante en el medio y con la mayor posibilidad de los mismos de agregarse entre ellos para formar partículas de mayor tamaño.

El agregado de sal al medio no cambia la tendencia de los datos, pero se observa que el tamaño final de los agregados es menor que el alcanzado en su ausencia. Esto es consistente con los resultados obtenidos en los demás ítems, en los que se puede ver que el aumento de la fuerza iónica del medio interfiere con la formación de los complejos insolubles QT-Carr.

4.1.3- Cinética del proceso de precipitación

La cinética de formación de los agregados QT-PE fue seguida mediante la medición de la aparición de turbidez a 420 nm en función del tiempo. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente se trabajó variando diferentes parámetros del medio. Para el caso de la precipitación utilizando Carr se realizaron las cinéticas a tres pHs diferentes, con diferentes concentraciones iniciales de QT y variando la fuerza iónica del medio. El sistema QT-Alg fue estudiado a pH 5,00, con diferentes concentraciones de enzima y a diferentes fuerzas iónicas. Parte de los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 4.10 y 4.11.

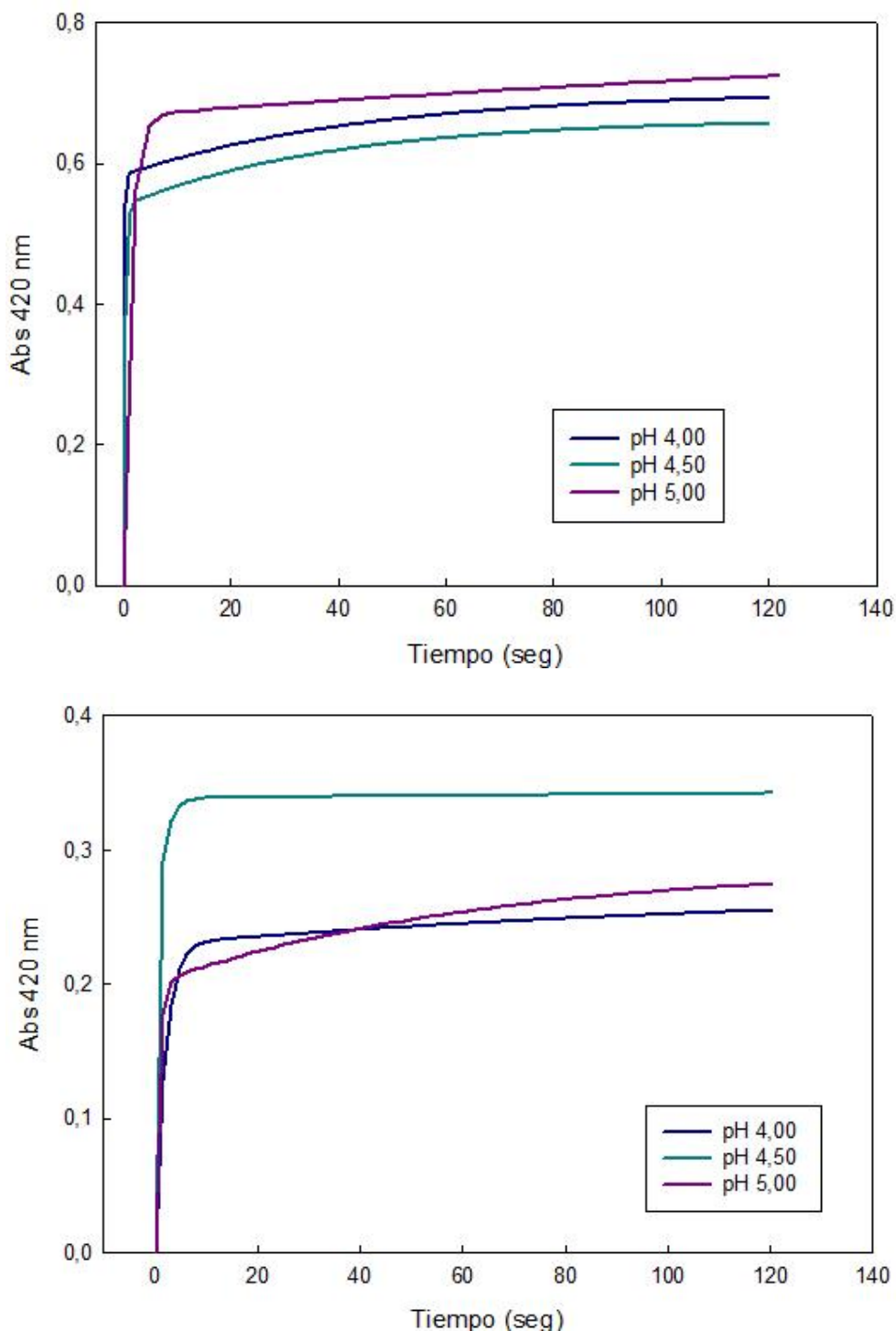


Figura 4.10: Cinética de la formación de los agregados insolubles QT-Carr Superior: en función del pH del medio. Inferior: efecto de la fuerza iónica (150 mM). Medio HAc/Ac: 25 mM, [QT]= 0,5 mg/mL. [Carr]= 0,005 %P/V. La fuerza iónica del sistema se debe al agregado de 150 mM de NaCl. Temperatura: 25 °C.

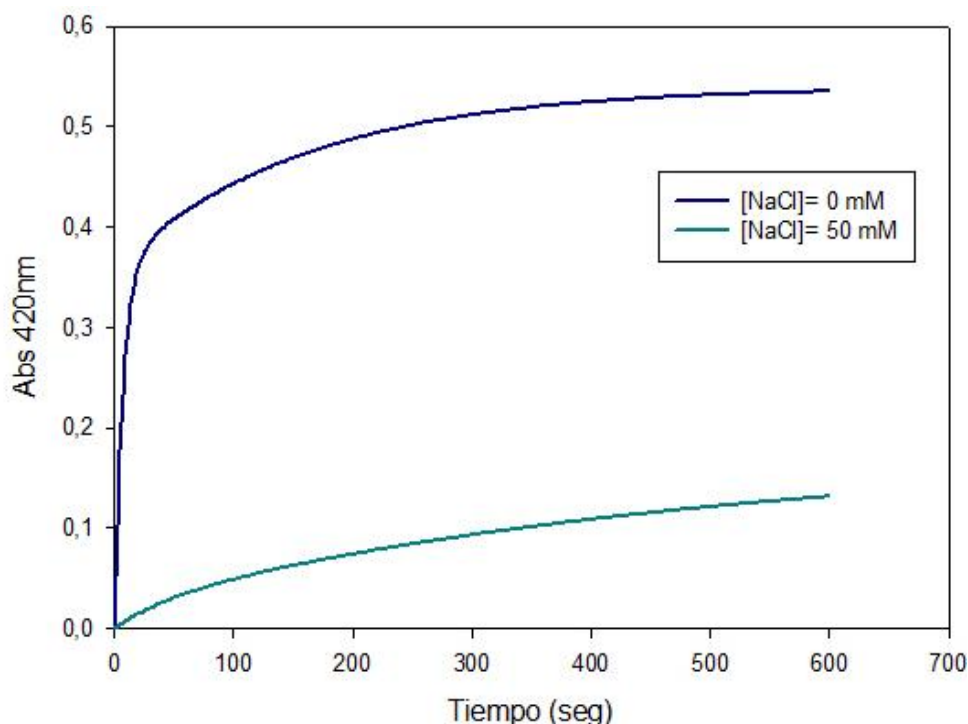


Figura 4.11: Cinética de la formación de agregados insolubles QT-Alg. Medio HAc/Ac- 25 mM, pH 5,00. [QT]= 0,2 mg/mL. [Alg]= 0,001 %P/V. Temperatura: 25 °C.

Puede verse que, en ambos sistemas, la cinética de formación de los complejos insolubles PE-QT en ausencia de fuerza iónica es rápida. Pueden distinguirse, en todos los casos, dos etapas en el proceso: una primer etapa rápida que requiere de menos de 10 seg cuando se utiliza Carr para la precipitación y de 30 seg cuando el Alg es el polímero utilizado. La segunda etapa es un poco más lenta y requiere de 100 seg y 250 seg para completarse, respectivamente. Luego de este tiempo, se observa una estabilización en los valores de Abs a 420 nm medidos.

Esto se debe a que, en un primer paso, las moléculas de PE interactúan con varias moléculas de proteína para formar complejos insolubles de menor tamaño. Luego, las cargas residuales presentes en los complejos insolubles interactúan dando lugar a la agregación de los mismos formando macroagregados. Esta segunda

etapa es mucho más lenta y contribuye al aumento de la turbidez del medio. Los resultados obtenidos están de acuerdo con lo reportado para otros pares proteína-PE [133].

Es importante destacar que no se encontró variación en la cinética del proceso al variar la cantidad de enzima presente en el sistema en ninguna de las condiciones en estudio, la única variación encontrada fue un aumento de la turbidez máxima obtenida al aumentar la concentración de QT presente, resultado esperable al tener en cuenta la mayor cantidad de complejo insoluble formado al haber más enzima presente en el medio (datos no mostrados).

Si se analizan los sistemas por separado, puede verse que para el caso de los complejos QT-Carr no se observan cambios en la velocidad de formación de los mismos en función del pH ni en presencia de sales adicionadas al medio. En el sistema QT-Alg, sin embargo, la presencia de una baja concentración de NaCl cambia dramáticamente la forma de la curva. Además de obtenerse una menor cantidad de producto final, como era esperado, el tiempo necesario para alcanzar la turbidez máxima aumenta notablemente y no llega a un valor constante aun cuando se llega a los 10 min de medida. Esto último se relaciona con la imposibilidad de formar complejos insolubles QT-Alg al incrementar la fuerza iónica del medio. La sal agregada produce un apantallamiento de las cargas del Alg, la QT y de los complejos QT-Alg e interfiere con la interacción entre ellos para formar más complejos insolubles o agregados de mayor tamaño.

4.2- Efecto de los polímeros sobre la estructura de la enzima

La presencia de PE en el medio y la interacción de los mismos con la enzima pueden producir cambios en su estructura y estabilidad [113, 134-136]. Resultados mostrados anteriormente, obtenidos mediante medidas de actividad enzimática, demostraron que los polímeros utilizados no afectan la actividad enzimática de la QT, pero no se sabe si hay modificaciones en su estructura o estabilidad.

Por ello, con el objetivo de determinar si la presencia de los polímeros afecta de manera alguna la estructura o estabilidad de la QT se realizaron diferentes estudios. Los mismos se presentan a continuación.

4.2.1- Espectros de emisión de fluorescencia

La QT posee 8 residuos de Triptófano, de los cuales 3 se encuentran con sus anillos indólicos expuestos al solvente. Cualquier cambio producido por el medio en el entorno de los mismos será observado como cambios en el máximo de emisión de la proteína [114, 137-138]. Los espectros de emisión de la QT en ausencia y presencia de ambos polímeros se muestran en las Figuras 4.12 y 4.13.

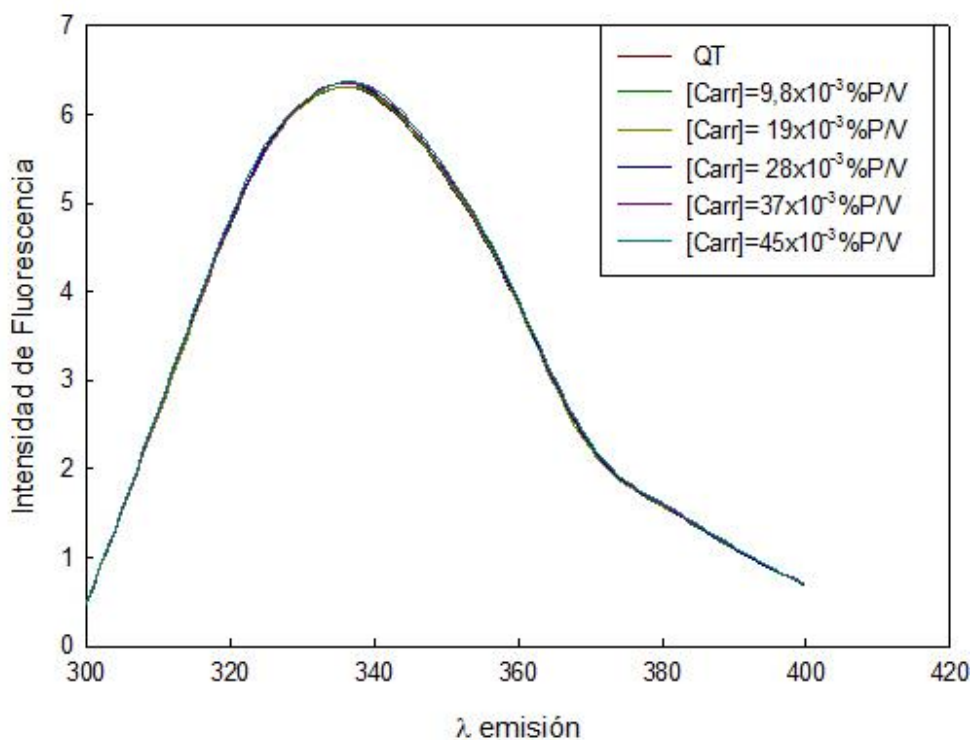


Figura 4.12: Espectros de emisión de fluorescencia de QT en presencia de Carr. Medio: Tris-HCl 200 mM pH 8,20, [QT]= 0,5 mg/mL. Temperatura: 25 °C.

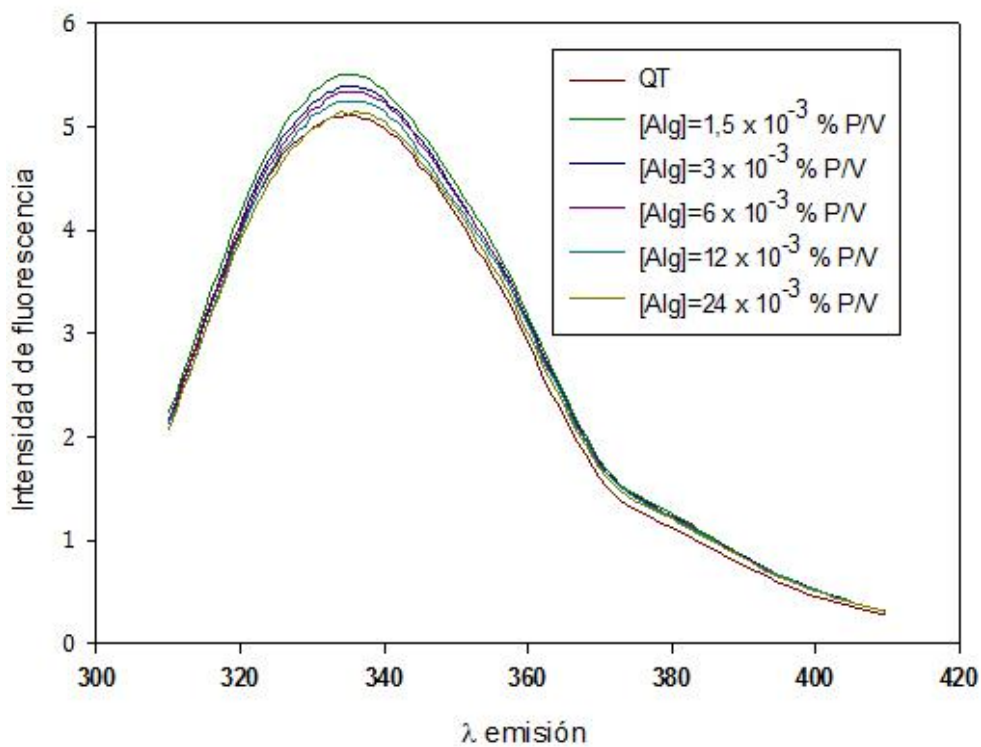


Figura 4.13: Espectros de emisión de fluorescencia de QT en presencia de Alg. Medio Tris-HCl 200 mM pH 8,20, [QT]= 0,5 mg/mL. Temperatura: 25 °C.

Puede verse que, en ninguno de los casos, hay cambios en la longitud de onda del máximo de emisión ($\lambda_{\text{máx}}$) de la enzima, lo que indica que no hay cambios apreciables en la polarizabilidad del microentorno de los Triptófanos debido a la presencia de los polímeros. A su vez, se observa un ligero aumento en la intensidad de fluorescencia emitida en el $\lambda_{\text{máx}}$ cuando el Alg está presente en el medio. Esto último puede deberse a la disminución de los procesos no radiantes en presencia del polímero, como consecuencia del incremento en la viscosidad del medio que produce el mismo.

Es importante destacar que, para cada concentración de polímero, se realizó un espectro control en ausencia de proteína. En ninguno de los casos se observó emisión de fluorescencia debida a los polímeros en el rango de longitudes de onda estudiados.

4.2.2- Extinción de la fluorescencia nativa de la QT

Las mediciones de *quenching* de la fluorescencia de una molécula nos dan una idea de la accesibilidad de los fluoróforos al *quencher*, como así también de cualquier modificación en el microentorno del fluoróforo inducido por la presencia de un co-soluto o por el medio de trabajo [114, 119, 139]. Con el objetivo de verificar si la presencia de los polímeros o el medio de trabajo producen alguna modificación en el microentorno de los Triptófanos de la QT, se realizaron las medidas de *quenching* de la fluorescencia nativa de la enzima con acrilamida, en ausencia y presencia del polímero.

Para las experiencias se utilizó acrilamida en concentraciones crecientes y las medidas se realizaron en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de cada uno de los polímeros. Los datos obtenidos para el caso del sistema QT-Alg se presentan en la Figura 4.14 mientras que la tabla 4.IV muestra los parámetros obtenidos a partir del ajuste de los datos a la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 15).

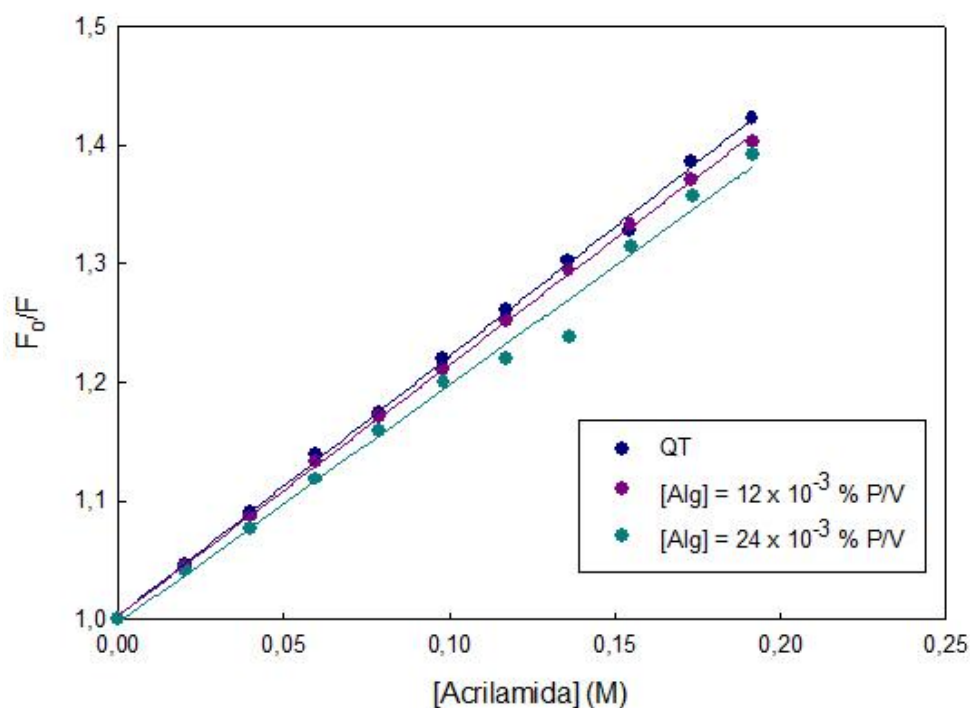


Figura 4.14: *Quenching* de la fluorescencia nativa de la QT en presencia de Alg ajustado a la ecuación de Stern-Volmer. Medio Tris-HCl 200 mM pH 8,20, [QT]= 0,5 mg/mL. Temperatura 25 °C.

Tabla 4.IV: Parámetros del ajuste de los datos del *quenching* de la fluorescencia nativa de la QT por acrilamida en presencia de Alg a la ecuación de Stern-Volmer.

Condición	K_{SV}	Ordenada al Origen	R^2	SCE
QT	$2,18 \pm 0,03$	$1,003 \pm 0,003$	0,9998	$2,128 \times 10^{-4}$
QT+ 12×10^{-3} %P/V Alg	$2,11 \pm 0,02$	$1,003 \pm 0,002$	0,9996	$8,569 \times 10^{-4}$
QT+ 24×10^{-3} %P/V Alg	$2,01 \pm 0,07$	$0,99 \pm 0,08$	0,9959	$2,938 \times 10^{-3}$

A partir de los datos experimentales y de los valores de R^2 y de SCE obtenidos a partir del ajuste de los mismos puede observarse que, en presencia de Alg, los datos obtenidos ajustan perfectamente a la ecuación 15. Los valores de las ordenadas al origen (todos cercanos a la unidad) son también una prueba del correcto ajuste de los datos a la ecuación de Stern-Volmer. Puede concluirse entonces que estamos en presencia de una única población de fluoróforos, todos igualmente accesibles al solvente. Por otro lado, es importante destacar que la presencia de Alg no produce una modificación apreciable en la accesibilidad o entorno de los Triptófanos presentes en la molécula de QT ya que no se observan variaciones en la K_{SV} para las diferentes condiciones.

Finalmente, si se analizan en conjunto los datos obtenidos a partir de la realización de los espectros de emisión de la fluorescencia (4.2.1) y de *quenching* de la fluorescencia para el sistema QT-Alg puede observarse que los mismos llevan a la

misma conclusión: la presencia de Alg, aún en concentraciones superiores a las requeridas para realizar la precipitación, no modifica el entorno de los triptófanos presentes en la molécula de QT, lo que permite inferir que no hay cambios en la estructura terciaria de la misma debido a la presencia del PE.

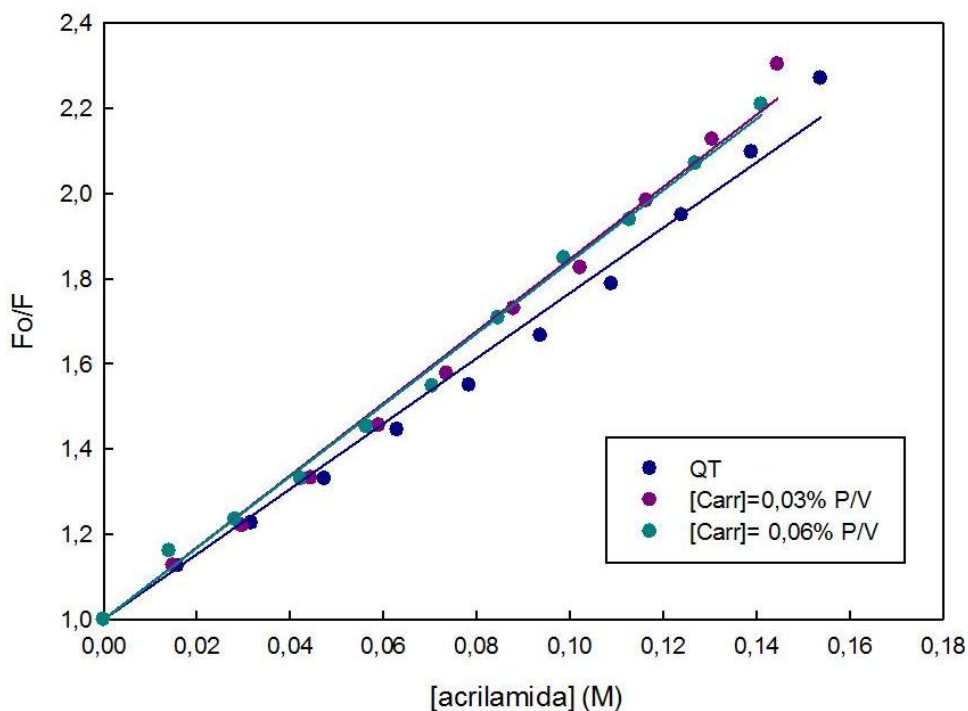


Figura 4.15: *Quenching* de la fluorescencia nativa de la QT en presencia de Carr ajustado a la ecuación de Stern-Volmer. Medio Tris-HCl 200 mM pH 8,20, [QT]= 0,5 mg/mL. Temperatura 25 °C.

La Figura 4.15 muestra el ajuste a la ecuación 15 de los datos obtenidos para el sistema QT-Carr. En este caso, el comportamiento del sistema no puede ser explicado utilizando la ecuación de Stern-Volmer. Los coeficientes de regresión para el ajuste están alejados de la unidad, como así también la ordenada al origen de los mismos (datos no mostrados). Esto ocurre debido a una sobre-extinción de la fluorescencia mucho mayor de lo que predice la ecuación 15. Para el ajuste de los datos en estos casos se debe utilizar la ecuación 16: Stern-Volmer modificada. Ésta

tiene en cuenta la mayor extinción de fluorescencia observada considerando un mecanismo denominado de “esfera de acción” donde la concentración del *quencher* es elevada y la probabilidad de *quenching* es mucho mayor [114].

La Figura 4.16 muestra el ajuste de los datos a la ecuación de Stern-Volmer modificada y en la tabla 4.V se muestran los parámetros obtenidos a partir del ajuste.

