

EMPLEO DE UN SISTEMA DE ANÁLISIS DE INYECCIÓN SECUENCIAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD AMIDASA

J.A. Hernández García^a, J. Pliego Sandoval^a, A.F. Sánchez Ortiz^a, G. Sandoval^a, E.J. Herrera-López^{a*}

^aUnidad de Biotecnología Industrial, CIATEJ A.C., Av. Normalistas No. 800, Col. Colinas de la Normal, Guadalajara, Jal., CP 44270, México. *eherrera@ciatej.mx

Resumen

En el presente trabajo se utilizó un sistema de análisis de inyección secuencial (SIA) para evaluar la actividad amidasa de dos extractos enzimáticos comerciales, sobre el sustrato sintético N- α -benzoyl-DL-arginina-*p*-nitroanilina (BAPNA). La actividad enzimática ensayada sobre BAPNA se determinó con el equipo de análisis de inyección secuencial siguiendo la formación del cromóforo *p*-Nitroanilina (pNA). La validación de las lecturas del equipo se realizó comparando los resultados con un lector de microplacas.

Introducción.

La tripsina es una serin-proteasa que hidroliza enlaces peptídicos de la arginina y lisina, además de los enlaces éster y amida. La actividad amidolítica de tripsina se puede medir sobre un sustrato sintético: BapNA [1]. Como resultado de la hidrólisis de este sustrato, se produce pNA (Figura 1a). La absorbancia máxima de la pNA es a 415 nm. Midiendo en un espectrofotómetro a esta longitud de onda, se obtiene la velocidad de aparición y esta tasa es proporcional a la actividad de la tripsina. Posteriormente, utilizando el coeficiente de extinción de la pNA, es posible calcular la actividad de la tripsina en unidades internacionales (1U= μ molproducto/minuto). En los últimos años se han utilizados técnicas de laboratorio para determinar la actividad amidasa, las cuales requieren considerables cantidades de reactivo y el análisis se realiza fuera de línea [2]. Equipos de monitoreo como el análisis de inyección secuencial (SIA, por sus siglas en inglés), introducido por Ruzicka y Marshall en 1990 [3] han surgido como una alternativa a los métodos convencionales. Dicha técnica se basa en la aspiración secuencial de volúmenes precisos de muestra y reactivos que se conducen, mediante un acarreador (H₂O), hacia un bucle de carga donde permanecen en contacto hasta que se hacen pasar, a través de un bucle de reacción al detector (Figura 1b). En este trabajo se utilizó un SIA diseñado en el laboratorio de Biotecnología Industrial del CIATEJ A.C. como una alternativa para la determinación de la actividad amidasa en línea que podría ser utilizado durante el cultivo de microorganismos en reactores de fermentación líquida.