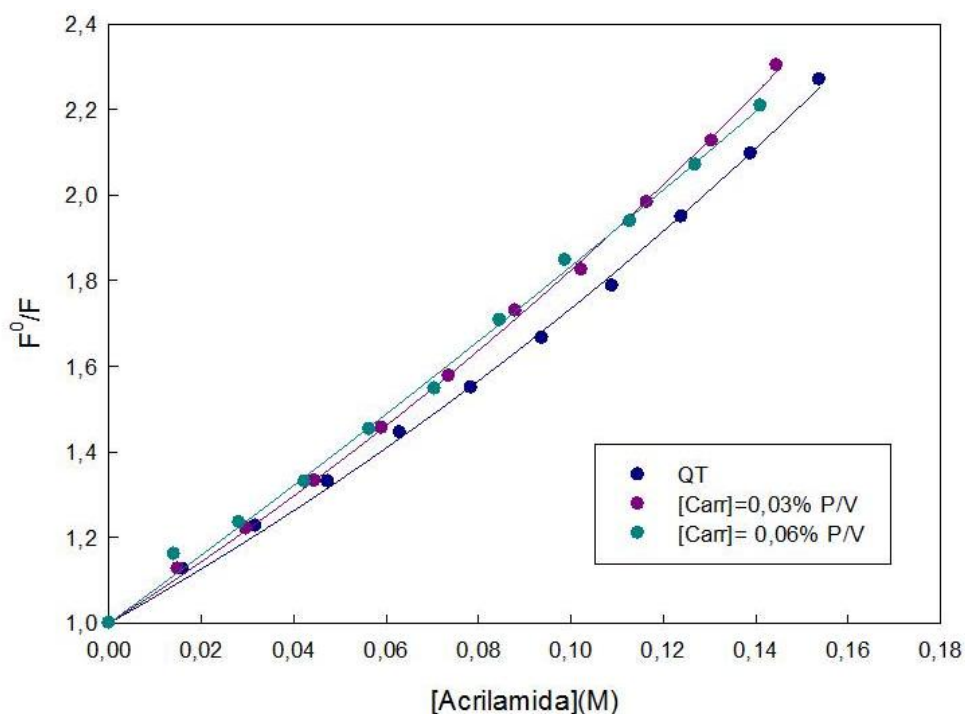


Figura 4.16: *Quenching* de la fluorescencia nativa de la QT en presencia de Carr ajustado a la ecuación de Stern-Volmer modificada. Medio Tris-HCl 200 mM pH 8,20, [QT]= 0,5 mg/mL. Temperatura 25 °C.

Tabla 4.V: Parámetros del ajuste de los datos del quenching de la fluorescencia nativa de la QT por acrilamida en presencia de Carr a la ecuación de Stern-Volmer modificada.

Condición	v (nm ³ /molécula)	K_D (M ⁻¹)	R ²	SCE
QT 0,5 mg/ml	3113	6,1 ± 0,2	0,9958	0,2165
QT+0,03% P/V Carr	2895	6,9 ± 0,2	0,9982	2,738x10 ⁻³
QT + 0,06% P/V Carr	982	7,9 ± 0,3	0,9998	3,117x10 ⁻³

Con los datos obtenidos puede verse que, en este caso, la presencia del polímero en el medio produce una ligera variación en la K_D del proceso, la cual aumenta junto con el aumento de la concentración de Carr en el medio. Esto estaría indicando que la presencia del polímero incrementa levemente la cinética del proceso de *quenching*, posiblemente debido a que facilita el acceso del *quencher* a los triptófanos debido a una variación en el entorno de los mismos.

Con respecto al volumen de la esfera de acción, el mismo disminuye notablemente al aumentar la concentración de Carr en el medio. Esto nos permite concluir que la presencia del polímero disminuye la cantidad de moléculas de acrilamida que acceden al entorno de los Triptófanos de la QT, esto es, en general, debido a impedimentos estéricos generados por la presencia del PE en el medio.

4.2.3- Estabilidad química de la enzima en presencia de los polímeros

El efecto de los polímeros sobre la estabilidad de la QT frente a la urea fue estudiado mediante espectroscopia de fluorescencia. La Figura 4.17 muestra el

corrimiento hacia el rojo en la longitud de onda de los máximos de emisión de fluorescencia de la enzima al incrementarse la concentración de agente desnaturante presente en el medio. Es dicho corrimiento el que permite monitorear el proceso de desnaturalización de la enzima utilizando esta técnica.

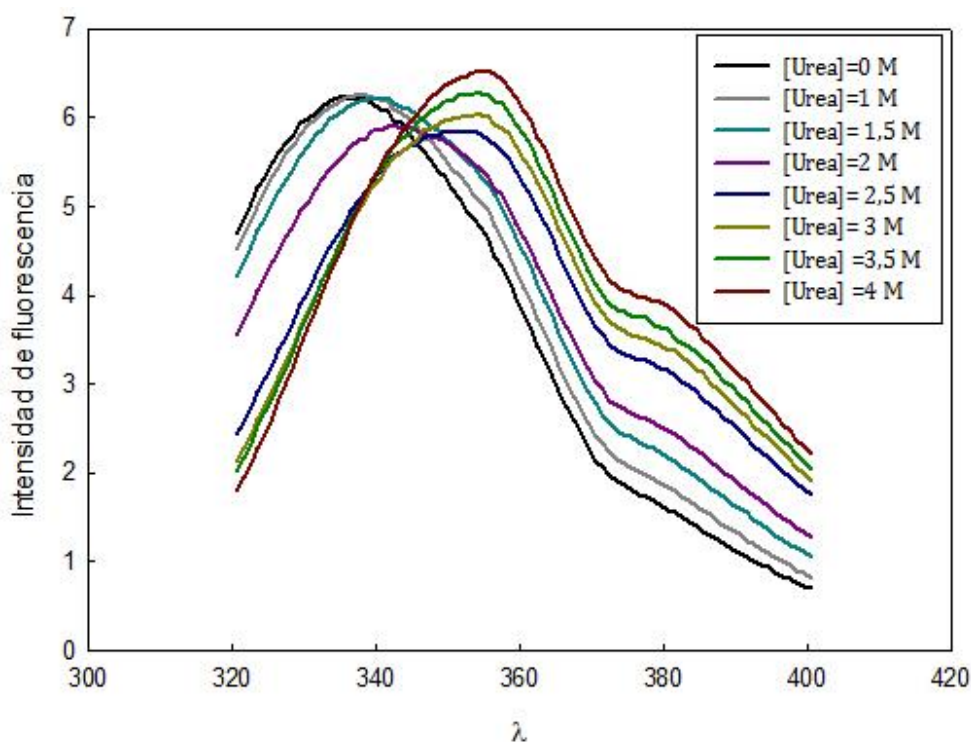


Figura 4.17: Espectros de emisión de fluorescencia de QT en presencia de concentraciones crecientes de urea. Medio Tris-HCl 200 mM pH 8,20, [QT]= 0,5 mg/mL. Temperatura 25 °C.

Los espectros de emisión de la QT fueron realizados en presencia de concentraciones crecientes de urea y en presencia o ausencia de los PE. Los datos obtenidos fueron procesados según la ecuación 22 para obtener la fracción de QT desnaturada en cada condición. Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 4.18 y 4.19.

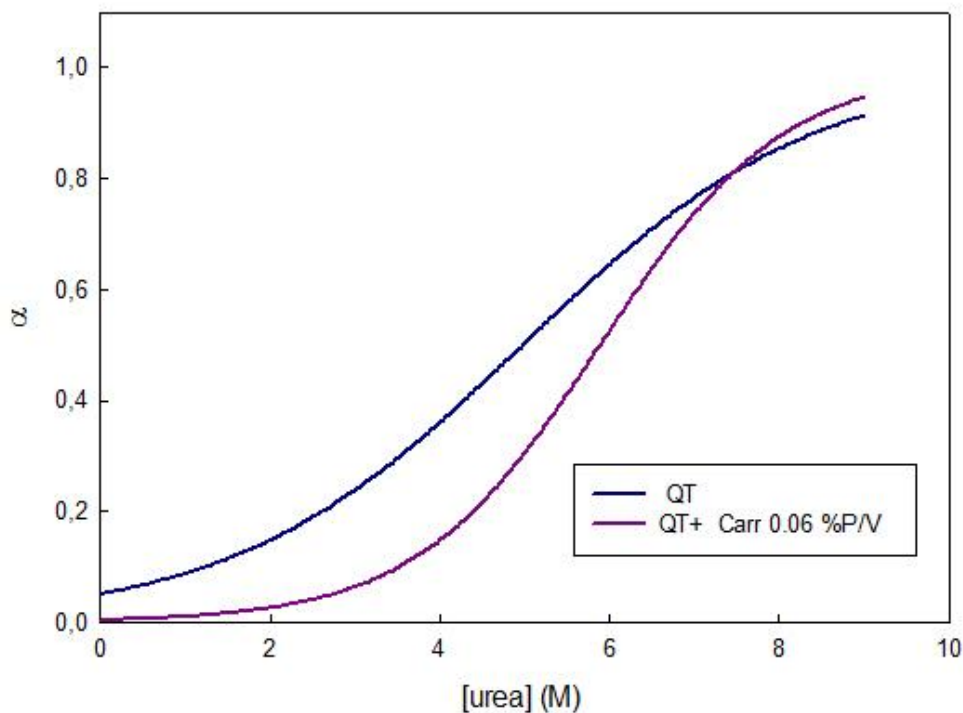


Figura 4.18: Fracción de QT desnaturalizada en función de la concentración de urea en ausencia y presencia de Carr. Medio Tris-HCl 200 mM pH 8,20, [QT]= 0,5 mg/mL. Temperatura 25 °C.

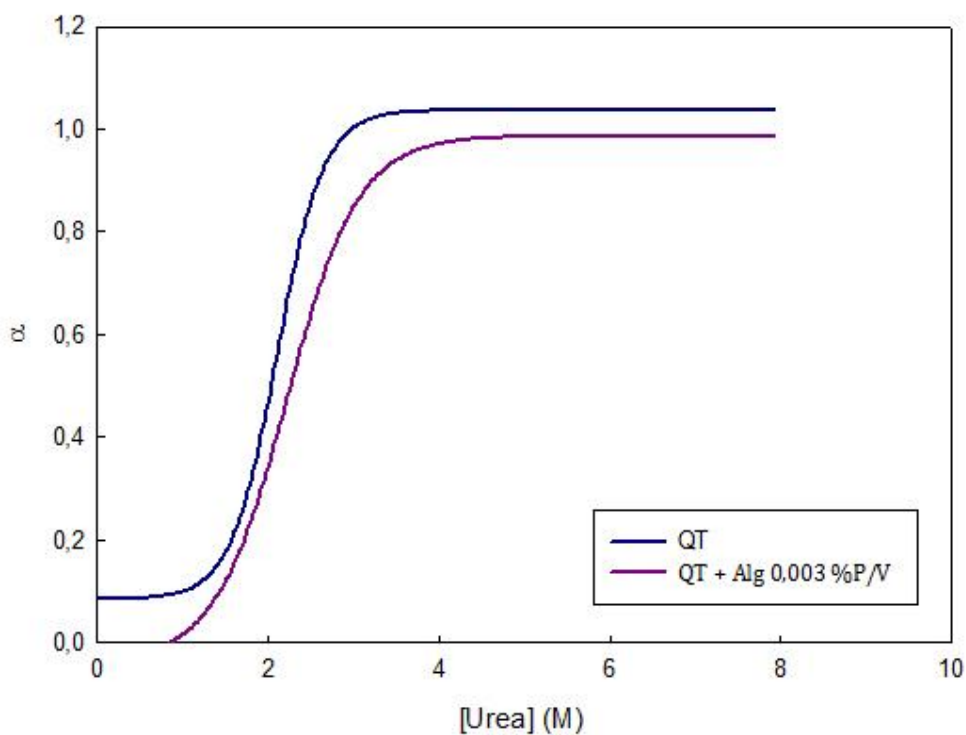


Figura 4.19: Fracción de QT desnaturalizada en función de la concentración de urea en ausencia y presencia de Alg. Medio Tris-HCl 200 mM pH 8,20, [QT]= 0,5 mg/mL. Temperatura 25 °C.

Una simple inspección de los gráficos obtenidos permite concluir que, en ambos casos, la presencia del polímero produce un incremento en la estabilidad de la QT frente a la desnaturalización por urea. Para el Alg este incremento es leve pero, cuando en el medio se encuentra presente el Carr, el aumento en la estabilidad es mucho mayor y se observa un pronunciado incremento en la C_m (concentración de urea requerida para obtener un 50 % de enzima desnaturalizada) en presencia del PE con respecto a la enzima sola.

Otra observación notable que se desprende de las Figuras, es la diferencia en las curvas control (QT en ausencia de polímero) obtenidas en cada caso. Esto puede deberse a que se trabajó con dos lotes diferentes de enzima que, a pesar de ser adquiridos en la misma empresa, pueden presentar diferencias. Por otro lado, está demostrado que la QT posee la capacidad de formar dímeros y trímeros, los cuáles podrían estar afectando los valores absolutos obtenidos en las experiencias [140-141]. Sin embargo, los datos tienen valor a modo comparativo entre presencia y ausencia de polímero en el medio ya que, para cada polímero, los resultados fueron obtenidos utilizando la misma preparación de enzima.

La tabla 4.VI muestra los parámetros obtenidos a partir del procesamiento de los datos utilizando las ecuaciones 18 y 19, y el posterior ajuste de los mismos a la ecuación 23.

Tabla 4.VI: Parámetros termodinámicos asociados al proceso de desnaturalización química de QT en ausencia y presencia de PE

Condición	C_m (M)	ΔG_{H_2O}	m (Kcal/mol.M)
QT	$4,8 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,4$	$0,45 \pm 0,03$
QT+ 0,06 %P/V Carr	$5,9 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,5$	$0,65 \pm 0,01$
QT	$2,1 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,9$	$1,8 \pm 0,5$
QT+ 3×10^{-3} %P/V Alg	$2,2 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,6$	$1,6 \pm 0,2$

El ajuste de los datos permite concluir que la presencia de Alg no modifica la estabilidad química de la QT en las condiciones estudiadas. Sin embargo, cuando en el medio se encuentra presente el Carr, se observa un marcado incremento en la estabilidad de la enzima frente a la desnaturalización por urea. La C_m se incrementa en un 22 %, indicando que en presencia del polímero se requieren mayores concentraciones de agente desnaturalizante para alcanzar un 50 % de desnaturalización. Con respecto al ΔG_{H_2O} , el mismo se duplica en presencia de Carr, lo cual sugiere una mayor estabilidad de la QT cuando se encuentra formando el complejo con el PE. Esto puede deberse a que el polímero mantenga a la proteína en un entorno más hidratado. Finalmente, se observa un ligero incremento en el parámetro m . El mismo está relacionado con el cambio en el área expuesta al solvente de la enzima cuando la misma es desnaturalizada por urea. Esto estaría indicando que la presencia del Carr incrementa el área expuesta de la enzima al

solvente cuando la proteína es desnaturizada comparada con la enzima en ausencia de PE.

4.2.4- Efecto del Carr sobre la estabilidad térmica de la QT

La desnaturización de las proteínas puede realizarse variando diferentes condiciones del medio de trabajo tales como: pH, tipo y concentración de sales, agregado de co-solutos o variaciones en la temperatura [142-143]. El agregado de solutos al medio donde se encuentra la proteína puede estabilizar o desestabilizar a la misma frente a la desnaturización [41, 144].

El efecto del Carr sobre la estabilidad térmica de la QT se muestra en la Figura 4.20.

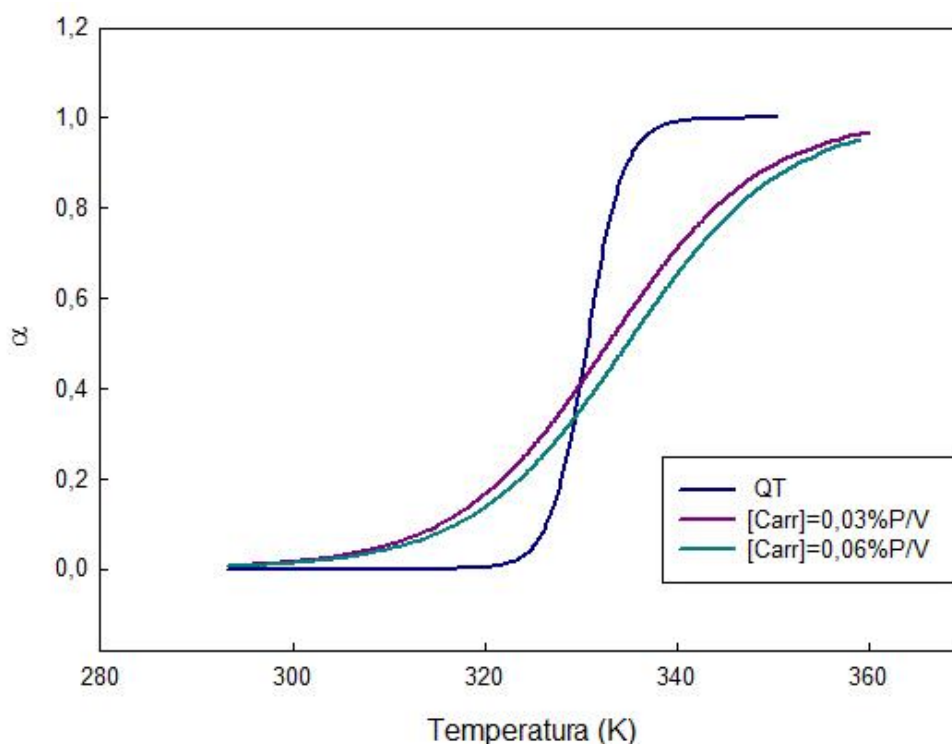


Figura 4.20: Fracción de QT desnaturizada en función de la Temperatura. Medio Tris-HCl 200 mM pH 8,20. [QT]= 0,5 mg/mL.

Puede observarse que la presencia de Carr produce un corrimiento de la curva de desnaturalización de la QT hacia mayores temperaturas, lo que indica una estabilización del estado nativo de la proteína en presencia del polímero. A mayor concentración de Carr mayor es la estabilización observada. Estos resultados son coherentes con observaciones previas de que la adición de cosolutos, tales como polisacáridos, a una solución de proteínas lleva a un aumento en la estabilidad térmica de la misma [116, 145-147]. Además, la presencia del polímero modifica la cooperatividad del proceso de desnaturalización. La pendiente de la curva de fracción desnaturalizada vs Temperatura en la zona de T_m es menor en presencia de Carr, lo que estaría indicando que el polímero disminuye la cooperatividad en la desnaturalización de la enzima, una prueba más de su efecto estabilizante.

La tabla 4.VII muestra los parámetros termodinámicos para el proceso de desnaturalización de la enzima, obtenidos a partir del procesamiento de los datos como fue indicado en la sección 3.3.6.3.

Tabla 4.VII: Parámetros termodinámicos asociados al proceso de desnaturalización térmica de QT en ausencia y presencia de Carr.

Condición	T_m (K)	ΔG^0 (Kcal/mol)	ΔH^0 (Kcal/mol)	ΔS^0 (cal/K.mol)
QT	330,7	10,15	113,03	113,03
QT + 0,03% P/V Carr	332,9	2,60	26,78	81,10
QT + 0,06% P/V Carr	334,9	2,70	26,34	79,26

Si se analizan los valores de T_m , puede observarse que los mismos aumentan en presencia de Carr apoyando la hipótesis de estabilización de la QT por el polímero. En cuanto a los parámetros termodinámicos, es conocido que los cambios entálpicos y entrópicos son positivos para el proceso de desnaturalización térmica de proteínas [40, 45]. Los cambios de entropía para las tres condiciones en estudio son positivos, indicando un aumento del desorden del sistema durante la desnaturalización y se observa que dicho cambio es mucho menor en presencia del polímero, sin observarse variación entre las diferentes concentraciones del mismo. Esta disminución de la entropía sugiere una ligera estabilización de la proteína en el complejo, lo que está de acuerdo con el efecto protector que ejerce el polímero sobre la QT frente a la temperatura.

El cambio entálpico disminuye en presencia del polímero, lo que también está de acuerdo con la estabilización de la proteína en presencia del polímero y con una labilización de los enlaces en presencia del mismo.

Finalmente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos al realizar las curvas de desnaturalización química y térmica de la QT en ausencia y presencia de Carr, puede concluirse que el polímero estabiliza el estado nativo de la enzima frente a agentes desnaturalizantes físicos y químicos.

4.3- Aplicación de los resultados obtenidos a la purificación de QT a partir de páncreas bovino

4.3.1- Activación de las proteasas presentes en el Hmg

Si bien el protocolo de preparación y activación del Hmg de páncreas bovino ya se encuentra optimizado en diferentes publicaciones [9-10, 13], en las mismas se adiciona, para el paso de activación, CaCl_2 . El problema frente al cual nos enfrentamos en este desarrollo experimental fue que la presencia de Ca^{2+} produce la gelificación del Alg e interfiere con la precipitación. Por ello, fue necesario el desarrollo de un protocolo de activación en ausencia de Ca^{2+} . La preparación y el protocolo para la activación se detallan en la sección 3.3.9.2 y los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4.VIII.

Tabla 4.VIII: Tiempo de activación y máxima actividad QT obtenida en la activación del Hmg de páncreas bovino en presencia y ausencia de Ca^{2+}

Condición	Tiempo de activación (hs)	Maxima actividad QT (UA/ml Hmg)
Hmg activado en ausencia de Ca^{2+}	4:30	50
Hmg activado en presencia de Ca^{2+}	3:30	58

En primer lugar es importante notar el mayor tiempo requerido para la activación del Hmg cuando no se encuentra presente Ca^{2+} en el medio de trabajo. Por otro lado, la actividad máxima obtenida en ausencia de Ca^{2+} es bastante similar a la obtenida en su presencia. Por ello, los resultados obtenidos permiten concluir que es factible la activación de la QT presente en el Hmg de páncreas bovino en ausencia de Ca^{2+} .

4.3.2- Precipitación de QT a partir de los Hmg activados

Finalmente, los resultados obtenidos al trabajar con la proteína pura y con ambos PE fueron aplicados a la purificación de la misma a partir del Hmg activado de páncreas bovino. En este caso, se utilizaron los dos Hmg preparados: cuando el PE utilizado fue el Carr se utilizó el Hmg activado en presencia de Ca^{2+} y, cuando se utilizó Alg, el Hmg empleado fue el activado en ausencia de dicho catión.

En primer lugar, fue necesario determinar la cantidad de PE a utilizar para obtener el mejor rendimiento y purificación. Para ello se tuvieron en cuenta las relaciones proteína/polímero obtenidas al realizar las curvas de titulación turbidimétricas, pero también se tuvo en cuenta que se estaba trabajando con un medio complejo. Experiencias previas han demostrado que cuando se realiza la purificación a partir del Hmg es necesario utilizar concentraciones de polímero mucho mayores que las requeridas para precipitar la enzima sola [9-10]. El Hmg de páncreas contiene diversas enzimas como la QT, Trip, Elastasa, Carboxipeptidasas, Lipasas y Amilasas y, además, posee restos de tejidos. Estos factores, en conjunto, pueden

disminuir la concentración de polímero efectiva para la precipitación de la enzima de interés.

Cuando se utilizó Carr como agente precipitante, la purificación se realizó a pH 4,50 debido a que en esa condición se obtuvo el mayor rendimiento al trabajar con la enzima comercial. Puede observarse (Figura 4.21) que, a medida que se incrementa la concentración de polímero presente, se observa una disminución en la actividad QT en el sobrenadante al mismo tiempo que aumenta su presencia en el precipitado. Para alcanzar el máximo rendimiento de QT en el precipitado se requiere de una concentración de polímero de aproximadamente 0,06 %P/V. Superado este valor el rendimiento se mantiene prácticamente constante, si se tiene en cuenta el error asociado con las mediciones.

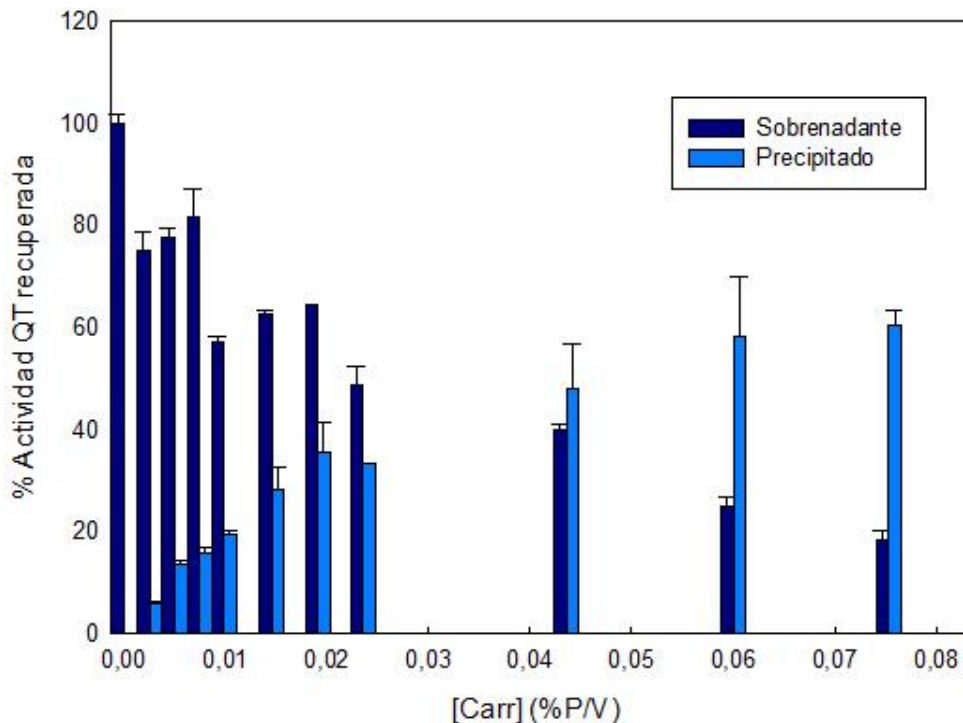


Figura 4.21: Recupero de QT a partir de un Hmg de páncreas bovino en función de la concentración de Carr. Medio HAc/Ac- 25 mM pH 4,50. Temperatura 25 °C

En cada punto se determinaron también las proteínas totales presentes en ambas fases (utilizando el método del BCA) con el objetivo de poder calcular los factores de purificación. La tabla 4.IX muestra los resultados obtenidos a partir del procesamiento de los datos para la mejor condición hallada.

Tabla 4.IX: Tabla de purificación de QT a partir de páncreas bovino utilizando Carr

Parámetro	Homogenado	Extracto precipitado con 0.06 % P/V de Carr
Volumen (mL)	1	1
Concentración total de proteínas (mg/mL)	7,7 ± 0,2	1,5 ± 0,03
Actividad QT (U/mL)	58 ± 4	34 ± 2
Actividad específica QT (U/mg)	7,5 ± 0,7	23,0 ± 0,9
Rendimiento QT (%)	100	60 ± 3
Factor de purificación QT	1	3,0 ± 0,4

Puede verse que el rendimiento obtenido (60%) con esta metodología es interesante y, en cuanto al factor de purificación (3,0), si bien no es elevado, es adecuado para el objetivo primario del procedimiento, es decir, para ser utilizado como un primer paso para la purificación de la proteína a gran escala.

Las muestras fueron sometidas luego una electroforesis por SDS-PAGE para verificar los datos obtenidos.

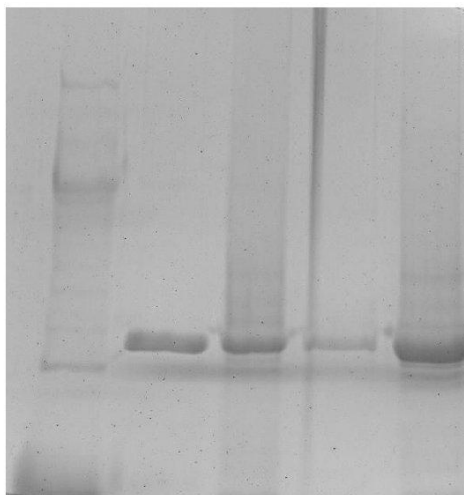


Figura 4.22: SDS-PAGE de las muestras del proceso de precipitación utilizando Carr.

Calle 1: marcador de PM; calle 2: QT pura; calle 3: Hmg;
calle 4: Precipitado re-disuelto; calle 5: Sobrenadante.

Los resultados obtenidos a partir de la electroforesis de las muestras permiten verificar los resultados obtenidos previamente. En la calle del precipitado re-disuelto se observa una disminución importante del contenido de proteínas con respecto del Hmg. La banda correspondiente a la QT es la más definida en el precipitado re-disuelto aún cuando la intensidad de la misma disminuye notablemente. Por otro lado, se observa que en el sobrenadante de la precipitación quedan un gran número de proteínas contaminantes y una cantidad importante de la enzima de interés.

Para el caso del Alg, cuando se realizaron las precipitaciones con el Hmg no se logró obtener actividad de QT recuperada en el precipitado. Esta ausencia de precipitación se atribuyó a la gran cantidad de sales presentes en el mismo, ya que los resultados obtenidos con la enzima comercial demostraron la sensibilidad del

sistema frente al incremento de la fuerza iónica. Por ello, se procedió a dializar el Hmg durante 2 hs y se repitieron las experiencias. La Figura 4.23 muestra los recuperos obtenidos con el Hmg dializado.

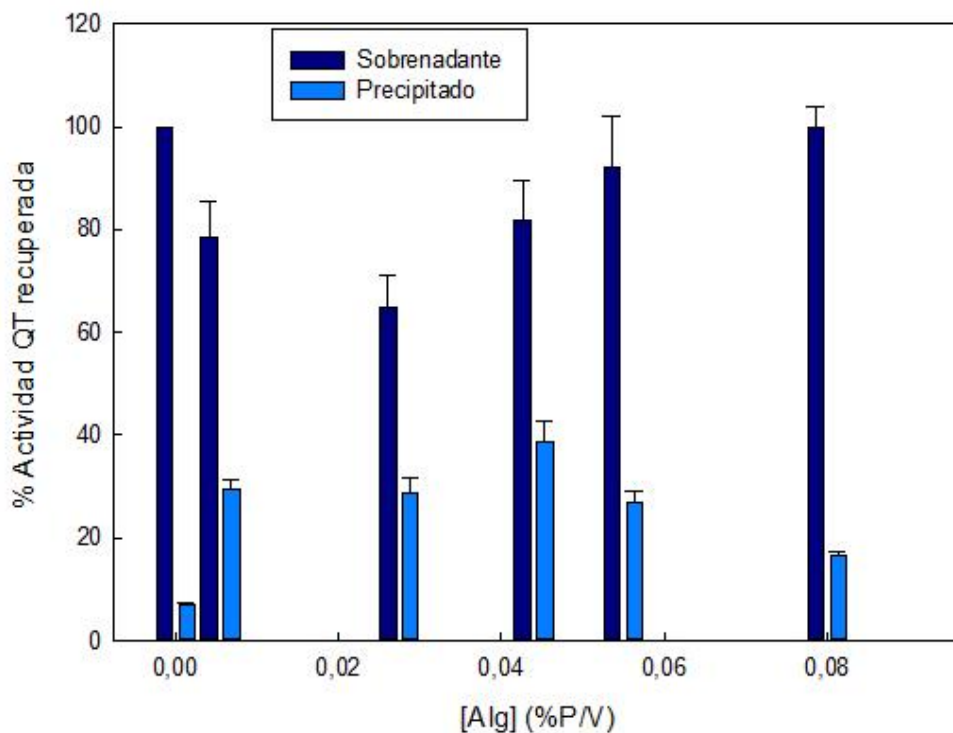


Figura 4.23: Recupero de QT a partir de un Hmg dializado de páncreas bovino en función de la concentración de Alg. Medio HAc/Ac⁻ 25 mM pH 5,00. Temperatura 25 °C

Puede observarse que, a medida que se incrementa la concentración de polímero presente, se observa una disminución de la QT en el sobrenadante al mismo tiempo que aumenta su presencia en el precipitado. Sin embargo, cuando la concentración de Alg se incrementa por encima de 0,05 %P/V la tendencia se revierte y nuevamente la enzima se recupera mayoritariamente en el sobrenadante. Este comportamiento concuerda con el observado con la enzima comercial y puede atribuirse a la re-disolución del complejo insoluble debido al incremento en la fuerza iónica dada por el mismo polímero o a que el incremento en la concentración de Alg

lleve a una interacción preferencial entre las moléculas de polímero impidiendo que las mismas interactúen con la enzima.

A partir de las medidas de actividad enzimática y proteínas totales (utilizando BCA) se calcularon en cada caso los rendimientos y factores de purificación. La tabla 4.X muestra los resultados obtenidos para la mejor condición encontrada.

Tabla 4.X: Tabla de purificación de QT a partir de páncreas bovino utilizando Alg

Parámetro	Homogenado	Extracto precipitado con 0.044 % P/V de Alg
Volumen (mL)	1	1
Concentración total de proteínas (mg/mL)	11 ± 1	1,4 ± 0,3
Actividad QT (U/mL)	52 ± 2	20 ± 1
Actividad específica QT (U/mg)	4,7 ± 0,4	14,3 ± 0,3
Rendimiento QT (%)	100	38 ± 4
Factor de purificación QT	1	3,2 ± 0,4

En este caso, se obtiene un factor de purificación (3,2) aceptable para un proceso de purificación primaria pero el rendimiento obtenido (38%) es bastante bajo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el páncreas bovino se encuentra un elevado número de contaminantes y que la QT representa un bajo porcentaje de las

proteínas totales presentes en el medio, por ello los resultados obtenidos pueden considerarse adecuados para un paso de pre-purificación de la enzima.

La Figura 4.24 muestra el patrón electroforético de las muestras obtenidas en la purificación.

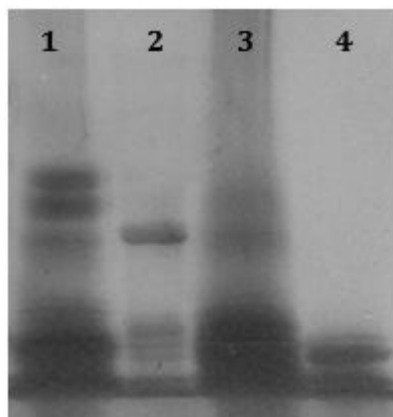


Figura 4.24: SDS-PAGE de las muestras obtenidas a partir de la precipitación utilizando Alg. Calle 1: sobrenadante obtenido luego de la precipitación. Calle 2: precipitado re-disuelto. Calle 3: Hmg de páncreas. Calle 4: QT comercial.

Al comparar las calles 2 y 3 puede observarse que se logra aislar la QT del Hmg de páncreas, aunque no es la única proteína que precipita con el Alg; en la calle 2 se logran diferenciar dos bandas más correspondientes a proteínas de un PM mayor al de la QT. Sin embargo, es importante notar la reducción en el número de proteínas contaminantes presentes en el precipitado re-disuelto.

Finalmente, si se comparan los resultados obtenidos en ambos sistemas puede concluirse que el Carr es un mejor agente precipitante para la QT ya que con el mismo se obtiene un mayor rendimiento de la enzima de interés frente al mismo factor de purificación. Además, la necesidad de dializar el Hmg antes de la

precipitación utilizando Alg complica la posible aplicación de la metodología a gran escala.

4.3.3- Disminución del volumen de re-disolución del precipitado obtenido

En todas las experiencias previas se partió de un volumen fijo de medio u Hmg y el precipitado obtenido fue re-disuelto en igual volumen de buffer Tris-HCl 200 mM, pH 8,20. Con el objetivo de verificar si es posible concentrar el producto obtenido, se repitieron las precipitaciones a partir del Hmg de páncreas bovino en las condiciones óptimas determinadas anteriormente y se re-disolvió el precipitado obtenido en volúmenes decrecientes de buffer Tris-HCl 200 mM, pH 8,20, hasta encontrar el menor volumen posible en el cual se logre la total re-disolución del mismo.

Se encontró que, en el caso del precipitado obtenido utilizando Carr, es posible disminuir el volumen de re-disolución 10 veces mientras que, para el caso del Alg, dicha disminución es de 16 veces. Estos resultados son interesantes ya que permiten concentrar la muestra obtenida disminuyendo notablemente su volumen. Esto es importante en términos de almacenamiento y de posterior procesamiento de las mismas, ya sea con el objetivo de utilizarlas tal como fueron obtenidas o para posteriores pasos de purificación.

4.4- Conclusiones y discusión final: Capítulo 1: Precipitación de QT utilizando PE aniónicos

Durante este capítulo se ha estudiado la interacción entre la QT, una proteasa básica de gran aplicación industrial, y dos polímeros aniónicos naturales: Carr y Alg, con características diferentes. Ambos polímeros poseen carga eléctrica negativa pero, para el caso del Carr, los grupos ácidos que posee en su estructura son fuertes y el polímero presenta carga eléctrica negativa en todo el rango de pH. El Alg, por su parte, presenta carga eléctrica negativa a pH mayores a 3,50.

Se encontró que la interacción entre la enzima y los PE depende de las condiciones del medio que afecten el estado de cargas de las moléculas interactuantes. La formación de complejos insolubles QT-Carr es máxima a pHs menores a 5,00 y el incremento en la fuerza iónica del medio de trabajo interfiere con dicha formación aunque no llega a anularla, lo que permite concluir que la interacción entre ambos es de naturaleza electrostática pero posee un componente no electrostático, que podría atribuirse a un efecto hidrofóbico. Cuando el PE utilizado es el Alg, se obtiene un máximo de interacción a pH 5,00 y la misma disminuye al incrementar o disminuir el pH a partir de dicho valor. La interacción en este caso es puramente electrostática, anulándose con el agregado de 200 mM de NaCl.

En ambos casos se encontró que la cantidad de polímero requerida para alcanzar la máxima precipitación de la enzima es baja, en el orden de 10^{-4} - 10^{-3} %P/V. Sin embargo, el Carr mostró una mayor capacidad para unir QT cuando la misma se

encuentra en elevadas concentraciones. Este resultado era el esperado debido a la mayor densidad de cargas presentes en dicho polímero comparadas con las presentes en el Alg.

Por otra parte, mediante mediciones de actividad enzimática logró corroborarse que la turbidez obtenida se debía efectivamente a la precipitación de la enzima. Se obtuvo un rendimiento del 74 % de enzima precipitada al utilizar Alg y un 60 % al utilizar Carr, trabajando a pH 5,00 y 4,50, respectivamente. Además, el precipitado obtenido fue fácilmente re-disuelto por un cambio en el pH del buffer de trabajo.

En cuanto a la cinética de formación de los complejos insolubles QT-PE se encontró que la formación de los macroagregados es rápida, llegando a completarse en menos de 2 minutos. Además, pudo determinarse que la misma se encuentra influenciada tanto por el pH como por la fuerza iónica del medio de trabajo.

Una vez determinadas las condiciones experimentales para la formación de los complejos insolubles QT-Carr y QT-Alg se estudió el efecto del protocolo sobre la estructura y actividad biológica de la enzima. Ninguno de los polímeros utilizados afecta negativamente la actividad enzimática de la QT ni modifica considerablemente el entorno de los Triptófanos presentes en la misma. El Carr, por su parte, mostró un efecto estabilizador de la enzima frente a la desnaturalización química y térmica. El Alg no produce cambios en la estabilidad de la enzima frente a la desnaturalización por urea y no pudo estudiarse su efecto frente a la temperatura. Estos resultados son

de gran importancia para una posible aplicación del protocolo desarrollado a la purificación de la enzima a partir de un medio complejo.

Finalmente, se estudió la factibilidad de aplicación de la metodología desarrollada para la purificación de QT a partir de un homogenado de páncreas bovino. Ambos PE se mostraron efectivos como agentes precipitantes de la QT a partir de dicho medio. Con el Carr se obtuvo un rendimiento del 60 % con un factor de purificación de 3,0 mientras que para el Alg se obtuvo un rendimiento de 38 % logrando purificar la muestra 3,2 veces. Los resultados obtenidos son interesantes para una metodología propuesta como un paso de pre-purificación de la enzima a partir de una fuente natural.

RESULTADOS
Y DISCUSIÓN:
CAPÍTULO 2

5- Resultados y Discusión: Capítulo 2: Adsorción de proteasas básicas sobre una matriz insoluble de Alginato y Goma Guar

5.1- Caracterización de la matriz obtenida

Si bien la matriz utilizada durante este trabajo fue obtenida a partir de un protocolo previamente publicado [103], antes de comenzar a estudiar su capacidad de adsorción se realizó una caracterización de la misma con el objetivo de verificar su rango de solubilidad-insolubilidad, estabilidad y porcentaje de humedad, entre otras características.

5.1.1- Estabilidad mecánica y retención de agua de la matriz

La matriz obtenida luego del tratamiento con Epi se muestra en la Figura 5.1. Puede observarse que la misma presenta forma esférica, con un diámetro promedio de 2 mm. Su densidad, mayor que la del agua, permite que decante fácilmente evitando pasos de centrifugación para su separación.



Figura 5.1: Fotografía de las esferas obtenidas. A la izquierda se muestran matrices Alg-GG control y a la derecha las tratadas químicamente con Epi.

Si se comparan las esferas tratadas y sin tratar, es notable su diferencia en aspecto y consistencia. Durante el trabajo experimental se encontró que la manipulación de las esferas tratadas es mucho más sencilla y que las mismas no se rompen durante su utilización. Las esferas control presentaron dificultades para su utilización debido a su escasa estabilidad mecánica que llevó a su ruptura durante la agitación.

Para la determinación del porcentaje de agua presente en ambas matrices (tratadas y sin tratar) se pesó una masa exactamente conocida de las mismas y se secó en desecador al vacío, durante 24 hs. Transcurrido ese lapso se volvió a pesar y por diferencia se determinó la masa de agua retenida en la matriz.

Se encontró que la matriz tratada está compuesta en un $98,7 \pm 0,1$ % de agua y que dicho valor se mantiene constante en las diferentes preparaciones de la misma. El control presentó un porcentaje de agua similar a la matriz tratada ($98,8 \pm 0,3$ %), lo que permite concluir que el tratamiento químico de las esferas no altera el grado de hidratación de las mismas. Este dato es similar a resultados obtenidos para las matrices de Alg-CaCl₂ en las que se estima un 98,3 % de agua [13] y para matrices formadas por otros polímeros naturales tales como el chitosan [148].

5.1.2- Estabilidad de las esferas frente a diferentes condiciones experimentales

El principal objetivo del tratamiento químico de las esferas fue su insolubilización aún en ausencia de Ca²⁺. Por ello, se verificó la estabilidad de la matriz obtenida frente a diversas condiciones que podrían llegar a surgir durante el trabajo experimental. Este paso es fundamental para su posterior uso ya que, si la

matriz obtenida se solubiliza en las condiciones de trabajo, no cumplirá con los requisitos necesarios para ser utilizada y el tratamiento químico no tendría sentido alguno. La tabla 5.I muestra los resultados obtenidos.

Tabla 5.I: Estabilidad de la matriz frente a diferentes condiciones.

Medio P_i-HAc/Ac⁻ 50 mM del pH correspondiente. Masa de matriz:

1,000 g. Agitación orbital de 30 rpm durante 24 hs.

Temperatura 25 °C.

Condición	Matriz Alg-GG sin tratar		Matriz Alg-GG tratada	
	Inspección visual	[Azúcares libres] (mg/mL)	Inspección visual	[azúcares libres] (mg/mL)
EDTA 0,1 M	-	3	+	0
pH 3,00	+	0	+	0
pH 4,00	+	0	+	0
pH 5,00	+/-	0,03	+	0
pH 6,00	-	0,5	+	0
pH 7,00	-	0,4	+	0

(+) Indica que la matriz se mantiene intacta.

(-) Indica la desaparición de la matriz (solubilización).

Puede concluirse a partir de los datos obtenidos que el tratamiento químico con Epi de las esferas fue efectivo, ya que permitió la insolubilización de las mismas frente a condiciones experimentales en las que la matriz sin tratamiento se ve claramente afectada. Es importante destacar que el cambio más notable y rápido se observó al incubar las muestras en la solución de EDTA 0,1 M. Esto es lógico debido a que los polímeros utilizados para formar las esferas, si bien son solubles en agua, presentan la capacidad de formar geles insolubles en presencia de iones divalentes

(como el Ca^{2+}) mediante un proceso denominado gelificación ionotrófica [88, 101]. Esta gelificación puede ser revertida eliminando el catión divalente. Por esta razón, el agregado de EDTA (agente quelante de Ca^{2+}) a la matriz sin entrecruzar produce su inmediata disolución, lo cual no sucede con la matriz modificada químicamente. Esto se debe a que, en la matriz tratada, los polímeros se encuentran entrecruzados covalentemente y dicho entrecruzamiento los insolubiliza independientemente de la presencia de Ca^{2+} .

Los resultados obtenidos son muy interesantes debido a que la insolubilidad de las esferas obtenidas permite su utilización en medios sin la presencia de cationes divalentes. Esto es ventajoso ya que la presencia de dichos cationes limita, en muchos casos, la utilización de ciertos buffers debido a la precipitación de sales insolubles. Este inconveniente lleva a tener que utilizar otros compuestos para la regulación del pH que, en la mayoría de los casos, encarecen el proceso. Un ejemplo claro de esto es la imposibilidad de utilizar buffer P_i en combinación con sales de calcio.

5.1.3- FTIR de las matrices obtenidas

Los espectros de FTIR de las muestras tratadas y control se muestran en la Figura 5.2.

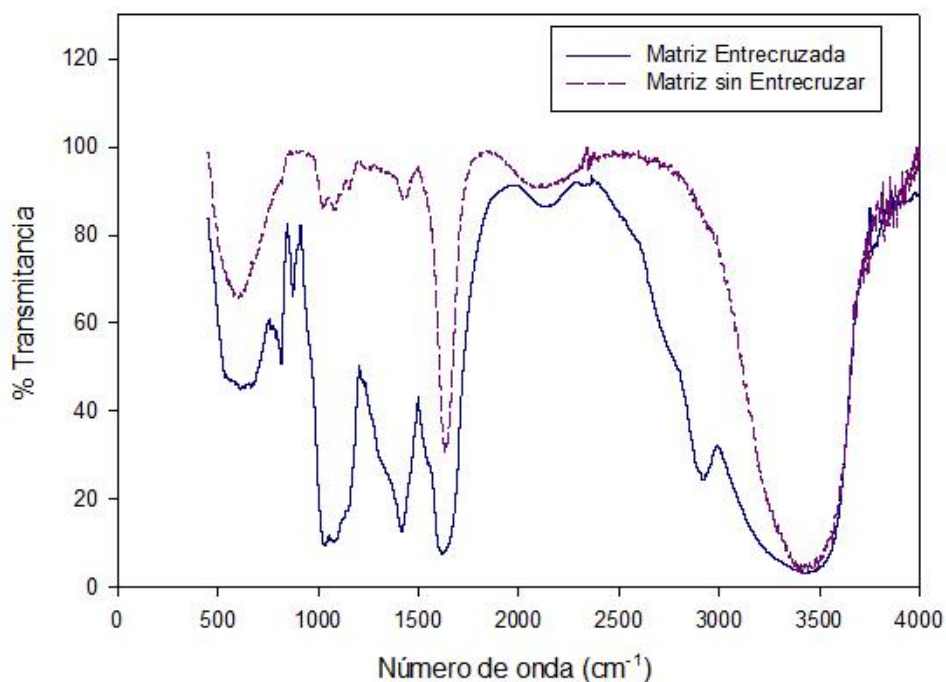


Figura 5.2: Espectros de FTIR de las esferas de Alg-GG.

La simple inspección visual de los espectros para ambas matrices permite concluir que hay un cambio en éstas al ser sometidas al tratamiento con Epi. En el espectro de la matriz sin entrecruzar se presentan solapadas las bandas características de cada uno de los polímeros [149-151]. Se observa un pico ancho y de gran intensidad a 3443 cm^{-1} que puede ser atribuido al estiramiento de los enlaces -OH presentes en ambos polímeros. Los picos alrededor de 1633 y 1422 cm^{-1} se corresponden con el estiramiento asimétrico y simétrico, respectivamente, de los -COO^- presentes en el Alg. Finalmente, los picos observados en la región del espectro comprendida entre 800 y 1200 cm^{-1} representan los modos de estiramiento de los enlaces C-C-O , C-OH y C-O-C los cuales se encuentran altamente acoplados y presentes en ambos polímeros.

Si se observa el espectro de FTIR obtenido para la matriz tratada químicamente, se observan cambios tanto en la intensidad como en el ancho de los picos presentes. Sin embargo, a los fines para los cuales se realizaron estos espectros, el pico más importante es el obtenido alrededor de 1100cm^{-1} . Dicho pico es característico de los grupos epóxido y está asociado a la deformación axial del C-O-C [55]. Puede verse que la intensidad de dicho pico se incrementa notablemente en las esferas tratadas y que el mismo se encuentra más definido en este caso.

En conjunto, los datos obtenidos al realizar las pruebas de estabilidad en diferentes medios y los espectros de FTIR de las muestras, permiten concluir que la reacción de entrecruzamiento fue efectiva ya que se observa la aparición en los espectros del pico característico del enlace epóxido y las pruebas de solubilidad demostraron que la matriz tratada es estable aún en ausencia de Ca^{2+} .

5.2- Adsorción de proteasas básicas sobre la matriz de Alg-GG tratada químicamente

Una vez obtenida la matriz y verificada su insolubilidad se estudió la adsorción de QT y Trip sobre la misma. Para ello se estudiaron diferentes variables que podrían llegar a afectar el proceso de adsorción: su cinética, isotermas de adsorción, se ensayaron diferentes condiciones de desorción de las proteínas y, finalmente, se estudió la capacidad de la matriz de ser reciclada para su uso en sucesivos procesos de adsorción-desorción.

5.2.1- Determinación de las condiciones de adsorción

Como un primer paso en el estudio de la capacidad de adsorción de la matriz, se procedió a determinar el efecto del pH y la fuerza iónica del medio de trabajo sobre la adsorción de las enzimas de interés en las esferas tratadas químicamente. Se eligió variar dichos parámetros ya que es conocido que afectan notablemente al proceso de adsorción [13, 83, 125, 152-153]. La Figura 5.3 muestra el efecto del pH sobre la adsorción de ambas proteínas en la matriz.

Puede observarse que el rendimiento de la adsorción se encuentra notablemente influenciado por el pH del buffer de trabajo. Para ambos sistemas, el pH que rinde la mayor cantidad de enzima adsorbida es de 5,00. La disminución del pH a partir de dicho valor produce una leve disminución en el valor de q_e (mg de enzima adsorbidos en el equilibrio/ g de matriz) mientras que el incremento de pH en tan sólo una unidad, a partir del valor óptimo, lleva a una dramática reducción en la cantidad de enzima adsorbida. Estos resultados apoyan la teoría de interacción electrostática planteada para la adsorción de las proteínas en estudio sobre la matriz.

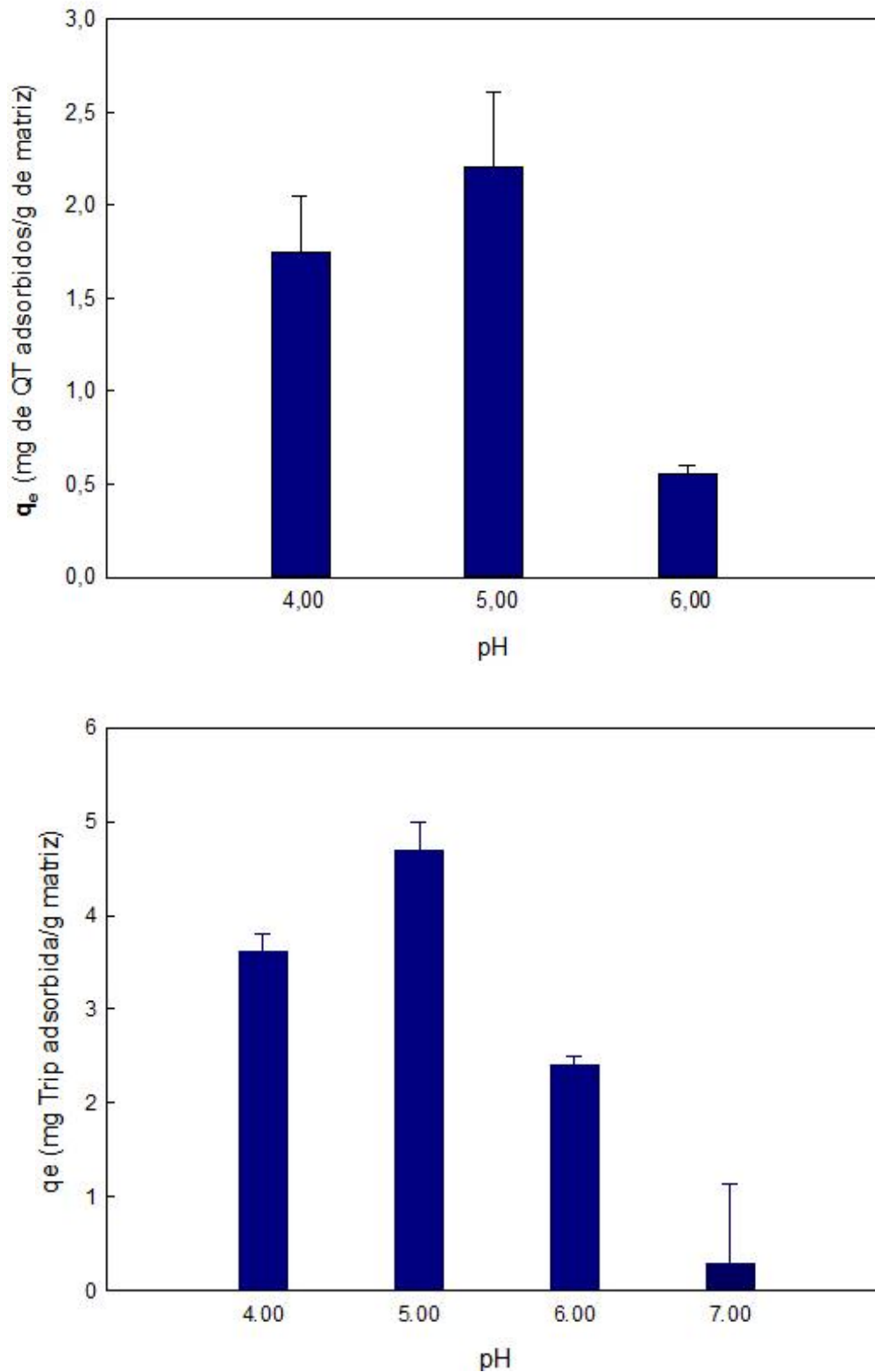


Figura 5.3: Efecto del pH en la adsorción de QT (superior) y Trip (inferior) sobre una matriz de Alg-GG. Medio Cit 25 mM. Temperatura 25 °C.

La QT y la Trip son proteínas con pI elevado (9,10 y 11,00, respectivamente) por lo cual, en el rango de pH de trabajo, ambas presentan carga eléctrica neta positiva. Sin embargo, dicha densidad de carga disminuye a medida que se incrementa el pH del medio, debido a la desprotonación de los grupos aminos cargados positivamente presentes en su estructura, lo que puede ser la razón por la cual la adsorción disminuye al incrementarse el pH del buffer de adsorción.

A pH 4,50 comienza la protonación de los grupos carboxilos pertenecientes al Alg y presentes en la matriz. Por este motivo, la carga eléctrica negativa de la misma comienza a disminuir dando como resultado una menor adsorción de las proteasas sobre su superficie.

Finalmente, con el objetivo de verificar la participación de un componente electrostático en la adsorción de QT y Trip sobre las esferas de Alg-GG, se estudió el efecto del agregado de sales al medio de trabajo sobre el rendimiento del proceso. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 5.4.

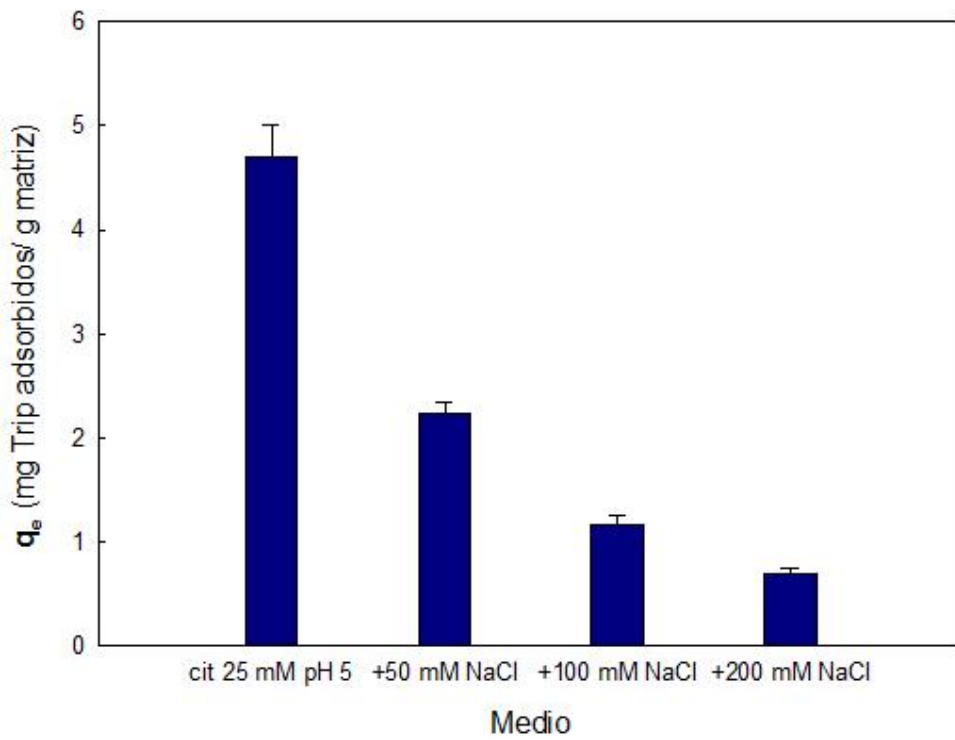
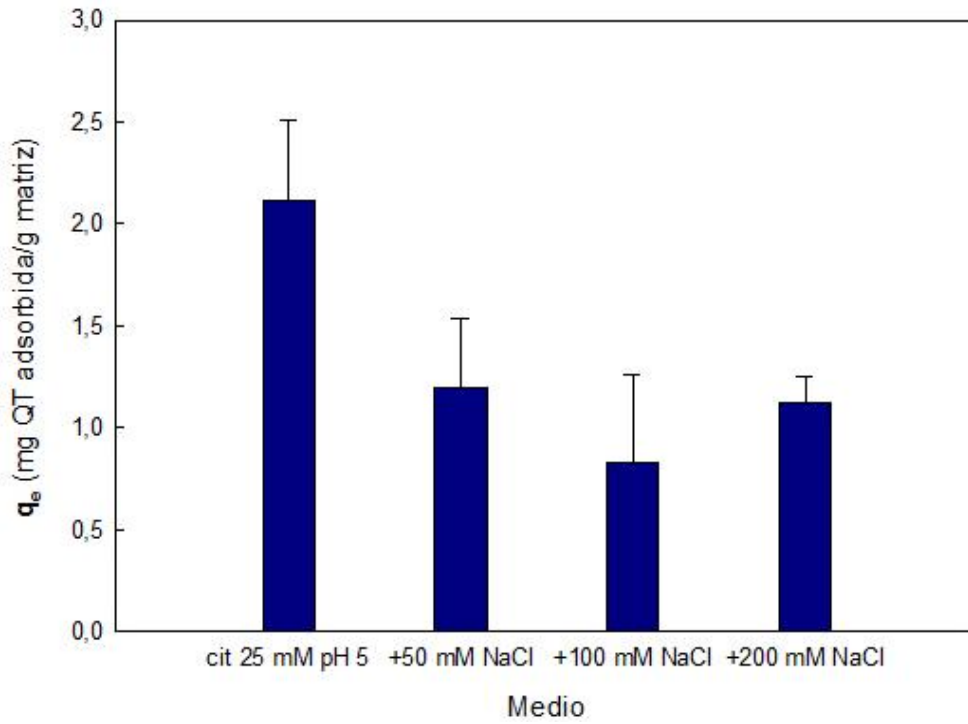


Figura 5.4: Efecto del aumento de la fuerza iónica en la adsorción de QT (superior) y Trip (inferior) sobre la matriz de Alg-GG. Medio Cit 25 mM, pH 5,00. Temperatura 25 °C.

En ambos casos se observa una disminución importante en la cantidad de enzima adsorbida, a un pH fijo, cuando se incrementa la fuerza iónica del buffer de adsorción. Al agregar 200 mM de NaCl al buffer de adsorción, la cantidad de QT enzima adsorbida disminuye un 50 % mientras que, para el caso de la Trip, disminuye un 85 %, utilizando como referencia la cantidad de enzima adsorbida en ausencia de sales. Estos resultados avalan la hipótesis de un mecanismo electrostático para la adsorción de las enzimas sobre la matriz de interés y están de acuerdo con los resultados obtenidos para la adsorción en función del pH del medio.

Es importante destacar que, en todos los casos, se realizaron los controles correspondientes y se verificó que ninguna de las condiciones utilizadas afecta negativamente la actividad catalítica de las enzimas de interés.

5.2.2- Cinética de la adsorción

La determinación de la cinética de la adsorción y el ajuste de los datos experimentales a diferentes modelos cinéticos, permiten conocer el tiempo necesario para que el sistema alcance el equilibrio y concluir acerca del tipo de adsorción y del paso limitante de la velocidad en la misma [130].

Para el estudio de la cinética de la adsorción de las enzimas sobre la matriz de Alg-GG se eligió variar diferentes parámetros que, según la bibliografía consultada, afectan la velocidad del proceso [153-155].

Los resultados obtenidos para la adsorción de QT se muestran a continuación:

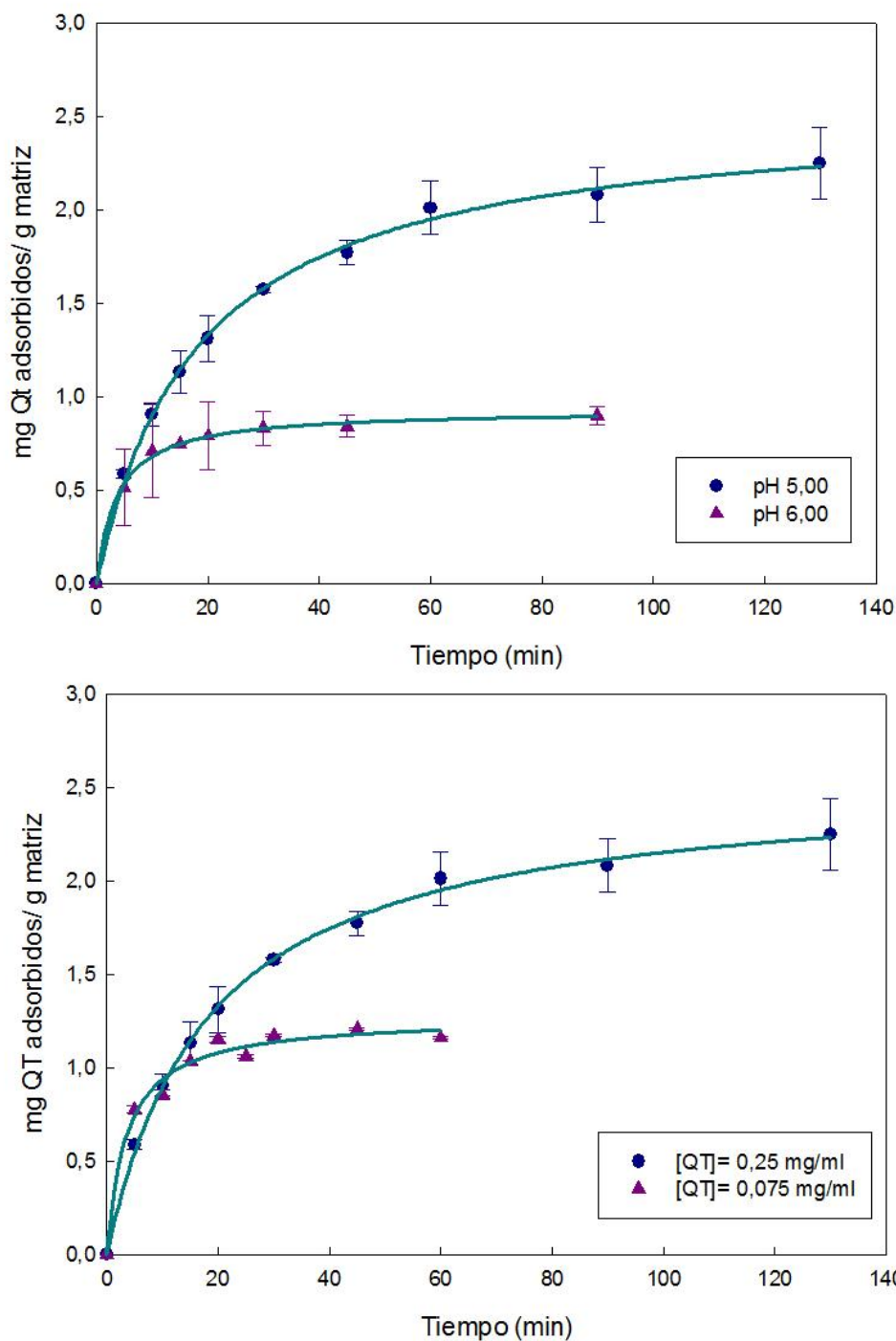


Figura 5.5: Cinética de adsorción de QT sobre la matriz de Alg-GG. Superior: En función del pH del medio, [QT]= 0,25 mg/mL. Inferior: En función de la [QT] a pH 5,00. Medio citrato 25 mM, del pH correspondiente. Temperatura 25 °C.

Puede observarse que, en todos los casos estudiados, la cinética de la adsorción es rápida alcanzando el equilibrio en menos de 1 h. Se observa una

elevada velocidad inicial que puede deberse a la gran disponibilidad de sitios de adsorción en la matriz porosa y a una buena accesibilidad a los mismos. La velocidad disminuye a medida que el sistema se acerca al equilibrio, lo que puede corresponderse con la disminución de los sitios disponibles en la matriz para la adsorción de más enzima o con un impedimento estérico para la unión de más enzima, debido a las moléculas ya unidas en la matriz. Además, se observan diferencias en el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, tanto por efecto de la concentración inicial de enzima como del pH del medio.

Los datos obtenidos fueron ajustados a los diferentes modelos cinéticos y, además, a partir de cada gráfico se obtuvo el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. Los ajustes se realizaron utilizando la forma linealizada y la no lineal de cada modelo cinético, de manera de comparar las dos metodologías de ajuste. Debido a que con ambas metodologías se obtuvieron resultados muy similares y que las conclusiones finales obtenidas no variaron al emplear uno u otro tipo de ajuste, en la tabla 5.11 se muestran sólo los resultados obtenidos aplicando el ajuste no lineal, excepto para el caso del ajuste a la ecuación de Weber-Morris la cual sólo presenta forma lineal. En el anexo I se encuentra la tabla completa con los valores obtenidos utilizando los distintos modelos cinéticos y los dos métodos de ajuste.

Tabla 5.II: Parámetros cinéticos para la adsorción de QT sobre una matriz de Alg-GG. Medio buffer Cit 25 mM. Temperatura 25 °C.

Modelo	Parámetros	pH 5,00		pH 6,00
		[QT]= 0,075 mg/mL	[QT]= 0,25 mg/mL	[QT] = 0,25 mg/mL
	Tiempo necesario para el equilibrio (min)	7	44	5
Pseudo- primer Orden	q_e (mg/g)	1,14 ± 0,03	2,13 ± 0,05	0,84±0,02
	k_1 (min ⁻¹)	0,18±0,03	(4,8±0,3).10 ⁻²	0,18±0,02
	R ²	0,9718	0,9876	0,9904
	SCE	3,265.10 ⁻²	5,485. 10 ⁻²	5,765.10 ⁻³
Pseudo- segundo Orden	q_e (mg/g)	1,3 ± 0,2	2,5 ± 0,1	0,93±0,01
	k_2 (g.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	0,21±0,03	(2,01±0,04).10 ⁻²	0,29±0,02
	h ($k_2 \cdot q_e^2$) (mg.min ⁻¹ .g ⁻¹)	0,36±0,06	0,139±0,005	0,25±0,02
	R ²	0,9828	0,9981	0,9970
	SCE	1,990.10 ⁻²	8,824 .10 ⁻³	1,785. 10 ⁻³
Weber-Morris	K_p (mg.g ⁻¹ .min ^{-0,5})	1,2±0,2	0,21±0,01	0,21±0,01
	R ²	0,9287	0,9073	0,9773
	SCE	1,789	3,154	2,276

Si se analizan los coeficientes de los ajustes (R^2 y SCE) obtenidos puede concluirse que el modelo que mejor explica los datos experimentales para todas las condiciones es el de pseudo-segundo orden, ya que es el que presenta los mayores R^2 y las menores SCE. Dicho modelo plantea como paso limitante de la velocidad a la unión del adsorbato en el adsorbente. Sin embargo, los coeficientes de regresión y la SCE obtenidos para el ajuste a la cinética de pseudo-primer orden son interesantes y permiten suponer que los datos experimentales podrían ser explicados también en base a este modelo, el cual plantea la difusión del adsorbato hacia la superficie del adsorbente como paso limitante de la velocidad.

Si se analizan los valores de las constantes de velocidad obtenidas en ambos modelos puede observarse que, a pH 6,00 y a pH 5,00 (con una concentración de QT de 0,075 mg/mL), se obtienen q_e similares y las k_2 se encuentran muy cercanas entre sí. Sin embargo, a pH 5,00 con una concentración de enzima de 0,25 mg/mL, el q_e duplica al obtenido en las demás condiciones y la constante de velocidad es diez veces menor a la obtenida en los otros casos. Esto es lógico, ya que, cuando se incrementa la concentración de QT, hay una mayor capacidad de adsorción por parte de la matriz y se requiere de más tiempo para alcanzar el equilibrio. Además, es importante notar que los q_e obtenidos a partir del ajuste de los datos a los dos modelos cinéticos concuerdan los obtenidos experimentalmente.

Los resultados obtenidos para la adsorción de Trip en función del tiempo se presentan en la Figura 5.6.

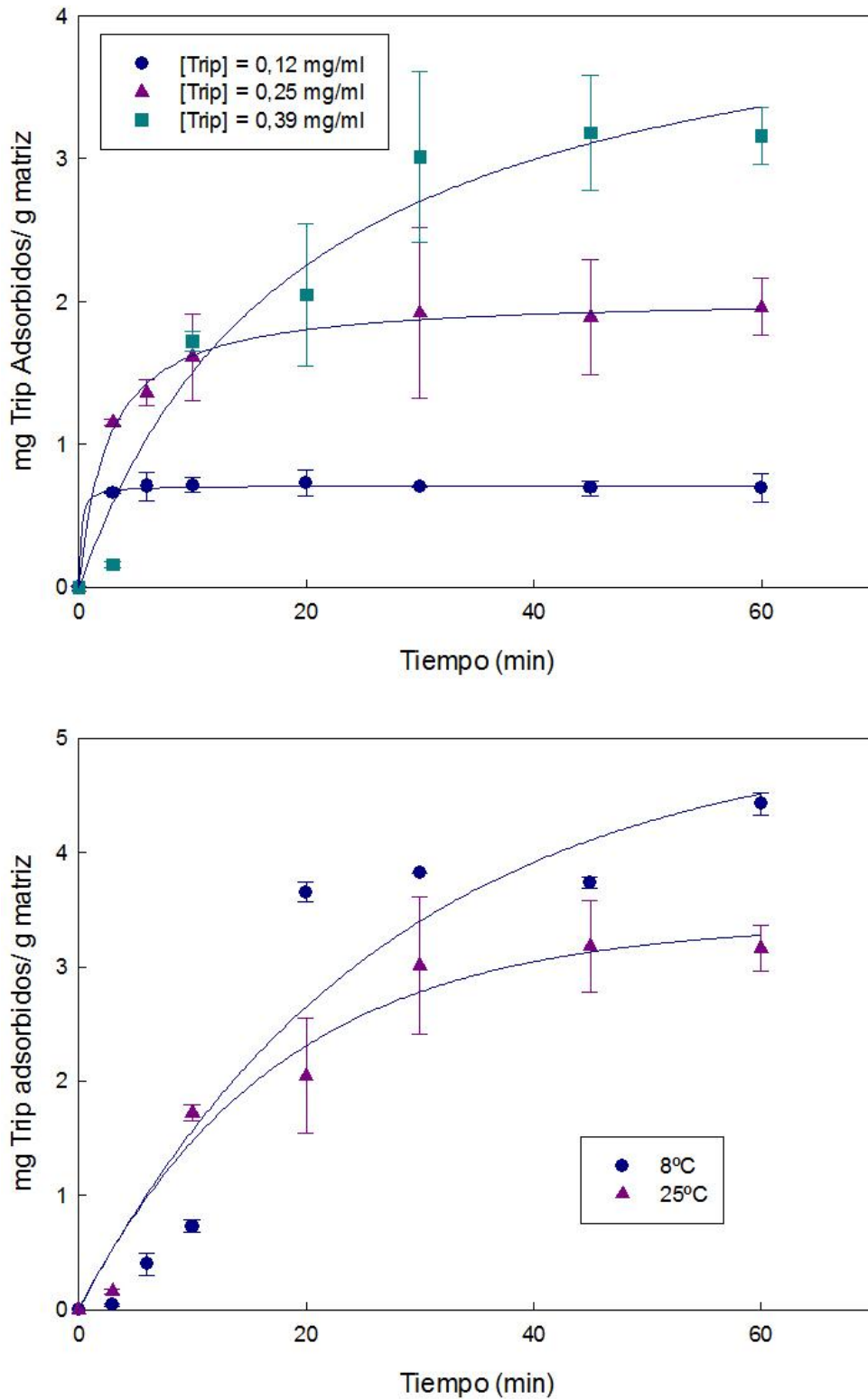


Figura 5.6: Cinética de adsorción de Trip sobre la matriz de Alg-GG. Superior: En función de la [Trip] a 25 °C Inferior: En función de la temperatura. Medio Cit 25 mM, pH 5,00.

Como se observa en la Figura 5.6, la cinética de la adsorción de Trip sobre la matriz de Alg-GG se estudió variando la concentración inicial de enzima presente en el sistema y la temperatura de trabajo. Puede verse que el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio de adsorción para esta enzima es menor a 60 min, es decir, el proceso es bastante rápido. Se observa también una velocidad inicial de adsorción elevada que disminuye cuando se está por alcanzar la saturación. Estas observaciones concuerdan con las obtenidas para la QT y se deben a la disminución de los sitios de adsorción disponibles al aumentar la cantidad de enzima unida y a impedimentos estéricos para la adsorción cuando se está por alcanzar el equilibrio, debido a la presencia de moléculas de enzima ya unidas.

La tabla 5.III muestra los resultados obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales a los diferentes modelos cinéticos utilizando el método de ajuste no lineal, excepto para el modelo de Weber-Morris. En el anexo II se presenta la tabla completa con los parámetros obtenidos utilizando el método de ajuste lineal y no lineal.

Tabla 5.III: Parámetros cinéticos para la adsorción de Trip sobre una matriz de Alg-GG. Medio buffer Cit 25 mM, pH 5,00.

Modelo	Parámetros	25 °C			1°C
		[Trip]= 0,12 mg/mL	[Trip]= 0,25 mg/mL	[Trip] = 0,39 mg/mL	[Trip]= 0,39 mg/mL
	Tiempo necesario para el equilibrio (min)	6	15	30	40
Pseudo- primer orden	q_e (mg/g)	0,7±0,1	1,89±0,05	3,4±0,3	5±1
	k_1 (min ⁻¹)	0,9±0,1	0,25±0,03	(6±1).10 ⁻²	(4±2).10 ⁻²
	R ²	0,9976	0,9984	0,9695	0,9015
	SCE	1,038 .10 ⁻³	5,671.10 ⁻²	0,3401	2,647
Pseudo- segundo orden	q_e (mg/g)	0,7±0,4	2,0±0,2	5±1	7±1
	k_2 (g.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	9 ± 4	0,21±0,02	(1,3±0,1).10 ⁻²	(3±1).10 ⁻³
	h ($k_2.q_e^2$) (mg.min ⁻¹ .g ⁻¹)	4 ± 2	0,39±0,03	0,23±0,05	0,2±0,1
	R ²	0,9959	0,9864	0,9623	0,8931
	SCE	1,741.10 ⁻³	8,024 .10 ⁻²	0,4203	2,874
Weber- Morris	K_p (mg.g ⁻¹ .min ^{-0,5})	0,7±0,3	1,03 ± 0,06	0,48±0,07	0,3 ± 0,2
	R ²	0,8943	0,9874	0,9203	0,8564
	SCE	3,404.10 ⁻³	0,1321	0,8896	3,923

Si se analizan los resultados obtenidos, puede concluirse que la adsorción de Trip sobre la matriz sigue una cinética de pseudo-primer orden. Dicho modelo asume como paso limitante del proceso de adsorción a la difusión del adsorbato desde el seno de la solución hacia la superficie de la matriz. Los ajustes a dicho modelo no sólo presentan el mayor R^2 y la menor SCE, sino que también dan como resultado los mismos valores de q_e que se observan experimentalmente. El modelo de pseudo-segundo orden también presenta coeficientes de regresión interesantes pero, en este caso, los q_e obtenidos a partir del ajuste presentan diferencias con los obtenidos experimentalmente. El modelo de Weber-Morris, por su parte, no muestra un buen ajuste de los datos en ninguna de las condiciones ensayadas, indicando que la cinética del proceso de adsorción de Trip sobre la matriz no se encuentra limitada por la difusión intra-partícula del adsorbato.

Si se analizan las constantes de velocidad obtenidas, se observa que las mismas disminuyen con el incremento en la concentración inicial de enzima, lo que concuerda con los resultados obtenidos por otros autores para la adsorción de iones [67, 130, 153]. Además, puede concluirse que la variación de la temperatura de trabajo no produce efecto en dicha constante, por lo menos en el rango estudiado.

5.2.3- Isotermas de adsorción

Una vez determinada la mejor condición para realizar la adsorción de las proteínas en estudio y la cinética del proceso, se procedió a realizar las isotermas de adsorción. Las mismas son la representación gráfica de la relación entre la cantidad de adsorbato adsorbido por unidad de masa de adsorbente y la cantidad de adsorbato remanente en el medio de adsorción, a temperatura constante y bajo condiciones de equilibrio. A partir de la realización de las isotermas de adsorción se puede obtener información sobre la distribución del adsorbato entre la fase líquida y sólida a diferentes condiciones de equilibrio [59]. Por otro lado, existen diferentes modelos teóricos y empíricos para el ajuste de los datos experimentales, de manera de obtener los parámetros de equilibrio y termodinámicos del proceso de adsorción [58, 93, 156].

La Figura 5.7 muestra los datos experimentales y el ajuste de los mismos al modelo de isoterma de Hill para el sistema QT-Alg-GG mientras que la tabla 5.IV muestra los parámetros obtenidos a partir del ajuste matemático de dichos datos a los diferentes modelos de isotermas. Es importante destacar que, por razones de simplicidad, en la gráfica se muestra sólo el ajuste que presentó mayor correlación con los datos experimentales. Como se detalló previamente, como mejor ajuste se consideró a aquel que presentó R^2 más cercano a la unidad y una menor SCE.

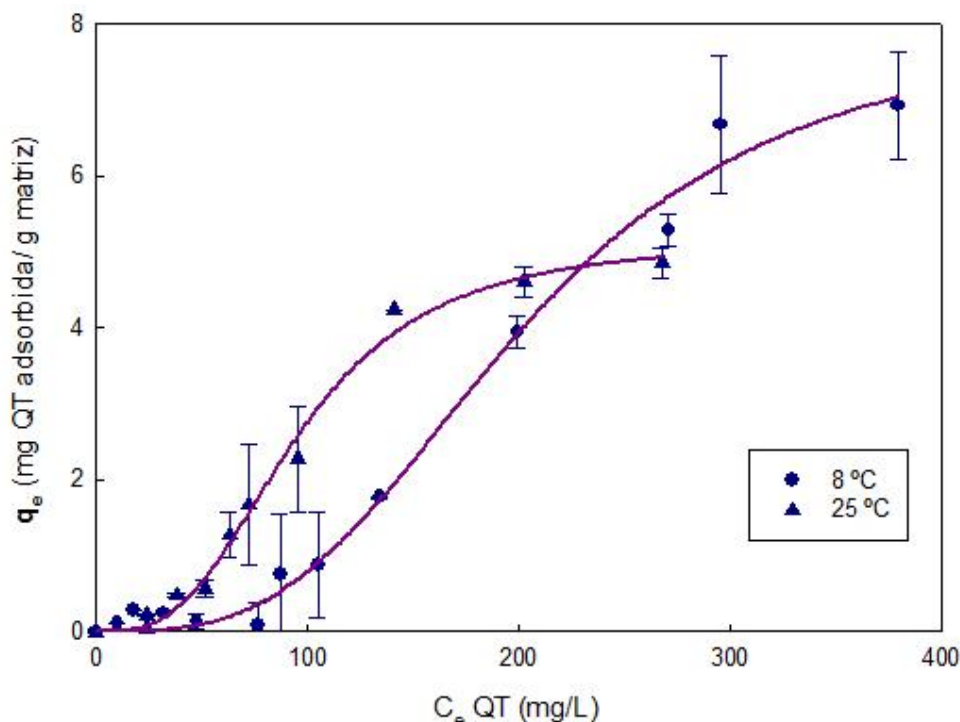


Figura 5.7: Isoterma de adsorción de QT sobre la matriz de Alg-GG. Medio Cit 25 mM, pH 5,00. Temperatura 8 y 25 °C.

Una simple inspección visual de los datos obtenidos permite concluir que el proceso de adsorción presenta, en este caso, una tendencia sigmoidea. Cuando la concentración de QT presente es baja la adsorción es casi nula pero, a medida que se incrementa la concentración de enzima presente en el medio, se produce un aumento en la cantidad de QT adsorbida sobre la matriz. Por otro lado, la capacidad de adsorción de la matriz se incrementa levemente cuando se disminuye la temperatura de trabajo: el $Q_{máx}$ a 25 °C es de 4,76 mg QT/ g matriz mientras que, a 8 °C, dicho valor es de 6,97 mg QT/ g matriz. Esto puede deberse al incremento de las interacciones de tipo inespecíficas al disminuir la temperatura. La bibliografía consultada avala los resultados obtenidos: en la mayoría de los sistemas no se encuentran variaciones significativas en la capacidad de adsorción al variar la temperatura de trabajo en el rango de 10 a 40°C; cuando se trabaja a temperaturas

mayores, sin embargo, se observan incrementos significativos en la capacidad de adsorción [125, 155]. En este caso no se trabajó a temperaturas más elevadas ya que las mismas producen el pasaje de las proteínas desde su forma nativa a la parcialmente desnaturizada o desnaturizada, por lo que comienzan a exponerse zonas de la macromolécula que inicialmente se encontraban ocultas al solvente lo que puede modificar la calidad, tipo y cantidad de la interacción.

La tabla 5.IV presenta los resultados obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales a los modelos de isotermas seleccionados.

Tabla 5.IV: Parámetros del ajuste de los datos experimentales empleando modelos de isotermas de dos y tres parámetros para el proceso de adsorción de QT sobre la matriz de Alg-GG.

Isoterma	Parámetros	8 °C	25 °C
<i>Langmuir</i>	Q_0 (mg/g)	17 ± 3	26 ± 5
	K_L (L/mg)	$(7 \pm 4) \cdot 10^{-4}$	$(0,9 \pm 1) \cdot 10^{-3}$
	R^2	0,9393	0,9237
	SCE	5,106	2,718
<i>Freundlich</i>	n	0,75 ± 0,08	1,1 ± 0,2
	K_F (L/g)	$(3 \pm 2) \cdot 10^{-3}$	$(3 \pm 2) \cdot 10^{-2}$
	R^2	0,9554	0,9157
	SCE	3,765	3,005
<i>Hill</i>	K_D	201 ± 15	96 ± 5
	q_{SH}	8,0 ± 0,7	5,4 ± 0,2
	n_H	3,1 ± 0,4	3,0 ± 0,3
	R^2	0,9915	0,9921
	SCE	0,7561	0,2829

Los datos experimentales, a ambas temperaturas, presentaron el mejor ajuste matemático al modelo de isoterma de Hill (ecuación 7). Dicho modelo plantea a la

adsorción como un proceso cooperativo, en el que la unión del ligando modifica la afinidad del resto de los sitios de unión del adsorbente [59]. El mismo posee tres parámetros importantes: q_{SH} (mg/g) es la máxima capacidad de adsorción de la matriz, K_D es la constante de Hill y n_H es el coeficiente de cooperatividad de Hill.

Con los valores obtenidos a partir del ajuste matemático de los datos, puede concluirse que la cooperatividad del proceso de adsorción de QT sobre la matriz de Alg-GG no se ve modificada con la variación de la temperatura de trabajo, ya que los n_H son constantes. Además, ambos valores son mayores a 1 lo que indica una cooperatividad positiva: la unión de la enzima a la matriz incrementa la afinidad de esta última para la unión del resto de las moléculas de enzima. La capacidad de adsorción de la matriz (q_{SH}) es mayor a 8°C y, para ambas temperaturas, el valor obtenido a partir del ajuste concuerda con el valor observado experimentalmente.

La Figura 5.8 muestra las isotermas de adsorción obtenidas para la Trip sobre la matriz de Alg-GG y el ajuste de los mismos al modelo de isoterma de Hill, mientras que la tabla 5.V muestra los valores obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales a los diferentes modelos de isotermas.

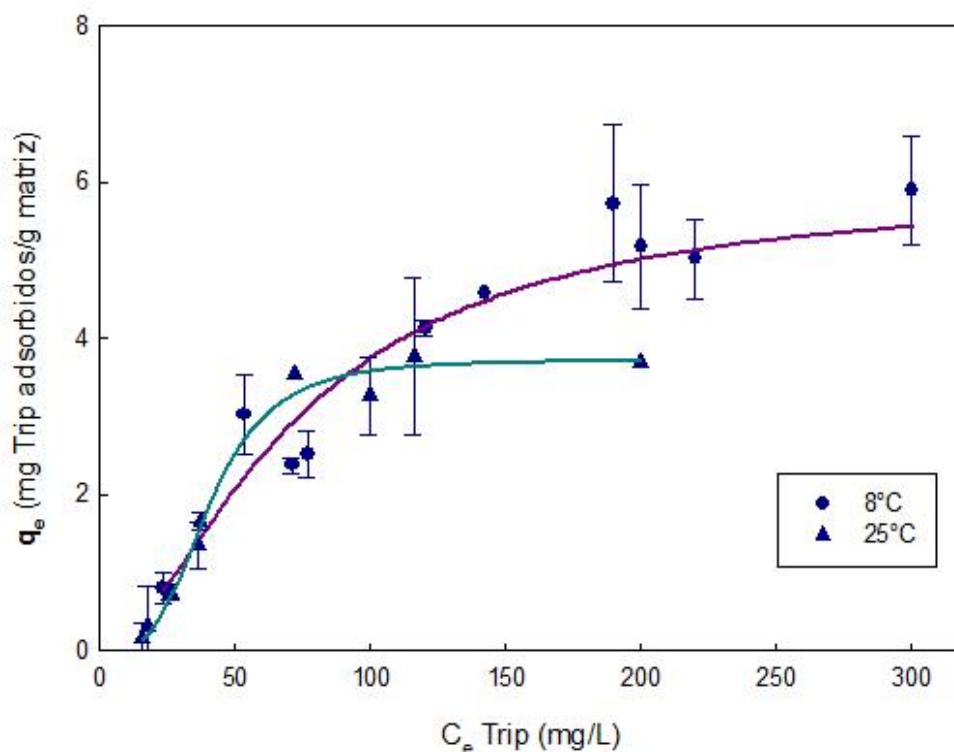


Figura 5.8: Isotherma de adsorción de Trip sobre la matriz de Alg-GG. Medio Cit 25 mM, pH 5,00. Temperatura 8 y 25 °C.

El comportamiento de los datos experimentales para este sistema no presenta una tendencia tan definida como la observada en la adsorción de QT. La capacidad de adsorción de Trip por la matriz se incrementa exponencialmente con el aumento de la concentración de enzima presente en el medio, hasta alcanzar la saturación a elevadas concentraciones de enzima. La máxima capacidad de adsorción de la matriz de Alg-GG para esta enzima fue ligeramente mayor a 8°C ($Q_{\text{máx}} = 5,2$ mg/g) que a 25°C ($Q_{\text{máx}} = 3,5$ mg/g). Esto puede deberse, al igual que para el caso de la adsorción de QT, al incremento en las interacciones inespecíficas al disminuir la temperatura. No se trabajó a mayores temperaturas debido al riesgo de desnaturalización de la enzima, como ya se explicó anteriormente.

Tabla 5.V: Parámetros del ajuste de los datos experimentales a modelos de isotermas de dos y tres parámetros para el proceso de adsorción de Trip sobre la matriz de Alg-GG.

Isoterma	Parámetros	8 °C	25 °C
<i>Langmuir</i>	Q_0 (mg/g)	4±2	7 ± 2
	K_L (L/mg)	(1,1 ± 0,3).10 ⁻²	(8 ± 5). 10 ⁻³
	R ²	0,8789	0,8668
	SCE	3,071	2,434
<i>Freundlich</i>	n	2 ± 3	5 ± 1
	K_F (L/g)	0,34 ± 0,08	0,6 ± 0,2
	R ²	0,7544	0,7955
	SCE	6,199	3,734
<i>Hill</i>	K_D	72 ± 12	40 ± 3
	q_{SH}	5,9 ± 0,5	3,7 ± 0,2
	n_H	1,7 ± 0,5	3,5 ± 0,8
	R ²	0,9138	0,9850
	SCE	2,175	0,2227

Los resultados presentados en la tabla 5.V permiten concluir que la adsorción de Trip sobre la matriz de Alg-GG puede ser explicada siguiendo el modelo de isoterma de Hill es decir, el proceso en este caso es cooperativo al igual que lo observado para la adsorción de QT sobre la misma matriz. Los parámetros obtenidos a partir del ajuste matemático de los datos experimentales permiten sacar varias conclusiones. En primer lugar, la máxima capacidad de adsorción de la matriz, expresada como q_{SH} , es mayor a 8°C que a 25°C y, además, los valores obtenidos a partir del ajuste concuerdan con los obtenidos experimentalmente. La cooperatividad del proceso es del tipo positiva a ambas temperaturas y aumenta con el incremento de la temperatura de trabajo.

Por otra parte, si se comparan los parámetros obtenidos para ambas enzimas en las dos condiciones de trabajo, puede concluirse que la matriz es más efectiva en la unión de QT que de Trip ya que, para la primera, presenta un mayor q_{SH} .

Finalmente, para cada sistema, se realizó el cálculo de las constantes de equilibrio termodinámico K_o (ecuación 24) y, a partir de las mismas, se calcularon los parámetros termodinámicos del proceso de adsorción de las enzimas [93]. Los cálculos se realizaron utilizando las ecuaciones fundamentales de la termodinámica de los sistemas en equilibrio (ecuaciones 19, 21 y 25) y se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 5.VI: Parámetros termodinámicos para la adsorción de QT y

Trip sobre la matriz de Alg-GG. Medio Cit 25 mM pH 5,00.

Sistema	QT		Trip	
Parámetro	8°C	25°C	8°C	25°C
K_o	$1,8 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,1$	$1,06 \pm 0,02$	$1,58 \pm 0,01$
ΔH^0 (Kcal/mol)	$3,3 \pm 0,4$		$3,91 \pm 0,07$	
ΔS^0 (cal/K.mol)	13 ± 2		$13,1 \pm 0,2$	
ΔG^0 (cal/mol)	-318 ± 35	-537 ± 21	$-32,5 \pm 0,6$	-271 ± 2

Los resultados obtenidos permiten concluir que el proceso de adsorción de ambas enzimas sobre la matriz está entrópicamente conducido, ya que, el valor positivo obtenido para el cambio de entropía en los sistemas contribuye a que el cambio en la energía libre del sistema sea negativa. El cambio de entalpía del

sistema es positivo indicando un proceso endotérmico para la adsorción de ambas enzimas sobre la matriz.

En conclusión, es la desestructuración del agua ordenada alrededor de la matriz y de la enzima la que hace que el proceso de adsorción sea espontáneo.

5.2.4- Determinación de las condiciones y la cinética de desorción

Cuando se desea optimizar un protocolo de adsorción de proteínas con el objetivo de purificarlas, la desorción de la enzima del adsorbente es casi tan importante como su adsorción ya que la misma permite recuperar la proteína nuevamente en solución y da la posibilidad de regenerar la matriz para un nuevo ciclo de adsorción.

Tomando como base los resultados obtenidos, se estudió la desorción de cada una de las enzimas variando factores que influyen notablemente en el proceso de adsorción de las mismas: el pH y la fuerza iónica del medio.

La tabla 5.VII muestra los porcentajes de desorción alcanzados para la QT en los diferentes buffers de desorción testeados.

Tabla 5.VII: Porcentaje de QT recuperada utilizando diferentes medios para la desorción.

Temperatura 25 °C

Condición	Porcentaje de QT recuperada
Buffer P _i 25 mM pH 7,00	42 ± 3
Buffer P _i 25 mM pH 7,00 + 150 mM NaCl	45 ± 4
Buffer P _i 25 mM pH 7,00 + 300 mM NaCl	50 ± 1
Buffer P _i 25 mM pH 7,00 + 500 mM NaCl	81 ± 4
Buffer P _i 25 mM pH 7,00 + 750 mM NaCl	80 ± 2

Puede concluirse que el mejor buffer de desorción es el P_i 25 mM pH 7,00 con el agregado de 500 mM de NaCl, con el cual se obtiene un 81 ± 3 % de proteína desorbida. Es importante destacar que con la adición de 750 mM de NaCl al buffer se obtiene el mismo porcentaje de desorción, pero se eligió el medio con menor fuerza iónica por dos razones: en primer lugar, porque el aumento de la concentración de NaCl disminuye la estabilidad en el tiempo de la QT y, en segundo lugar, si el proceso desea ser aplicado industrialmente el objetivo es que tenga el menor costo posible por lo que la utilización de una menor cantidad de sal es lo más adecuado.

Tabla 5.VIII: Porcentaje de Trip recuperada en los diferentes medios de desorción analizados. Temperatura 25 °C

Condición	Porcentaje de Trip recuperada
Buffer P _i 25 mM pH 7,00	11 ± 1
Buffer P _i 25 mM pH 7,00 + 100 mM NaCl	17 ± 5
Buffer P _i 25 mM pH 7,00 + 500 mM NaCl	25 ± 1
Buffer P _i 25 mM pH 7,00 + 750 mM NaCl	33 ± 4
Buffer Pi 25 mM pH 7,00 + 20 %P/V propilenglicol	32 ± 3
Buffer Pi 25 mM pH 7,00 + 20 %P/V propilenglicol + 300 mM NaCl	59 ± 3
Buffer Pi 25 mM pH 7,00 + 20 %P/V propilenglicol + 500 mM NaCl	76 ± 1
Buffer Pi 25 mM pH 7,00 + 20 %P/V propilenglicol + 750 mM NaCl	66 ± 2
Buffer Tris-HCl 100 mM pH 8,20	6 ± 1
Buffer Tris-HCl 100 mM pH 8,20 + 500 mM NaCl	42 ± 3
Buffer Tris-HCl 100 mM pH 8,20 + 750 mM NaCl	30 ± 3
Buffer Tris-HCl 100 mM pH 8,20 + 1 M NaCl	34 ± 4

Cuando se estudió la desorción de Trip (tabla 5.VIII), se supuso que el incremento del pH y la fuerza iónica del medio serían suficientes para lograr un buen porcentaje de recuperación, ya que para el caso de la QT dicha variación funcionó perfectamente. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran lo contrario. Si bien el incremento del pH y la fuerza iónica del medio produjeron la liberación de parte de la enzima adsorbida, los porcentajes de recuperación obtenidos fueron muy bajos.

El mejor medio para realizar la desorción de la Trip fue buffer Pi 25 mM pH 7,00 con la adición de 20 %P/V de propilenglicol y 500 mM de NaCl, medio con el que se obtiene un 76 % de enzima recuperada. Si se analizan todos los resultados mostrados puede concluirse que se observa un efecto sinérgico en el proceso de elución por la adición de propilenglicol al medio. Éste, por sí mismo, no provoca la elución de la Trip, es su adición al buffer que contiene NaCl lo que favorece la desorción, evidenciando la existencia en simultáneo de interacciones electroestáticas e hidrofóbicas en el proceso de adsorción.

Una vez determinadas las mejores condiciones para la desorción de cada una de las enzimas se determinó el tiempo necesario para alcanzar la máxima cantidad de enzima desorbida. La Figura 5.9 presenta los resultados obtenidos.

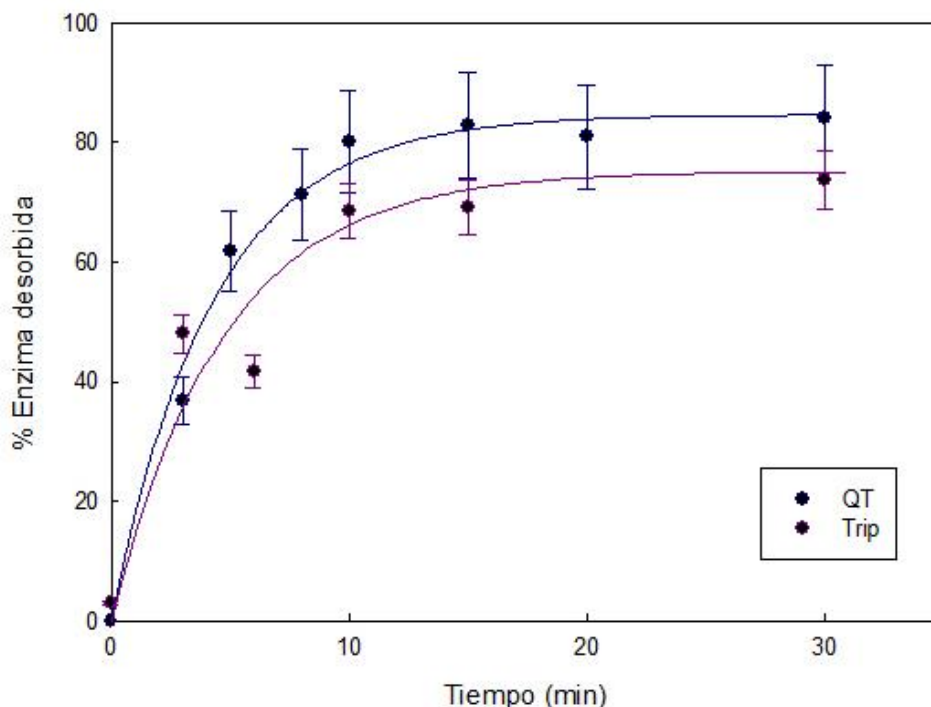


Figura 5.9: Cinética de la desorción de QT y Trip de la matriz de Alg-GG.

QT: Medio Pi 25 mM pH 7,00 + 500 mM NaCl; Trip: Medio Pi 25 mM pH 7,00 + 20 %P/V Propilenglicol + 500 mM NaCl. Temperatura 25 °C.

En ambos casos se observa que la desorción es rápida, alcanzando el equilibrio luego de los 9 min de incubación para el caso de la QT y de 12 min para el caso de la Trip.

Es importante aclarar que se realizaron los controles de actividad correspondientes y ninguna de las condiciones utilizadas para la desorción afecta la actividad de las enzimas de trabajo en un período de tiempo incluso superior al requerido para alcanzar el equilibrio de desorción (datos no mostrados).

5.2.5- Efecto del protocolo sobre las enzimas

Cuando se desarrolla un protocolo de bioseparación uno de los principales cuidados que se debe tener es que ninguno de los pasos utilizados para la purificación afecte negativamente la actividad enzimática o la estructura de la enzima

de interés. Como se detalló anteriormente, ninguna de las condiciones utilizadas para realizar la adsorción y la desorción afectan la actividad enzimática de las proteasas estudiadas. Esto permite suponer que el protocolo no afecta la estructura de las enzimas, al menos alrededor del sitio activo de las mismas.

Con el objetivo de obtener más información, se realizaron los espectros de emisión de fluorescencia de las proteínas antes de comenzar la adsorción y luego de finalizada la desorción. No se observaron cambios en la longitud de onda del máximo de emisión en ninguno de los casos, lo que permite concluir que el proceso de adsorción-lavado-desorción no afecta el microentorno de los residuos de Triptófano presentes en la QT ni en la Trip. La Figura 5.10 muestra los espectros de emisión obtenidos para la Trip, la QT presentó una tendencia similar (datos no mostrados).

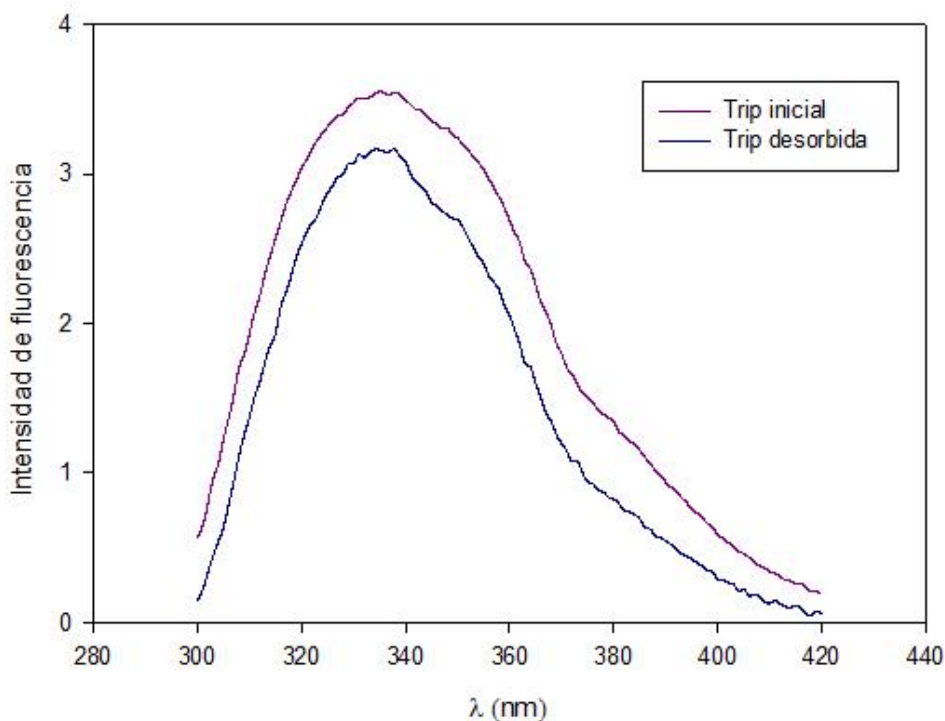


Figura 5.10: Espectros de emisión de Trip antes y después de la adsorción. Medio: inicial: Cit 25 mM pH 5,00; Final: Pi 25 mM pH 7 + 500 mM NaCl+20 %P/V propilenglicol. Temperatura 25 °C.

5.2.6- Reutilización de la matriz

Finalmente, todos los resultados obtenidos se aplicaron a la realización de sucesivos ciclos de adsorción/lavado/desorción utilizando la misma matriz. El objetivo de este paso es determinar si es posible utilizar repetidas veces la misma matriz, sin que pierda su capacidad de adsorción. A continuación se presentan los resultados obtenidos:

Tabla 5.IX: Porcentaje de QT y Trip adsorbidos en diferentes ciclos de utilización de la matriz. Medio buffer Cit 25 mM pH 5,00. Temperatura 25 °C

Ciclo	% QT adsorbido	% Trip adsorbido
1	58 ± 4	87 ± 8
2	64 ± 1	83 ± 4
3	61 ± 3	89 ± 9
4	59 ± 4	77 ± 6
5	65 ± 3	79 ± 6

Puede concluirse que la matriz puede ser reutilizada por 5 ciclos sin pérdidas importantes en su capacidad de adsorción. A partir del quinto ciclo la matriz comienza a romperse, lo que dificulta su utilización.

Estos resultados son interesantes ya que la posibilidad de utilizar repetidas veces el mismo adsorbente disminuye no sólo los costos de la purificación, sino también la cantidad de desechos producidos.

5.3- Aplicación de los resultados obtenidos

Para finalizar, se procedió a aplicar los resultados obtenidos anteriormente a la purificación de ambas enzimas a partir de una fuente natural de obtención de las mismas: el páncreas bovino.

La adsorción se realizó trabajando en medio a pH 5,00 y la desorción se llevó a cabo, para el caso de la QT, con buffer Pi 25 mM pH 7,00 + 500 mM de NaCl y, para el caso de la Trip, con buffer Pi 25 mM pH 7,00 + 20 % P/V de propilenglicol + 500 mM de NaCl. El Hmg utilizado fue preparado como se indicó en la sección 3.3.9.1 y fue activado en ausencia de Ca^{2+} . La temperatura elegida para trabajar fue 25 °C.

5.3.1- Determinación de la relación Hmg/masa de matriz a utilizar

Si bien mediante la realización de las isotermas de adsorción se pudo determinar la máxima capacidad de adsorción de la matriz frente a una determinada cantidad de cada una de las enzimas, esos resultados no son directamente aplicables a la purificación de las proteínas a partir del Hmg. Esto se debe a la presencia, en el Hmg de páncreas, de otras proteínas y restos celulares que también pueden interaccionar con la matriz y disminuyen los sitios de adsorción disponibles para las enzimas de interés.

Para conocer la relación adecuada entre la cantidad de Hmg y de matriz a utilizar, se realizó la adsorción en batch de 1 ml de Hmg con cantidades crecientes de matriz y se midió actividad QT y Trip al inicio y luego de transcurridas dos horas de adsorción.

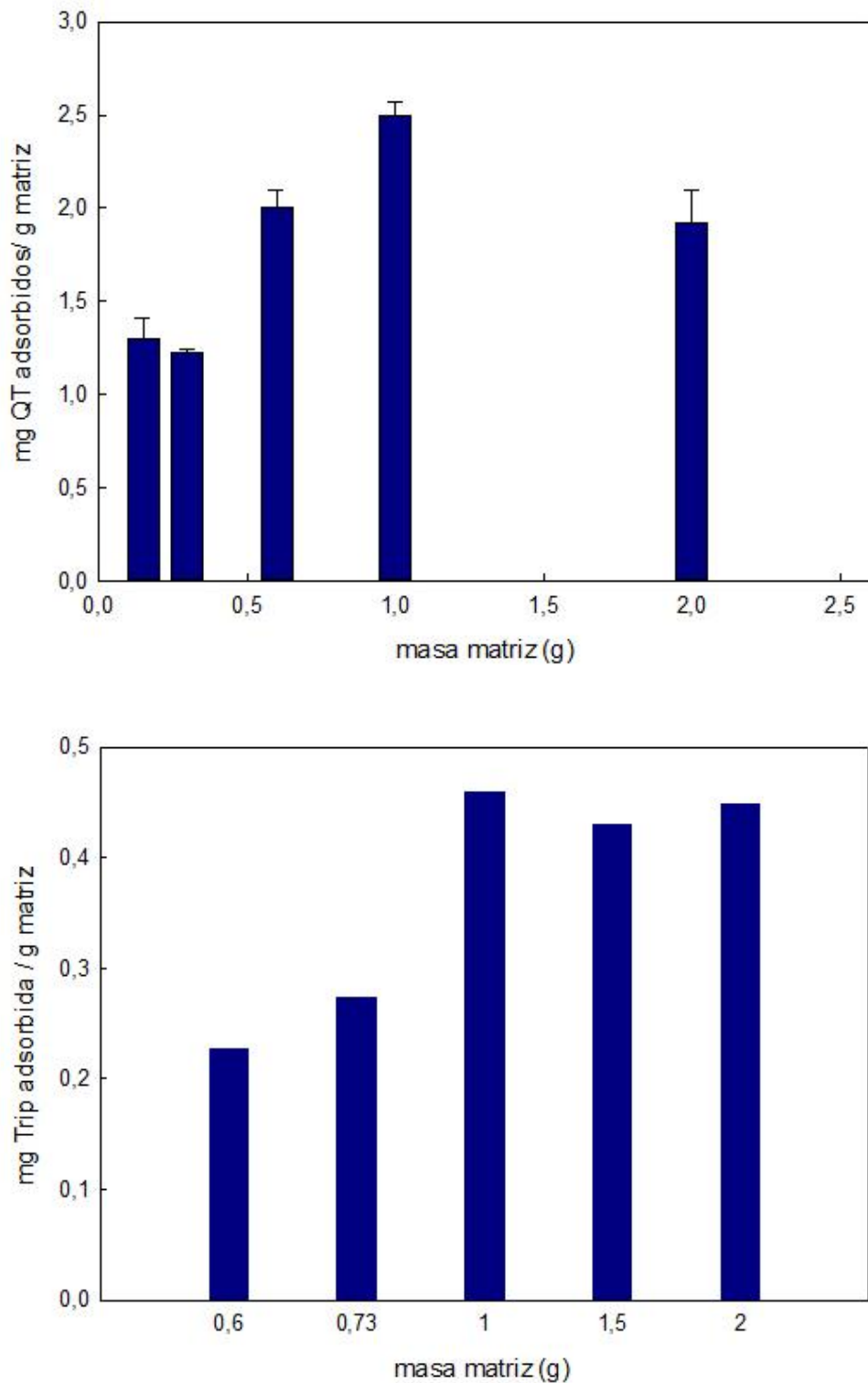


Figura 5.11: Determinación de la relación Hmg/matriz a utilizar para la purificación de QT (superior) y Trip (inferior) a partir de un Hmg de páncreas bovino. Medio Cit 25 mM pH 5,00. Temperatura 25 °C.

A partir de los resultados mostrados en la Figura 5.11 puede concluirse que, para ambas enzimas, la relación que rindió los mejores resultados fue la de 1ml de Hmg/ g matriz. Al aumentar dicha relación, para el caso de la QT, la cantidad de enzima adsorbida disminuye y, para el caso de la Trip, se mantiene constante. En base a estos resultados las siguientes adsorciones se llevaron a cabo con una relación 1ml de Hmg: 1 g de matriz, considerando que a partir de la misma el incremento en la cantidad de matriz no genera una mayor adsorción de proteína.

Por otro lado, es notable la diferencia en la capacidad de adsorción de la matriz con ambas enzimas. Al trabajar con las proteínas puras se había observado una mayor capacidad de adsorción de la matriz para la QT comparada con la Trip. La tendencia observada se mantiene al trabajar con Hmg pero la diferencia es mucho mayor: la capacidad de adsorción de QT por gramo de matriz es cinco veces mayor que la de Trip. Esto puede deberse a la gran cantidad de contaminantes presentes en el Hmg, pero también es importante destacar que la parte básica del trabajo se realizó con Trip porcina y ahora se está trabajando con un Hmg de páncreas bovino lo que puede ser una de las razones de la diferencia en el comportamiento del sistema.

5.3.2- Cinética de la adsorción y desorción

Se espera que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio en el sistema compuesto por el Hmg de páncreas y la matriz sea diferente que el de las enzimas puras, debido a la presencia de otras proteínas y macromoléculas capaces de interactuar con la matriz, que disminuyen los sitios disponibles y que, además,

dificultan el acceso de la enzima a la misma. Por otra parte, los resultados obtenidos anteriormente demostraron que el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio depende de la concentración de enzima presente en el medio, por lo que es necesario estudiar la cinética para este caso en particular. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.12.

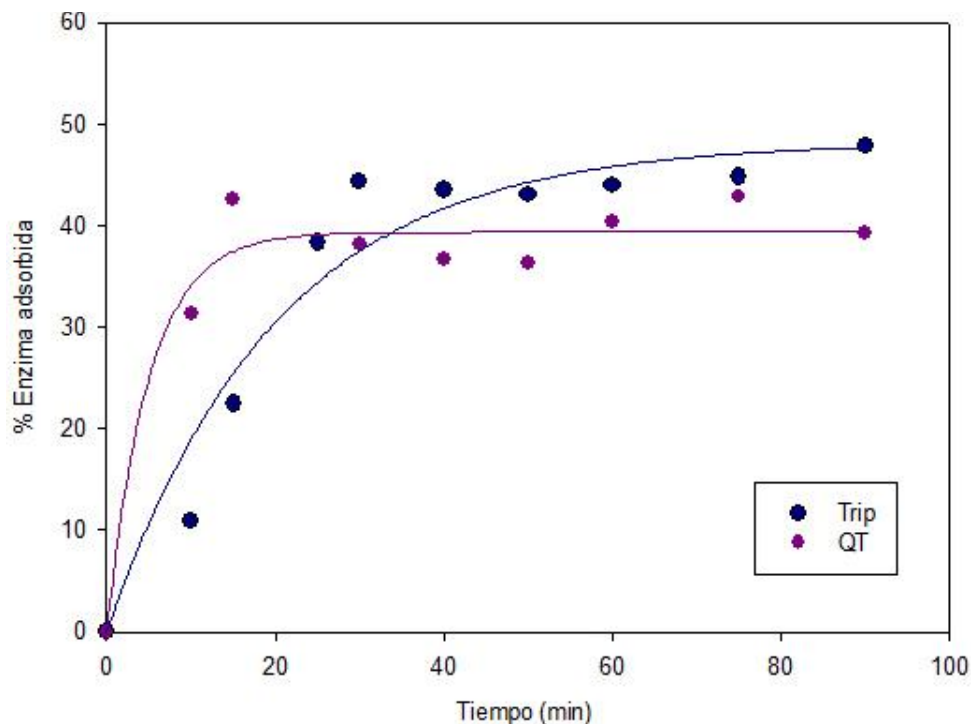


Figura 5.12: Cinética de adsorción de QT y Trip a partir del Hmg de páncreas bovino. Medio Cit 25 mM pH 5,00. Temperatura 25 °C.

Se puede concluir, a partir de los datos experimentales, que la adsorción a partir del Hmg es rápida alcanzando el equilibrio en menos de 30 min. Para la adsorción de QT se alcanza la saturación a los 16 min de comenzado el proceso mientras que para la Trip requiere de 30 min para alcanzar el equilibrio.

En cuanto a la desorción, se realizó utilizando las mejores condiciones obtenidas anteriormente y se midió el tiempo requerido para alcanzar la máxima cantidad de proteína desorbida. Se obtuvo un 30 % de recupero de la Trip total de

Hmg adsorbida, un valor bastante inferior al conseguido con la proteína pura (75 %). A su vez, el tiempo requerido para la desorción fue de 1 hr. Como se mencionó previamente, esta disminución en la eficiencia del proceso de purificación se debe a la presencia de otras proteínas que también serán adsorbidas por la matriz y disminuirán el recupero de Trip.

Para el caso de la QT, se obtuvo un 75 % de desorción en tan solo 15 min. El valor de desorción obtenido es similar al obtenido con la enzima pura (81 %), lo que permite concluir que en este caso no hay efecto negativo de los contaminantes presentes en el medio de trabajo para la recuperación de la enzima de interés.

5.3.3- Eficiencia del proceso de purificación

En conjunto, los resultados obtenidos fueron utilizados para calcular la eficiencia del proceso de purificación. A partir de las medidas de actividad enzimática y de proteínas totales en cada uno de los pasos del proceso, se calcularon el Factor de purificación y Rendimiento para cada una de las enzimas en estudio. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.X. Cada sistema se realizó por triplicado.

Tabla 5.X: Eficiencia del proceso de purificación de Trip y QT a partir de un hmg de páncreas bovino.

Enzima	Actividad Específica (UA/mg)	Factor de Purificación	Rendimiento (%)
Desorción QT	5 ± 1	7 ± 3	44 ± 2
Control QT	0,75 ± 0,08	1	100
Desorción Trip	0,65 ± 0,05	5 ± 2	17 ± 2
Control Trip	0,14 ± 0,01	1	100

A partir de los resultados presentados puede concluirse que la aplicación del protocolo desarrollado permite purificar a ambas enzimas con resultados interesantes. La Trip logra purificarse casi 5 veces con un rendimiento del 17 % mientras que, para la QT, se obtiene un factor de purificación de 7 con un rendimiento del 43 %. Los resultados obtenidos para la QT son similares a los obtenidos para la misma enzima utilizando una matriz de Alg sin tratamiento químico [13].

Los resultados permiten concluir que la matriz de Alg-GG puede ser utilizada como adsorbente para un paso primario en la purificación de ambas enzimas, rindiendo el protocolo excelentes factores de purificación y rendimientos interesantes.

5.3.4- SDS-PAGE

Finalmente, las muestras recuperadas luego de la desorción fueron sometidas a una electroforesis para confirmar los resultados obtenidos mediante medidas de actividad enzimática y proteínas totales. La Figura 5.13 muestra los patrones electroforéticos obtenidos para la desorción de la QT y la 5.14 los correspondientes a la desorción de la Trip.

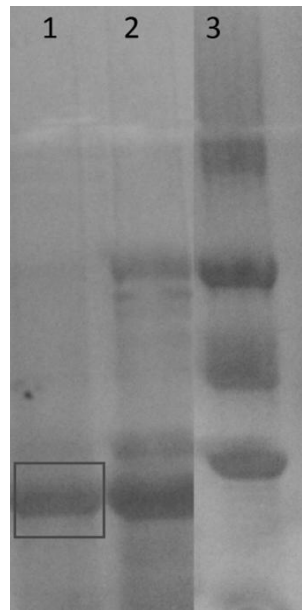


Figura 5.13: SDS-PAGE de las proteínas presentes luego de la purificación por adsorción-desorción utilizando buffer Pi 25 mM pH 7,00 + 500 mM NaCl (calle 1), y en el Hmg (calle 2). La banda correspondiente a la QT se encuentra resaltada. La calle 3 corresponde a los marcadores de peso molecular.

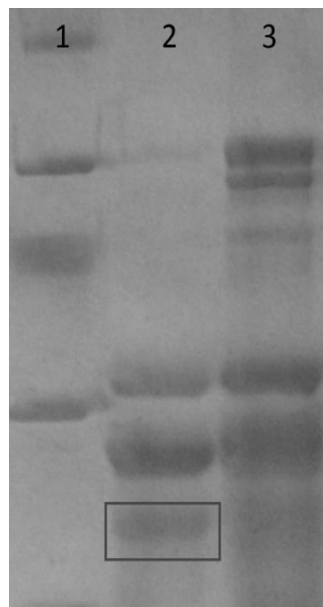


Figura 5.14: SDS-PAGE de las proteínas presentes luego de la purificación por adsorción-desorción utilizando buffer Pi 25 mM pH 7,00 + 20 % P/V de propilenglicol + 500 mM de NaCl (calle 2), y en el Hmg (calle 3). La banda correspondiente a la Trip se encuentra resaltada. La calle 1 corresponde a los marcadores de peso molecular.

El patrón electroforético obtenido para ambas proteínas muestra la eficacia del proceso de purificación. En ambos geles puede observarse la reducción notable en el número de bandas presentes en la desorción con respecto a las presentes en el Hmg. La adsorción muestra no ser selectiva únicamente para la Trip y QT, así como también las condiciones de desorción, ya que pueden observarse bandas correspondientes a otras proteínas luego de la purificación. Esto corrobora la hipótesis que el protocolo desarrollado puede utilizarse como un primer paso de purificación de la muestra, al que luego deben seguir otros si se busca obtener a la enzima pura.

5.4- Conclusiones y discusión final: Capítulo 2: Adsorción de proteasas básicas sobre una matriz insoluble de Alginato y Goma Guar

Durante esta parte del trabajo se estudió la factibilidad de utilizar una matriz insoluble formada por dos polímeros naturales, el Alg y GG, y tratada químicamente con Epi, para adsorber proteasas básicas con el objetivo de purificar las mismas a partir de una fuente natural.

Como un primer paso, previo a la utilización de las esferas, se hizo un estudio básico de sus propiedades. Se encontró que el tratamiento químico de las mismas es efectivo para su insolubilización, haciéndolas estables frente a condiciones en las que el control sin tratamiento se solubiliza. Mediante espectroscopia de FTIR se comprobó la eficacia del proceso de entrecruzamiento químico al observarse, en las esferas tratadas, un pico pronunciado alrededor de 1100 cm^{-1} . Dicho pico es característico de los grupos epóxido y está asociado a la deformación axial del enlace C-O-C. Además, la matriz obtenida mostró buena resistencia mecánica, capacidad de hidratación y estabilidad en el tiempo.

Luego de caracterizada, la matriz fue empleada para la adsorción de dos proteasas básicas de amplio interés industrial: QT y Trip. En una primera aproximación, se analizaron diferentes condiciones para realizar la adsorción con el fin de encontrar la que brindara los mejores rendimientos. Para ambas enzimas se encontró que la mayor capacidad de adsorción se obtiene trabajando en buffer pH 5,00 sin el agregado de sales al medio. El incremento de pH o de la fuerza iónica presente en el medio tuvo un efecto negativo en la capacidad de adsorción, lo que

permite suponer que la interacción entre las enzimas y la matriz es principalmente de tipo electrostático, ya que se encuentra afectada por las condiciones del medio que modifican el estado de cargas del adsorbato y el adsorbente.

La cinética de la adsorción se estudió bajo diferentes condiciones y se encontró, para los dos sistemas que el equilibrio es rápido, llegando a la máxima cantidad de enzima adsorbida en menos de 45 min. Dicho tiempo depende del pH de trabajo, de la concentración de enzima presente y de la temperatura. Los resultados experimentales fueron ajustados a diferentes modelos cinéticos y se encontró que la adsorción de QT puede ser explicada tanto por el modelo de pseudo-primer orden como por el de pseudo-segundo orden, lo que podría estar evidenciando dos pasos limitantes de la velocidad para el proceso: un primer paso limitado por la difusión del adsorbato y un segundo limitado por la unión del adsorbato a la matriz. La adsorción de Trip, por su parte, ajustó a un modelo de pseudo-primer orden indicando como paso limitante de la velocidad a la difusión del adsorbato.

Las isotermas de adsorción a pH 5,00 mostraron una tendencia de tipo sigmoideo para ambas enzimas y se encontró que la disminución de la temperatura conlleva a un leve incremento en la capacidad máxima de adsorción de la matriz. Los datos experimentales ajustaron al modelo de isoterma de Hill, el cual plantea a la adsorción como un modelo cooperativo en el que la unión del adsorbato modifica la afinidad de los sitios restantes para la adsorción. Tanto para la adsorción de QT como de Trip se encontró una cooperatividad de tipo positiva y, en todos los casos, la matriz mostró una mayor capacidad de unión de QT que de Trip. Las variables

termodinámicas permiten concluir que la adsorción de las dos enzimas es de tipo espontáneo y se encuentra entrópicamente conducida: es la liberación del agua ordenada alrededor de las proteínas y las esferas adsorbentes lo que lleva a que el proceso de adsorción sea favorable.

La unión de las enzimas a la matriz es reversible, lo que permite recuperarlas en medio líquido luego de cambiar las condiciones del medio. Para el caso de la QT se encontró que un incremento del pH y de la fuerza iónica del medio son suficientes para recuperar un 81 % de la enzima adsorbida. La Trip, sin embargo, se recuperó en menor medida (76 %) en un medio a pH 7,00 con la adición de 500 mM de NaCl y 20% P/V de propilenglicol. La posibilidad de desorber las enzimas es interesante desde dos puntos de vista: en primer lugar, permite obtener a las enzimas nuevamente en medio líquido luego del proceso de purificación y, en segundo término, permite liberar los sitios de adsorción de la matriz para su eventual reciclado.

La re-utilización de la matriz en sucesivos ciclos de adsorción-lavado-desorción fue ensayada y se encontró que la misma puede ser utilizada en cinco ciclos consecutivos sin pérdidas importantes en su capacidad de adsorción. Esta capacidad es interesante para la disminución de costos del proceso tanto por el reciclado de los reactivos como por la disminución en la generación de desechos.

Es importante destacar que se realizaron controles de actividad enzimática en cada uno de los pasos del protocolo y se pudo concluir que ninguno de los pasos afecta negativamente la actividad enzimática de la QT y Trip. Además, mediante la realización de los espectros de emisión de fluorescencia de las proteínas antes y

después de la adsorción se pudo comprobar que no se producen cambios apreciables en el microentorno de los Triptófanos presentes en ambas. En conjunto, puede concluirse que la metodología desarrollada no afecta la estructura ni función de las enzimas.

Finalmente, los resultados obtenidos fueron aplicados a la purificación de ambas enzimas a partir de un Hmg de páncreas bovino. Se logró purificar, en el mejor de los casos, a la QT 7 veces con un rendimiento del 44% y la Trip 5 veces con un rendimiento del 17 %. Estos resultados son muy interesantes y abren la posibilidad de utilizar el protocolo desarrollado como un primer paso para la purificación de ambas enzimas a partir de un desecho de la industria frigorífica, tan importante en nuestra región y en el país.

CONCLUSIÓN

FINAL

6- Conclusión Final

En la actualidad, las enzimas cumplen un rol protagónico como catalizadores de excelencia en la industria e investigación. El principal obstáculo que presenta su utilización es su elevado costo.

Uno de los factores principales que influyen en el precio final de las enzimas es el proceso de purificación de las mismas, el cual puede llegar a representar el 80% del costo final del producto. Con el desarrollo de la biotecnología, se han enfocado los esfuerzos a la disminución del costo de dicho proceso. Existen dos aproximaciones para lograr esto: la primera es la producción, en gran escala, de proteínas en organismos modificados genéticamente que pueden incluir modificaciones para facilitar su purificación. Una segunda aproximación, es el estudio de nuevas metodologías de bioseparación que permitan disminuir los costos del proceso de purificación.

En el presente trabajo se estudiaron dos metodologías, basadas en la utilización de polímeros de cadena flexible, para la purificación de enzimas de interés industrial. En una primera etapa se estudió la capacidad de dos PE naturales: Alg y Carr, para ser utilizados en la purificación por precipitación de QT. La precipitación con PE es una metodología simple, económica y efectiva para ser empleada como un paso de pre-purificación y concentración de enzimas. Además, si se utilizan PE naturales, la técnica no produce residuos contaminantes como lo hace la precipitación utilizando sales, en especial sulfato de amonio.

La formación de complejos insolubles entre proteínas y PE se encuentra afectada principalmente por el pH y la cantidad y tipo de sales presentes en el medio. Por ello, se comenzó el estudio de la interacción de QT con ambos PE analizando el efecto de dichas variables. Se encontró que tanto el pH como la fuerza iónica del medio tienen marcada influencia sobre la formación de complejos QT-Carr y QT-Alg. El pH óptimo para la precipitación resultó ser de 4,50 cuando se utiliza Carr y de 5,00 para el caso del Alg. Con este último se encontró que el agregado al medio de 200 mM de NaCl anula en su totalidad la formación de complejos insolubles, evidenciando un mecanismo netamente electrostático para la interacción. Se encontró una disminución de la interacción QT-Carr al incrementarse la fuerza iónica del medio, pero la misma no llega a anularse completamente evidenciando la presencia de interacciones de tipo electrostáticas combinadas con otro tipo de interacciones, posiblemente de tipo hidrofóbicas.

En ambos sistemas se requiere una concentración de PE muy baja para alcanzar el óptimo de precipitación, la cinética de formación de los complejos es rápida y ninguno de los PE tiene efecto negativo sobre la estructura o actividad de la enzima. Es más, se encontró un efecto estabilizante del Carr sobre la QT frente a la desnaturalización térmica y química.

Los datos obtenidos fueron aplicados a la purificación de QT a partir de un Hmg de páncreas bovino, con un rendimiento del 60 % y un factor de purificación de 3,0 cuando el agente precipitante fue Carr mientras que, para el Alg, se obtuvo un rendimiento de 38 % logrando purificar la muestra 3,2 veces.

En la segunda etapa del trabajo se utilizó una mezcla de dos polímeros naturales: Alg y GG para formar una matriz insoluble que sea capaz de adsorber proteínas. La matriz de Alg-GG fue tratada con un reactivo químico capaz de formar enlaces covalentes entre las cadenas de polisacáridos, de manera de hacerla insoluble: la epiclorhidrina. Las matrices así obtenidas demostraron ser estables frente a diferentes condiciones experimentales y, mediante espectroscopia de FTIR, pudo demostrarse la aparición de nuevos enlaces en las mismas, lo que es una prueba fehaciente de la efectividad del entrecruzamiento.

Las esferas tratadas fueron utilizadas para el estudio de la adsorción de dos proteasas básicas: QT y Trip. Se encontró que la adsorción de las mismas se encuentra influenciada por el pH y la fuerza iónica del medio de trabajo, evidenciando un mecanismo electrostático de interacción. El pH óptimo para la adsorción de ambas enzimas fue 5,00. La cinética del proceso fue de menos de 45 minutos y se vio afectada por la concentración de enzima, pH y temperatura de trabajo. Las isothermas de adsorción ajustaron al modelo de Hill, el cual supone la adsorción como un mecanismo cooperativo en el cual la unión del adsorbato modifica la afinidad de los sitios restantes para la unión. Con ambas enzimas se encontró una ligera disminución en la capacidad máxima de adsorción de la matriz al aumentar la temperatura desde 8 a 25 °C. Los sistemas fueron caracterizados termodinámicamente y se pudo concluir que el proceso de adsorción se encuentra entrópicamente conducido.

Las enzimas pudieron ser recuperadas luego de la adsorción con buenos rendimientos y ninguno de los pasos del protocolo afectó negativamente la actividad

enzimática de las mismas. Además, es importante destacar que la matriz pudo ser re-utilizada en cinco ciclos de adsorción-lavado-desorción sin pérdidas en su capacidad de adsorción.

Finalmente, las condiciones determinadas se aplicaron a la purificación de las enzimas a partir de una fuente natural de obtención de ambas: el páncreas bovino. Se encontró que el protocolo es apto para ser aplicado en mezclas complejas obteniéndose un rendimiento del 44% con un factor de purificación de 7 para el caso de la QT y un 17% de rendimiento con un factor de purificación de 5 para el caso de la Trip.

Si se realiza una comparación de ambos métodos de purificación desarrollados se encuentra que cada uno tiene sus ventajas y desventajas. La precipitación con PE es un método más simple y rápido, pero se obtienen menores purificaciones que con el método de adsorción. Por otra parte, la principal ventaja de la adsorción sobre matrices de PE es que la enzima se recupera en fase líquida sin el PE y la matriz puede ser re-utilizada sin ningún paso adicional. En la precipitación, la enzima y el PE quedan en el buffer de re-disolución y para separarlos es necesario aplicar otra operación unitaria para tal fin.

Finalmente, es importante destacar que ambas metodologías son aptas para ser aplicadas como una primera etapa de pre-purificación y concentración de las enzimas en estudio.

RESUMEN

7- Resumen

Con los avances de la ciencia moderna, principalmente en el campo de la biotecnología, la obtención de enzimas para uso industrial ha creado la necesidad de desarrollar nuevas metodologías para la purificación de las mismas. Los métodos de escalado clásicos para la purificación de enzimas emplean precipitación con sales o solventes. Dichas técnicas producen gran cantidad de residuos que muchas veces son difíciles de reciclar, incrementando los costos del proceso. Los nuevos protocolos deben reunir una serie de condiciones: ser económicos, con el mínimo de operaciones unitarias y, especialmente, ser amigables con el medio ambiente.

En general, la macromolécula de interés se encuentra diluida en un sistema complejo junto con otras macromoléculas y, en algunos casos, otros componentes celulares. Uno de los principales desafíos del área de la biotecnología denominada bioseparación es encontrar nuevas metodologías con capacidad de separar y purificar la macromolécula de interés del resto de componentes no deseados.

El proceso de bioseparación de proteínas se refiere a la separación y purificación de una proteína a partir de un producto complejo de diversas procedencias como puede ser animal, microbiana, vegetal o artificial. La bioseparación ha adquirido mayor importancia en los últimos años debido a la creciente necesidad de disponer de grandes cantidades de proteínas con diversos grados de pureza, dependiendo del uso final que se le vaya a dar. Esto ha estimulado la búsqueda de fuentes naturales de enzimas junto con el desarrollo de nuevas

técnicas bioseparativas y el perfeccionamiento de la obtención de enzimas recombinantes.

Gran parte de los procedimientos tradicionales de purificación de proteínas incluyen varias etapas de precipitación o de adsorción. Para mezclas con baja cantidad de contaminantes y alta concentración de la proteína de interés, la precipitación y la adsorción pueden ser métodos efectivos de concentración y, en algunos casos, pueden actuar como etapa única de purificación, dependiendo del grado de pureza final pretendido.

Una de las técnicas empleadas para la precipitación de enzimas es la formación de complejos insolubles con polielectrolitos. Estos complejos pueden separarse de los contaminantes por una simple decantación y pueden utilizarse para purificar, concentrar y estabilizar a la enzima de interés. Es una técnica simple, rápida, económica y aplicable a gran escala. Una parte de este trabajo de tesis se dedicó a estudiar la formación de complejos insolubles entre la Quimotripsina, una enzima con diversas aplicaciones en la industria, y dos polielectrolitos aniónicos naturales: Carragenano y Alginato. Ambos polímeros son obtenidos de fuentes naturales, por lo que pueden ser descartados en el medio ambiente sin efectos negativos sobre éste. Además, los dos polielectrolitos utilizados son producidos en nuestro país, lo que le otorga más relevancia a los resultados obtenidos: el protocolo de bioseparación puede llevarse a cabo, casi en su totalidad, empleando materiales de fabricación nacional.

La formación de los complejos proteína-polielectrolito se da debido a un conjunto de fuerzas no covalentes que actúan en conjunto. Las principales

interacciones son del tipo electrostáticas, aunque pueden participar la formación de puentes hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas. La interacción entre ambas macromoléculas será altamente dependiente del pH del medio, la fuerza iónica y del tipo de sales presentes, en el caso de que exista un componente hidrofóbico en la interacción.

El efecto del pH y la fuerza iónica sobre la formación de los complejos fue estudiado mediante el seguimiento de la turbidez del sistema Quimotripsina-polímero en función del pH y la fuerza iónica presente. Utilizando esta técnica pudo concluirse que el sistema Quimotripsina-Carragenano es insoluble a pHs menores a 8,00, alcanzando su máximo de insolubilidad a pHs menores a 5,00. Cuando la titulación se repite en presencia de diferentes concentraciones de NaCl, los pHs de insolubilidad del complejo no cambian significativamente, pero se observa una disminución en la cantidad de complejo insoluble formado, lo que es consistente con un mecanismo coulombico de formación del complejo. Sin embargo, no llega a anularse la interacción, aún ante elevadas concentraciones de sal. El sistema Quimotripsina-Alginato, por su parte, muestra un comportamiento bastante similar: comienza a insolubilizarse a pHs menores a 8,00, alcanzando su máximo a pH 5,00 y comienza a solubilizarse nuevamente a pH menores a 4,90. Este sistema, a diferencia del primero, es altamente sensible a la fuerza iónica del medio: la interacción es completamente anulada en presencia de NaCl 200 mM, evidenciando un mecanismo netamente coulombico de interacción.

Una vez conocidos los pH de solubilidad-insolubilidad de cada caso, se seleccionaron diferentes valores de pH para estudiar la precipitación de la proteína. A

estos pHs se realizó la titulación turbidimétrica de una cantidad fija de proteína con cantidades crecientes de cada uno de los polímeros. Los datos obtenidos fueron graficados como turbidez a 420 nm vs [Polímero] obteniéndose curvas sigmoideas y, a partir de dichos gráficos, se obtuvieron las relaciones polímero/proteína para obtener la máxima cantidad de complejo insoluble. En todos los sistemas estudiados se encontró que la cantidad de polímero necesaria para obtener el máximo de enzima precipitada es baja, y se encuentra en el orden de 0,05 mg de polímero/ mg de proteína presente.

Las titulaciones fueron realizadas también en presencia de NaCl y, bajo estas condiciones se encontró, para ambos sistemas, un cambio notable en las relaciones obtenidas, requiriéndose una mayor cantidad de polímero para precipitar una misma cantidad de proteína y alcanzando valores de rendimiento mucho menores. Para el caso del Alginato, la presencia de 200 mM de NaCl anuló la formación de complejo insoluble, corroborando los resultados obtenidos anteriormente. Además, se observó una pérdida del comportamiento sigmoideo de los datos los cuáles mostraron, en este caso, un comportamiento hiperbólico.

Se realizaron también los estudios de cinética de la precipitación, para ello se utilizó una cantidad fija de enzima y de polímero y se midió la turbidez del sistema en función del tiempo. En todos los casos se encontró una cinética de dos pasos: uno que toma entre 0-10 seg y uno lento que necesita de aproximadamente 120 seg. La cinética del proceso se vio claramente afectada por el pH del medio y la presencia de sales en el mismo.

Para el sistema Quimotripsina-Carragenano se estudió también el cambio en el tamaño de los agregados formados. Para ello, se realizaron curvas de titulación de una concentración fija de Quimotripsina con Carragenano y se realizó la medición de la absorbancia de la muestra en el rango de 420 a 650 nm. Mediante un adecuado procesamiento de los datos se obtuvo un parámetro denominado α el cual es inversamente proporcional al tamaño de los agregados. Se encontró que el tamaño de los mismos aumenta al incrementarse la concentración de polímero en el medio. Esto es consistente con la mayor capacidad para formar agregados insolubles y la capacidad de los mismos de interaccionar entre ellos alcanzando mayor tamaño, al aumentar la concentración de polímero presente.

Los resultados obtenidos mostraron que es factible la utilización de ambos polímeros para precipitar la proteína de interés. Pero, para poder utilizar el protocolo, es necesario comprobar que el polímero no afecte la estructura ni la actividad biológica de la proteína de interés. El efecto de los polímeros sobre la estructura de la Quimotripsina se estudió por diferentes métodos y no se encontraron cambios significativos en la estructura de la enzima cuando la misma se encuentra en presencia de los polielectrolitos. El Carragenano, además, mostró un efecto estabilizante sobre la enzima frente a la desnaturalización térmica y química. En cuanto a la actividad enzimática, se encontró que ninguno de los polielectrolitos utilizados afecta negativamente la actividad catalítica de la Quimotripsina, al menos en las condiciones estudiadas.

Finalmente, los resultados obtenidos fueron tomados como referencia para la precipitación de la proteasa a partir de una fuente natural. En este caso se eligió

como fuente de la enzima el páncreas bovino. La aplicación del protocolo de precipitación a un homogenado de páncreas permitió recuperar Quimotripsina a partir de la precipitación utilizando Carragenano con un rendimiento del 60 % y un factor de purificación de 3,0. Cuando el agente precipitante fue Alginato se obtuvo un rendimiento de 36,6 % y un factor de purificación de 3,2. En ambos casos se logró disminuir el volumen inicial 10 veces, lo que conduce a una importante concentración de la muestra de partida.

Por otro lado, la adsorción es una de las operaciones unitarias más utilizadas para la etapa de concentración y purificación de macromoléculas a partir de homogenados de tejidos animales y vegetales, o a partir de caldos de cultivo. En la segunda parte de esta tesis, se estudió la adsorción de Quimotripsina y Tripsina sobre una matriz insoluble de Alginato y Goma Guar entrecruzada covalentemente con epíclorhidrina. Frente al desafío de utilizar las esferas como adsorbentes para la purificación de las enzimas se determinaron, en primer lugar, las mejores condiciones para llevar a cabo la adsorción. Se prepararon para ello, sistemas con una masa fija de matriz y una concentración constante de cada una de las enzimas pero se utilizaron diferentes buffers de adsorción. Los parámetros que se variaron fueron el pH y la fuerza iónica del sistema. Se encontró que la mejor adsorción de Quimotripsina y Tripsina se obtiene trabajando a pH 5,00 en ausencia de sales agregadas. Por ello, se eligió como buffer para realizar la adsorción citrato 25 mM pH 5,00.

La cinética de la adsorción fue llevada a cabo a diferentes temperaturas, pHs y con diferentes concentraciones iniciales de enzima. En todos los casos se encontró que, con el aumento en el tiempo de contacto entre la enzima y la matriz, se produce un incremento en la cantidad de enzima adsorbida hasta que se alcanza un *plateau*, luego del cual no se producen cambios en la cantidad de proteína unida. Los datos obtenidos fueron ajustados a diferentes modelos cinéticos encontrándose que la adsorción de Quimotripsina puede ser explicada mediante los modelos de pseudo-primer orden y pseudo-segundo orden, mientras que la Tripsina se adsorbe sobre la matriz siguiendo una cinética de pseudo-primer orden. Es importante destacar que el tiempo requerido para alcanzar la máxima adsorción se vio modificado con todas las variables estudiadas, para ambos sistemas.

Las isotermas de adsorción se realizaron a dos temperaturas: 25 °C y 8 °C. En ambos casos se trabajó con una agitación de 30 rpm. Los resultados obtenidos fueron ajustados a diferentes modelos de isotermas: Langmuir, Freundlich y Hill. El mejor ajuste de los datos experimentales, con las dos enzimas, se obtuvo con el modelo de isoterma de Hill de 3 parámetros. Dicho modelo plantea la existencia de un mecanismo de adsorción del tipo cooperativo en el cual la unión de adsorbato en un sitio modifica la afinidad de los sitios libres restantes. Con los parámetros obtenidos en el ajuste de los datos, pudo concluirse que la capacidad de adsorción de la matriz es ligeramente mayor a 8°C tanto para la Quimotripsina como para la Tripsina. A su vez, se encontró una mayor capacidad de unión de Quimotripsina que de Tripsina a las dos temperaturas estudiadas.

Con datos obtenidos a ambas temperaturas se calcularon, para ambos sistemas, los parámetros termodinámicos del proceso de adsorción. El valor negativo para el cambio de energía libre indica que la adsorción de ambas enzimas en la matriz es un proceso espontáneo. El valor positivo para el cambio de entropía, por otra parte, indica el incremento en el desorden del sistema durante la adsorción. Esto puede deberse a la liberación del agua ordenada alrededor de la matriz y de las enzimas cuando la adsorción tiene lugar.

Una vez determinados los parámetros de la adsorción de ambas enzimas, se comenzó el estudio de la desorción de las mismas. Para ello se eligió variar tres parámetros que afectan notablemente los procesos de adsorción: el pH, la fuerza iónica y la naturaleza del buffer empleado. De las diferentes condiciones ensayadas, el mejor buffer de desorción para la Quimotripsina es el buffer P_i 25 mM pH 7,00 con el agregado de 500 mM de NaCl, con el cual se obtiene un 81 ± 3 % de proteína desorbida. Para la Tripsina, el mayor porcentaje de desorción fue de 76 ± 1 % y se logró con la utilización de buffer P_i 25 mM pH 7,00 con el agregado de 500 mM de NaCl y 20 %P/V de propilenglicol. En los dos sistemas la cinética de desorción es rápida y requiere de menos 10 min para completarse.

Es importante destacar que ninguno de los pasos utilizados en el protocolo de adsorción desarrollado afecta la actividad enzimática de las enzimas en los tiempos determinados para llevar a cabo el protocolo completo.

Los resultados obtenidos se aplicaron a la realización de sucesivos ciclos de adsorción/lavado/desorción utilizando la misma alícuota de matriz. Se encontró que la matriz puede ser reutilizada 5 veces, sin pérdida de su capacidad de adsorción.

Finalmente, se aplicó el protocolo desarrollado a la purificación de ambas enzimas a partir de un homogenado de páncreas bovino. Para la Quimotripsina se obtuvo un factor de purificación de 7 ± 3 y un rendimiento del $44 \pm 2 \%$, mientras que la Tripsina se purificó 5 ± 2 veces con un rendimiento del $17 \pm 2 \%$.

En conclusión, durante este trabajo de Tesis se desarrollaron dos metodologías para la purificación de enzimas basadas en la utilización de polímeros de cadena flexible naturales. Con ambas técnicas se lograron rendimientos y factores de purificación adecuados y, en ninguno de los casos, se vio afectada la estructura ni la actividad de las enzimas en estudio. Es importante resaltar que ambas técnicas son de bajo costo, utilizan materiales biodegradables y, en el caso de la adsorción, la matriz utilizada puede ser reciclada, disminuyendo aún más los costos del proceso.

ANEXOS

8- Anexos

8.1- Cinética de adsorción de QT

A continuación se presentan los parámetros obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales obtenidos al realizar la cinética de adsorción de QT sobre la matriz de Alg-GG a los diferentes modelos cinéticos, empleando los métodos de ajuste lineales y no lineales.

Modelo	Parámetros	Ajuste no lineal		
		pH 5,00		pH 6,00
		[QT]= 0,075 mg/mL	[QT]= 0,25 mg/mL	[QT] = 0,25 mg/mL
Pseudo- primer Orden	q_e (mg/g)	$1,14 \pm 0,03$	$2,13 \pm 0,05$	$0,84 \pm 0,02$
	k_1 (min^{-1})	$0,18 \pm 0,03$	$(4,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$	$0,18 \pm 0,02$
	R^2	0,9718	0,9876	0,9904
	SCE	$3,265 \cdot 10^{-2}$	$5,485 \cdot 10^{-2}$	$5,765 \cdot 10^{-3}$
Pseudo- segundo Orden	q_e (mg/g)	$1,3 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,1$	$0,93 \pm 0,01$
	k_2 ($\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	$0,22 \pm 0,03$	$(2,01 \pm 0,04) \cdot 10^{-2}$	$0,29 \pm 0,02$
	R^2	0,9828	0,9981	0,9970
	SCE	$1,990 \cdot 10^{-2}$	$8,824 \cdot 10^{-3}$	$1,785 \cdot 10^{-3}$
Weber-Morris	K_p ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-0,5}$)	NC	NC	NC
	R^2	NC	NC	NC
	SCE	NC	NC	NC

Modelo	Parámetros	Ajuste lineal		
		pH 5,00		pH 6,00
		[QT]= 0,075 mg/mL	[QT]= 0,25 mg/mL	[QT] = 0,25 mg/mL
Pseudo- primer Orden	q_e (mg/g)	$1,1 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$	$0,87 \pm 0,03$
	k_1 (min^{-1})	$(9 \pm 2) \cdot 10^{-2}$	$(5,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$	$0,3 \pm 0,1$
	R^2	0,9775	0,9875	0,9862
	SCE	0,9012	2,285	1,001
Pseudo- segundo Orden	q_e (mg/g)	$1,3 \pm 0,2$	$2,54 \pm 0,03$	$0,92 \pm 0,02$
	k_2 ($\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	$0,25 \pm 0,07$	$(2,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$	$0,31 \pm 0,03$
	R^2	0,9949	0,9989	0,9980
	SCE	0,7740	0,2304	0,1428
Weber-Morris	K_p ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-0,5}$)	$1,2 \pm 0,2$	$0,21 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,01$
	R^2	0,9287	0,9073	0,9773
	SCE	1,789	3,154	2,276

8.2- Cinética de adsorción de Trip

A continuación se presentan los parámetros obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales obtenidos al realizar la cinética de adsorción de Trip sobre la matriz de Alg-GG a los diferentes modelos cinéticos, empleando los métodos de ajuste lineales y no lineales.

Ajuste no lineal

Modelo	Parámetros	25 °C			1°C
		[Trip]= 0,12 mg/mL	[Trip]= 0,25 mg/mL	[Trip] = 0,39 mg/mL	[Trip]= 0,39 mg/mL
	Tiempo necesario para el equilibrio (min)	6	15	30	40
Pseudo-primer orden	q_e (mg/g)	0,7±0,1	1,89±0,05	3,4±0,3	5±1
	k_1 (min ⁻¹)	0,9±0,1	0,25±0,03	(6±1).10 ⁻²	(4±2).10 ⁻²
	R ²	0,9976	0,9984	0,9695	0,9015
	SCE	1,038 .10 ⁻³	5,671.10 ⁻²	0,3401	2,647
Pseudo-segundo orden	q_e (mg/g)	0,7±0,4	2,0±0,2	5±1	7±1
	k_2 (g.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	9 ± 4	0,21±0,02	(1,3±0,1).10 ⁻²	(3±1).10 ⁻³
	h ($k_2.q_e^2$) (mg.min ⁻¹ .g ⁻¹)	4 ± 2	0,39±0,03	0,23±0,05	0,2±0,1
	R ²	0,9959	0,9864	0,9623	0,8931
	SCE	1,741.10 ⁻³	8,024 .10 ⁻²	0,4203	2,874
Weber-Morris	K_p (mg.g ⁻¹ .min ^{-0,5})	NC	NC	NC	NC
	R ²	NC	NC	NC	NC
	SCE	NC	NC	NC	NC

Ajuste lineal

Modelo	Parámetros	25 °C			1°C
		[Trip]= 0,12 mg/mL	[Trip]= 0,25 mg/mL	[Trip] = 0,39 mg/mL	[Trip]= 0,39 mg/mL
	Tiempo necesario para el equilibrio (min)	6	15	30	40
Pseudo-primer orden	q_e (mg/g)	0,65±0,04	2,1±0,4	3,8±0,3	4,9±0,3
	k_1 (min ⁻¹)	0,9±0,1	0,3±0,1	(4±1).10 ⁻²	(3,7±0,2).10 ⁻²
	R ²	0,9996	0,9974	0,9867	0,9198
	SCE	2,056 .10 ⁻²	1,298.10 ⁻⁴	1,3501	1,789
Pseudo-segundo orden	q_e (mg/g)	0,8±0,5	1,9±0,3	6±2	6,8±0,1
	k_2 (g.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	8,7 ± 0,4	0,21±0,02	(1,9±0,6).10 ⁻²	(2,8±0,1).10 ⁻³
	h ($k_2.q_e^2$) (mg.min ⁻¹ .g ⁻¹)	2,7 ± 0,4	0,46±0,03	0,19±0,04	0,31±0,15
	R ²	0,9879	0,9752	0,9594	0,7981
	SCE	0,1475	3,477 .10 ⁻¹	0,7193	2,562
Weber-Morris	K_p (mg.g ⁻¹ .min ^{-0,5})	0,7±0,3	1,03 ± 0,06	0,48±0,07	0,3 ± 0,2
	R ²	0,8943	0,9874	0,9203	0,8564
	SCE	3,404.10 ⁻³	0,1321	0,8896	3,923

REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

9- Referencias Bibliográficas

1. Wheelwright, S.M., *The design of downstream processes for large-scale protein purification*. Journal of Biotechnology, 1989. **11**(2-3): p. 89-102.
2. Cisneros-Ruiz, R.P., *Estrategias de Bioingeniería Para la Recuperación Primaria de Productos Biológicos*. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 2005: p. 131-139.
3. Vennapusa, R., S.M. Hunegnaw, R.B. Cabrera, M. Fernandez-Lahore, *Assessing adsorbent-biomass interactions during expanded bed adsorption onto ion exchangers utilizing surface energetics*. Journal of Chromatography A, 2008. **1181**(1-2): p. 9-20.
4. Scopes, R.K., *Protein purification : principles and practice / Robert K. Scopes*. Springer advanced texts in chemistry. 1994, New York :: Springer-Verlag.
5. Labrou, N., *Protein Purification: An Overview*, in *Protein Downstream Processing*, N.E. Labrou, Ed. 2014, Humana Press. p. 3-10.
6. Jean-François, P.H. and B.H. Jean, *Modeling and Applications of Downstream Processing*, in *Downstream Processing and Bioseparation*. 1990, American Chemical Society. p. 1-35.
7. Doran, P.M., *Chapter 11 - Unit Operations*, in *Bioprocess Engineering Principles (Second Edition)*. 2013, Academic Press: London. p. 445-595.
8. Huddleston, J. and A. Lyddiatt, *Aqueous two-phase systems in biochemical recovery*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1990. **26**(3): p. 249-279.
9. Boeris, V., D. Romanini, B. Farrugia and G. Picó., *Purification of chymotrypsin from bovine pancreas using precipitation with a strong anionic polyelectrolyte*. Process Biochemistry, 2009. **44**(5): p. 588-592.
10. Cappella, L.V., V. Boeris and G. Picó, *A simple method of chymotrypsin concentration and purification from pancreas homogenate using Eudragit® L100 and Eudragit® S100*. Journal of Chromatography B, 2011. **879**(13-14): p. 1003-1007.

11. Anspach, F.B., D. Curbelo, R. Hartmann, G. Garke and W.D. Deckwer, *Expanded-bed chromatography in primary protein purification*. Journal of Chromatography A, 1999. **865**(1–2): p. 129-144.
12. Gondim, D., N. Dias, I. Bresolin, A. Baptistiolli, D. Azevedo and I.J. Silva, Jr., *Human IgG adsorption using dye-ligand epoxy chitosan/alginate as adsorbent: influence of buffer system*. Adsorption, 2014. **20**(8): p. 925-934.
13. Spelzini, D., B. Farruggia, and G. Picó, *Purification of chymotrypsin from pancreas homogenate by adsorption onto non-soluble alginate beads*. Process Biochemistry, 2011. **46**(3): p. 801-805.
14. Castillo-Yáñez, F.J., R. Pacheco-Aguilar, F.L. García-Carreño, M. Navarrete-Del Toro and M.F. López, *Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*)*. Food Chemistry, 2006. **99**(2): p. 252-259.
15. Carrea G Fau - Pasta, P., E. Pasta P Fau - Antonini, and E. Antonini, *Purification of chymotrypsin by subunit exchange chromatography on the denatured protein*. (0006-3592 (Print)).
16. Castillo-Yáñez, F.J., R. Pacheco-Aguilar, F.L. García-Carreño and M. Navarrete-Del Toro, *Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea**. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2005. **140**(1): p. 91-98.
17. Ito, Y., *Centrifugal precipitation chromatography: principle, apparatus, and optimization of key parameters for protein fractionation by ammonium sulfate precipitation*. Analytical biochemistry, 2000. **277**(1): p. 143-153.
18. Bassani, G., B. Farruggia, and G. Picó, *Cationic polyelectrolytes–lipases complexes formation as tool for recovery of these enzymes from their natural sources*. International Journal of Biological Macromolecules, 2011. **49**(3): p. 351-355.
19. Boeris, V., B. Farruggia, and G. Pico, *Chitosan-bovine serum albumin complex formation: a model to design an enzyme isolation method by polyelectrolyte precipitation*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010. **878**(19): p. 1543-8.

20. Braia, M., M.C. Porfiri, B. Farruggia, G. Picó and D. Romanini, *Complex formation between protein and poly vinyl sulfonate as a strategy of proteins isolation*. Journal of Chromatography B, 2008. **873**(2): p. 139-143.
21. Breccia, J.D., B. Mattiasson and F. Siñeriz, *Separation of bacterial xylanase by precipitation using eudragit S100*. Journal of Biotechnology, 1998. **61**(3): p. 219-223.
22. Transfiguracion, J., H. Jorio, J. Meghrous, D. Jacob and A. Kamen, *High yield purification of functional baculovirus vectors by size exclusion chromatography*. Journal of Virological Methods, 2007. **142**(1-2): p. 21-28.
23. Pellegrini Malpiedi, L., B.B. Nerli, M.E.S. Taqueda, D.S.P. Abdalla and A. Pessoa Jr, *Optimized extraction of a single-chain variable fragment of antibody by using aqueous micellar two-phase systems*. Protein Expression and Purification, 2015. **111**: p. 53-60.
24. Malpiedi, L.P., G.A. Picó, and B.B. Nerli, *Studies of protein partition in non conventional aqueous two-phase systems as method to purify trypsinogen and alpha-chymotrypsinogen from bovine pancreas*. Separation and Purification Technology, 2011. **78**(1): p. 91-96.
25. Cavalcanti, M.T.H., T.S. Porto, B. de Barros Neto, J.L. Lima-Filho, A.L. Figueiredo Porto and A. Pessoa Jr, *Aqueous two-phase systems extraction of α -toxin from Clostridium perfringens type A*. Journal of Chromatography B, 2006. **833**(2): p. 135-140.
26. Aruna, N. and A. Lali, *Purification of a plant peroxidase using reversibly soluble ion-exchange polymer*. Process Biochemistry, 2001. **37**(4): p. 431-437.
27. Balasubramanian, M. and R. Boopathy, *Purification and characterization of peroxidases from liquid endosperm of Cocos nucifera (L.): Biotransformation*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013. **90**(0): p. 33-42.
28. Thongsook, T. and D.M. Barrett, *Purification and partial characterization of broccoli (Brassica oleracea Var. Italica) peroxidases*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(8): p. 3206-14.

29. Burton, N.P. and C.R. Lowe, *Design of novel cationic ligands for the purification of trypsin-like proteases by affinity chromatography*. Journal of Molecular Recognition, 1993. **6**(1): p. 31-40.
30. Seymour, R.B., *Introduction to polymer Chemistry*. 1971, New York: McGraw-Hill. 437.
31. José García de la, T., G.H.C. José, and M.C.L. Martínez, *Prediction of solution properties of flexible-chain polymers: a computer simulation undergraduate experiment*. European Journal of Physics, 2008. **29**(5): p. 945.
32. Kadajji, V.G. and G.V. Betageri, *Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications*. Polymers, 2011. **3**(4): p. 1972-2009.
33. Dobrynin, A.V. and M. Rubinstein, *Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces*. Progress in Polymer Science, 2005. **30**(11): p. 1049-1118.
34. Simsek-Ege, F.A., G.M. Bond, and J. Stringer, *Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as a function of pH*. Journal of Applied Polymer Science, 2003. **88**(2): p. 346-351.
35. Cooper, C.L., P.L. Dubin, A.B. Kayitmazer and S. Turksen, *Polyelectrolyte-protein complexes*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2005. **10**(1-2): p. 52-78.
36. Bostrom, M., D.R. Williams, and B.W. Ninham, *Specific ion effects: why the properties of lysozyme in salt solutions follow a Hofmeister series*. Biophysical Journal, 2003. **85**(2): p. 686-94.
37. Cacace, M.G., E.M. Landau, and J.J. Ramsden, *The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena*. Quarterly Reviews of Biophysics, 1997. **30**(03): p. 241-277.
38. Zhang, Y. and P.S. Cremer, *Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series*. Current Opinion in Chemical Biology, 2006. **10**(6): p. 658-663.
39. Izumrudov, V.A., I. Galaev, and B. Mattiasson, *Polycomplexes--potential for bioseparation*. Bioseparation, 1998. **7**(4-5): p. 207-20.

40. Romanini, D., M. Braia, R.G. Angarten, W. Loh and G. Picó, *Interaction of lysozyme with negatively charged flexible chain polymers*. Journal of Chromatography B, 2007. **857**(1): p. 25-31.
41. Braia, M., G. Tubio, B. Nerli, W. Loh and D. Romanini, *Analysis of the interactions between Eudragit® L100 and porcine pancreatic trypsin by calorimetric techniques*. International Journal of Biological Macromolecules, 2012. **50**(1): p. 180-186.
42. Schmitt, C. and S.L. Turgeon, *Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems*. Advances in Colloid and Interface Science, 2011. **167**(1-2): p. 63-70.
43. de Kruijff, C.G., F. Weinbreck and R. de Vries, *Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2004. **9**(5): p. 340-349.
44. Tsuboi, A., T. Izumi, M. Hirata, J. Xia, P.L. Dubin and E. Kokufuta, *Complexation of Proteins with a Strong Polyanion in an Aqueous Salt-free System*. Langmuir, 1996. **12**(26): p. 6295-6303.
45. Boeris, V., L.V. Capella, G. Peres, I. Burgos, N. Pesce da Silveira, G. Fidelio and G. Picó, *Chymotrypsin — Eudragit® complex formation as potential non expensive tool to isolate this enzyme at scale up level*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2013. **18**(3): p. 538-545.
46. Kaibara, K., T. Okasaki, H.B. Bohidar and P.L. Dubin, *pH-Induced Coacervation in Complexes of Bovine Serum Albumin and Cationic Polyelectrolytes*. Biomacromolecules, 2000. **1**(1): p. 100-107.
47. Grant, G.T., E.R. Morris, D.A. Rees, P.J.C. Smith and D. Thom, *Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model*. FEBS Letters, 1973. **32**(1): p. 195-198.
48. Tu, J., S. Bolla, J. Barr, J. Miedema, X. Li and B. Jasti, *Alginate microparticles prepared by spray-coagulation method: Preparation, drug loading and release characterization*. International Journal of Pharmaceutics, 2005. **303**(1-2): p. 171-181.

49. Douglas, K.L. and M. Tabrizian, *Effect of experimental parameters on the formation of alginate-chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier*. J Biomater Sci Polym Ed, 2005. **16**(1): p. 43-56.
50. Mobus, K., J. Siepmann, and R. Bodmeier, *Zinc-alginate microparticles for controlled pulmonary delivery of proteins prepared by spray-drying*. Eur J Pharm Biopharm, 2012. **81**(1): p. 121-30.
51. Coppi, G., V. Iannuccelli, E. Leo, M.T. Bernabei and R. Cameroni, *Chitosan-Alginate Microparticles as a Protein Carrier*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2001. **27**(5): p. 393-400.
52. Thünemann, A.F., M. Müller, H. Dautzenberg, J.F. Joanny and H. Lôwen, *Polyelectrolyte Complexes; Polyelectrolytes with Defined Molecular Architecture II*, M. Schmidt, Editor. 2004, Springer Berlin / Heidelberg. p. 19-33.
53. Gonçalves, V.L., M.C.M Laranjeira, V.T. Fávere and R.C. Pedrosa , *Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium*. Polímeros, 2005. **15**(1): p. 6-12.
54. Arruda, E. and C. Santana, *Phenylboronate-chitosan resins for adsorption of β -amylase from soybean extracts*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2003. **108**(1): p. 829-842.
55. Rodrigues, E., B. Bezerra, B. Farias, A. Wellington, R. Vieira, D. Azevedo and I. Silva, *Adsorption of Cellulase Isolated from Aspergillus niger on Chitosan/Alginate Particles Functionalized with Epichlorohydrin*. Adsorption Science & Technology, 2013. **31**(1): p. 17-34.
56. Rinaudo, M., *Chitin and chitosan: Properties and applications*. Progress in Polymer Science, 2006. **31**(7): p. 603-632.
57. Castellan, G. and M. Basín, eds. *Fisicoquímica*. 1987, Fondo Educativo Interamericano.
58. Sathishkumar, M., A.R. Binupriya, K. Vijayaraghavan and S. Yun, *Two and three-parameter isothermal modeling for liquid-phase sorption of Procion Blue H-B by inactive mycelial biomass of Panus fulvus*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2007. **82**(4): p. 389-398.

59. Rangabhashiyam, S., N. Anu, M.S. Giri Nandagopal and N. Selvaraju, *Relevance of isotherm models in biosorption of pollutants by agricultural byproducts*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2014. **2**(1): p. 398-414.
60. Langmuir, I., *The constitution and fundamental properties of solids and liquids. part i. solids*. Journal of the American Chemical Society, 1916. **38**(11): p. 2221-2295.
61. Koopal, L.K., W.H. van Riemsdijk, J.C.M. de Wit and M.F. Benedetti, *Analytical Isotherm Equations for Multicomponent Adsorption to Heterogeneous Surfaces*. Journal of Colloid and Interface Science, 1994. **166**(1): p. 51-60.
62. Goutelle, S., M. Maurin, F. Rougier, X. Barbaut, L. Bourguignon, M. Michel and P. Maire, *The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling*. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2008. **22**(6): p. 633-648.
63. Ho, Y.S. and G. McKay, *Kinetic Models for the Sorption of Dye from Aqueous Solution by Wood*. Process Safety and Environmental Protection, 1998. **76**(2): p. 183-191.
64. Chiou, M.-S. and H.-Y. Li, *Equilibrium and kinetic modeling of adsorption of reactive dye on cross-linked chitosan beads*. Journal of Hazardous Materials, 2002. **93**(2): p. 233-248.
65. Ho, Y.S. and G. McKay, *Pseudo-second order model for sorption processes*. Process Biochemistry, 1999. **34**(5): p. 451-465.
66. G.L. Dotto, V.M.E., M.L.G. Vieira, L.A.A. Pinto, *Optimization and kinetic analysis of food dyes biosorption by Spirulina platensis*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012. **91**: p. 234-241.
67. Ho, Y.S. and G. McKay, *Sorption of dyes and copper ions onto biosorbents*. Process Biochemistry, 2003. **38**(7): p. 1047-1061.
68. Di Cera, E., *Serine Proteases*. IUBMB life, 2009. **61**(5): p. 510-515.
69. Hedstrom, L., *Serine Protease Mechanism and Specificity*. Chemical Reviews, 2002. **102**(12): p. 4501-4524.
70. Voet, D. and J.G. Voet, *Bioquímica*. 2006: Ed. Médica Panamericana.
71. Nelson, D.L., M.M. Cox, and C. Cuchillo, *Lehninger: Principios de Bioquímica*. Editorial Omega, 2009.

72. <http://www.worthington-biochem.com/>, *Trypsin*.
73. Rezaei-Ghaleh, N., H. Ramshini, A. Ebrahim-Habibi, A.A. Moosavi-Gorgani, *Thermal aggregation of α -chymotrypsin: Role of hydrophobic and electrostatic interactions*. Biophysical Chemistry, 2008. **132**(1): p. 23-32.
74. Lozano, P., T. De Diego, and J.L. Iborra, *Dynamic Structure/Function Relationships in the α -Chymotrypsin Deactivation Process by Heat and pH*. European Journal of Biochemistry, 1997. **248**(1): p. 80-85.
75. Campo, V.L., D.F. Kawano, D.B. Silva Jr and I. Carvalho, *Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review*. Carbohydrate Polymers, 2009. **77**(2): p. 167-180.
76. Imeson, A.P., *Carrageenan*, in *Handbook of Hydrocolloids*, G.O.W. Philips, P.A., Editor. 2000. p. 87-102.
77. Dyrby, M., R.V. Petersen, J. Larsen, B. Rudolf, L. Nørgaard and S.B. Engelsen, *Towards on-line monitoring of the composition of commercial carrageenan powders*. Carbohydrate Polymers, 2004. **57**(3): p. 337-348.
78. Shewan, H.M. and J.R. Stokes, *Review of techniques to manufacture microhydrogel particles for the food industry and their applications*. Journal of Food Engineering, 2013. **119**(4): p. 781-792.
79. Ellis, A. and J.C. Jacquier, *Manufacture of food grade κ -carrageenan microspheres*. Journal of Food Engineering, 2009. **94**(3-4): p. 316-320.
80. Kailasapathy, K. and S.H. Lam, *Application of encapsulated enzymes to accelerate cheese ripening*. International Dairy Journal, 2005. **15**(6-9): p. 929-939.
81. Paşcalău, V., V. Popescu, G.L. Popescu, M.C. Dodescu, G. Borodi, A. Dinescu, I. Perhaita and M. Paul, *The alginate/ κ -carrageenan ratio's influence on the properties of the cross-linked composite films*. Journal of Alloys and Compounds, 2012. **536**, **Supplement 1**: p. S418-S423.
82. Selvakumaran, S. and I.I. Muhamad, *Evaluation of kappa carrageenan as potential carrier for floating drug delivery system: Effect of cross linker*. International Journal of Pharmaceutics. *In press*

83. Lima, P.H.L., S.V.A. Pereira, R.B.Rabello, E. Rodriguez-Castellón, M.M. Beppu, P. Chevallier, D. Mantovani, R.S. Vieira, *Blood protein adsorption on sulfonated chitosan and κ -carrageenan films*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013. **111**: p. 719-725.
84. Esmaeili, C., L.Y. Heng, and T.L. Ling, *Nile Blue chromoionophore-doped kappa-carrageenan for a novel reflectometric urea biosensor*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2015. **221**: p. 969-977.
85. Fabian, C.B., L.H. Huynh, and Y.H. Ju, *Precipitation of rice bran protein using carrageenan and alginate*. LWT - Food Science and Technology, 2010. **43**(2): p. 375-379.
86. Sankalia, M.G., R.C. Mashru, J.M. Sankalia V.B Sutariya, *Stability improvement of alpha-amylase entrapped in kappa-carrageenan beads: Physicochemical characterization and optimization using composite index*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **312**(1-2): p. 1-14.
87. Sankalia, M.G., R.C. Mashru, J.M. Sankalia V.B Sutariya, *Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007. **65**(2): p. 215-232.
88. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Alginate: Properties and biomedical applications*. Progress in Polymer Science, 2012. **37**(1): p. 106-126.
89. Steinbuchel, A. and S.K. Rhee, *Polysaccharides and polyamides in the food industry*. 2005: Wiley-VCH.
90. Harnsilawat, T., R. Pongsawatmanit, and D.J. McClements, *Characterization of β -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study*. Food Hydrocolloids, 2006. **20**(5): p. 577-585.
91. Gombotz, W.R. and S.F. Wee, *Protein release from alginate matrices*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. **64**, Supplement(0): p. 194-205.
92. Teotia, S., S.K. Khare, and M.N. Gupta, *An efficient purification process for sweet potato beta-amylase by affinity precipitation with alginate*. Enzyme and Microbial Technology, 2001. **28**(9-10): p. 792-795.

93. Zhang, S., F. Xu, Y. Wang, W. Zhang, X. Peng and F. Pepe, *Silica modified calcium alginate-xanthan gum hybrid bead composites for the removal and recovery of Pb(II) from aqueous solution*. Chemical Engineering Journal, 2013. **234**(0): p. 33-42.
94. Sookkasem, A., S. Chatpun, S. Yuenyongsawad and R. Wiwattanapatapee, *Alginate beads for colon specific delivery of self-emulsifying curcumin*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2015. **29**: p. 159-166.
95. Diós, P., S. Nagy, S. Pál, T. Pernecker, B. Kocsis, F. Budán, I. Horváth, K. Szigeti, K. Bolcskei, D. Máthé and A. Dévay, *Preformulation studies and optimization of sodium alginate based floating drug delivery system for eradication of Helicobacter pylori*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2015. **96**: p. 196-206.
96. Damelin, L.H., M.A. Fernandes, and C.T. Tiemessen, *Alginate microbead-encapsulated silver complexes for selective delivery of broad-spectrum silver-based microbicides*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2015. **46**(4): p. 394-400.
97. Kulkarni, A.R., K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.M. Dave and M.H. Mehta, *Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application*. Journal of Controlled Release, 2000. **63**(1-2): p. 97-105.
98. Hondrum, S.O. and R. Fernandez Jr, *Effects of long-term storage on properties of an alginate impression material*. The Journal of Prosthetic Dentistry, 1997. **77**(6): p. 601-606.
99. Harris Jr, W.T., *Water temperature and accuracy of alginate impressions*. The Journal of Prosthetic Dentistry, 1969. **21**(6): p. 613-617.
100. Yoon, S.-J., D.-C. Chu, and L. Raj Juneja, *Chemical and Physical Properties, Safety and Application of Partially Hydrolyzed Guar Gum as Dietary Fiber*. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2008. **42**(1): p. 1-7.
101. Rana, V., R. Parshuram, A.K. Tiwary, R.S. Singh, J.F. Kennedy and C.J. Knill, *Modified gums: Approaches and applications in drug delivery*. Carbohydrate Polymers, 2011. **83**(3): p. 1031-1047.

102. Chudzikowski, R.J., *Guar gum and its applications*. J. Soc. Cosmet. Chem., 1971. **22**: p. 43-60.
103. Roy, I., M. Sardar, and M.N. Gupta, *Cross-linked alginate–guar gum beads as fluidized bed affinity media for purification of jacalin*. Biochemical Engineering Journal, 2005. **23**(3): p. 193-198.
104. Mudgil, D., S. Barak, and B. Khatkar, *Guar gum: processing, properties and food applications—A Review*. Journal of Food Science and Technology, 2014. **51**(3): p. 409-418.
105. Wirnt, R., *Methods of Enzymatic Analysis, 2nd Ed.* 1974, Academic Press Inc.: New York.
106. Gildberg, A. and K. Øverbø, *Purification and characterization of pancreatic elastase from Atlantic cod (Gadus morhua)*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1990. **97**(4): p. 775-782.
107. Aitken, A. and M. Learmonth, *Protein Determination by UV Absorption*, in *The Protein Protocols Handbook*, J. Walker, Editor. 2002, Humana Press. p. 3-6.
108. Walker, J.M., *The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation: The Protein Protocols Handbook*, J.M. Walker, Editor. 2002, Humana Press. p. 11-14.
109. DuBois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith, *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. Analytical Chemistry, 1956. **28**(3): p. 350-356.
110. Alvarez, E., P. Risso, C. Gatti, M. Armesto, M. Burgos and V. Relling, *Effects of citrate on the composition and enzymic coagulation of colloidal bovine casein aggregates*. Colloid & Polymer Science, 2006. **284**(9): p. 1016-1023.
111. Boeris, V., D. Romanini, B. Farruggia and G. Picó, *Interaction and complex formation between catalase and cationic polyelectrolytes: Chitosan and Eudragit E100*. International Journal of Biological Macromolecules, 2009. **45**(2): p. 103-108.
112. McDonald, P., C. Victa, J.N. Carter-Franklin and R. Fahrner, *Selective antibody precipitation using polyelectrolytes: A novel approach to the purification of monoclonal antibodies*. Biotechnology and Bioengineering, 2009. **102**(4): p. 1141-1151.

113. Boeris, V., B. Farruggia, D. Romanini and G. Picó, *How Flexible Polymers Interact with Proteins and Its Relationship with the Protein Separation Method by Protein-Polymer Complex Formation*. The Protein Journal, 2009. **28**(5): p. 233-239.
114. Lakowicz, J., ed. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 1994, Plenum press.
115. Lumry, R. and H. Eyring, *Conformation Changes of Proteins*. The Journal of Physical Chemistry, 1954. **58**(2): p. 110-120.
116. Picó, G.A., *Thermodynamic features of the thermal unfolding of human serum albumin*. International Journal of Biological Macromolecules, 1997. **20**(1): p. 63-73.
117. Fersht, A.R., *Denaturation (Proteins)*, in *Encyclopedia of Genetics*, B. Editors-in-Chief: Sydney and H.M. Jeffrey, Editors. 2001, Academic Press: New York. p. 529.
118. Camilloni, C., A.G. Rocco, I. Eberini, E. Gianazza, R.A. Broglia and G. Tiana, *Urea and Guanidinium Chloride Denature Protein L in Different Ways in Molecular Dynamics Simulations*. Biophysical Journal. **94**(12): p. 4654-4661.
119. Eftink, M.R. and C.A. Ghiron, *Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies*. Biochemistry, 1976. **15**(3): p. 672-680.
120. Myers, J.K., C. Nick Pace, and J. Martin Scholtz, *Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding*. Protein Science, 1995. **4**(10): p. 2138-2148.
121. McDonald, R.S., *Review: infrared spectrometry*. Analytical Chemistry, 1986. **58**(9): p. 1906-1925.
122. Pavia, D., G. Lampman, G. Kriz and J. Vyvyan, *Introduction to Spectroscopy*. 2008: Cengage Learning.
123. Faix, O., *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, in *Methods in Lignin Chemistry*, S. Lin and C. Dence, Editors. 1992, Springer Berlin Heidelberg. p. 83-109.
124. Rabe, M., D. Verdes, and S. Seeger, *Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces*. Advances in Colloid and Interface Science, 2011. **162**(1-2): p. 87-106.

125. Nakanishi, K., T. Sakiyama, and K. Imamura, *On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001. **91**(3): p. 233-244.
126. Lagergren, *About the theory of so-called adsorption of soluble substances. Zur theorie der sogenannten adsorption gelöster stoffe, Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens*. Band 24, 1898: p. 1-39.
127. Weber, W. and J. Morris, *Kinetics of adsorption on carbon from solution*. Journal of Sanitary Engineering Division, 1963: p. 31-59.
128. Wolman, F., G.J. Copello, A.M. Mebert, A.M. Targovnik, M.V. Miranda, A. Navarro del Cañizo, L.E. Diaz and O. Cascone, *Egg white lysozyme purification with a chitin-silica-based affinity chromatographic matrix*. European Food Research and Technology, 2010. **231**(2): p. 181-188.
129. Ncibi, M.C., *Applicability of some statistical tools to predict optimum adsorption isotherm after linear and non-linear regression analysis*. Journal of Hazardous Materials, 2008. **153**(1-2): p. 207-212.
130. Günay, A., B. Ersoy, S. Dikmen and A. Evcin, *Investigation of equilibrium, kinetic, thermodynamic and mechanism of Basic Blue 16 adsorption by montmorillonitic clay*. Adsorption, 2013. **19**(2-4): p. 757-768.
131. Dubin, P.L., J. Gao, and K. Mattison, *Protein Purification by Selective Phase Separation with Polyelectrolytes*. Separation & Purification Reviews, 1994. **23**(1): p. 1-16.
132. Mattison, K.W., P.L. Dubin, and I.J. Brittain, *Complex Formation between Bovine Serum Albumin and Strong Polyelectrolytes: Effect of Polymer Charge Density*. The Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(19): p. 3830-3836.
133. Boeris, V., D. Spelzini, J.P. Salgado, G. Picó, D. Romanini and B. Farruggia, *Chymotrypsin-poly vinyl sulfonate interaction studied by dynamic light scattering and turbidimetric approaches*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2008. **1780**(9): p. 1032-1037.
134. Mazzaferro, L., J.D. Breccia, M.M. Andersson, B. Hitzmann and R. Hatti-Kaul, *Polyethyleneimine-protein interactions and implications on protein stability*. International Journal of Biological Macromolecules, 2010. **47**(1): p. 15-20.

135. van de Weert, M., M.B. Andersen, and S. Frokjaer, *Complex Coacervation of Lysozyme and Heparin: Complex Characterization and Protein Stability*. Pharmaceutical Research, 2004. **21**(12): p. 2354-2359.
136. Joshi, S.B., T.J. Kamerzell, C. McNown and C.R. Middaugh, *The interaction of heparin/polyanions with bovine, porcine, and human growth hormone*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **97**(4): p. 1368-1385.
137. Sharma, V.K. and D.S. Kalonia, *Steady-state tryptophan fluorescence spectroscopy study to probe tertiary structure of proteins in solid powders*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003. **92**(4): p. 890-899.
138. Munishkina, L.A. and A.L. Fink, *Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2007. **1768**(8): p. 1862-1885.
139. Eftink, M., *Fluorescence Quenching Reactions*, in *Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*, T.G. Dewey, Editor. 1991, Springer US. p. 1-41.
140. Rao, M.S.N. and G. Kegeles, *An Ultracentrifuge Study of the Polymerization of α -Chymotrypsin*. Journal of the American Chemical Society, 1958. **80**(21): p. 5724-5729.
141. Gilleland, M.J. and M.L. Bender, *Kinetics of alpha-chymotrypsin dimerization*. Journal of Biological Chemistry, 1976. **251**(2): p. 498-502.
142. Cabra, V., R. Arreguin, R. Vazquez-Duhalt and A. Farres, *Effect of temperature and pH on the secondary structure and processes of oligomerization of 19 kDa alpha-zein*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2006. **1764**(6): p. 1110-1118.
143. Arakawa, T. and S.N. Timasheff, *Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding*. Biochemistry, 1984. **23**(25): p. 5912-5923.
144. Boeris, V., B. Farruggia, B. Nerli, D. Romanini and G. Picó, *Protein-flexible chain polymer interactions to explain protein partition in aqueous two-phase systems and the protein-polyelectrolyte complex formation*. International Journal of Biological Macromolecules, 2007. **41**(3): p. 286-294.

145. Chaiklahan, R., N. Chirasuwan, and B. Bunnag, *Stability of phycocyanin extracted from Spirulina sp.: Influence of temperature, pH and preservatives*. Process Biochemistry, 2012. **47**(4): p. 659-664.
146. Robertson, A.J., V. Conrad, and G. Moraes, *Stabilisation of carboxypeptidases in acid extracts of ovine pancreas*. Process Biochemistry, 2004. **39**(5): p. 615-621.
147. Galante, M., S. Belluzo, G. Picó and V. Boeris, *Interaction of catalase with carrageenan applied to its recovery from murine liver*. Separation and Purification Technology, 2013. **111**: p. 125-130.
148. Vieira, R.S. and M.M. Beppu, *Dynamic and static adsorption and desorption of Hg(II) ions on chitosan membranes and spheres*. Water Research, 2006. **40**(8): p. 1726-1734.
149. Devi, N. and D.K. Kakati, *Smart porous microparticles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex*. Journal of Food Engineering, 2013. **117**(2): p. 193-204.
150. Mudgil, D., S. Barak, and B.S. Khatkar, *X-ray diffraction, IR spectroscopy and thermal characterization of partially hydrolyzed guar gum*. International Journal of Biological Macromolecules, 2012. **50**(4): p. 1035-1039.
151. Soppirnath, K.S. and T.M. Aminabhavi, *Water transport and drug release study from cross-linked polyacrylamide grafted guar gum hydrogel microspheres for the controlled release application*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2002. **53**(1): p. 87-98.
152. Doğan, M. and M. Alkan, *Adsorption kinetics of methyl violet onto perlite*. Chemosphere, 2003. **50**(4): p. 517-528.
153. Doğan, M., Y. Özdemir, and M. Alkan, *Adsorption kinetics and mechanism of cationic methyl violet and methylene blue dyes onto sepiolite*. Dyes and Pigments, 2007. **75**(3): p. 701-713.
154. Dotto, G.L., V.M. Esquerdo, M.L.G. Vieira and L.A.A. Pinto, *Optimization and kinetic analysis of food dyes biosorption by Spirulina platensis*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012. **91**: p. 234-241.

155. Silva, C.O., R.P. Baptista, A.M. Santos, J.M.G. Martinho, J.M.S. Cabral and M.A. Taipa, *Adsorption of human IgG on to poly(N-isopropylacrylamide)-based polymer particles*. Biotechnology Letters, 2006. **28**(24): p. 2019-2025.
156. Ringot, D., B. Lerzy, K. Chaplain, J.P. Bonhoure, E. Auclair And Y. Larondelle, *In vitro biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: Comparison of isotherm models*. Bioresource Technology, 2007. **98**(9): p. 1812-1821.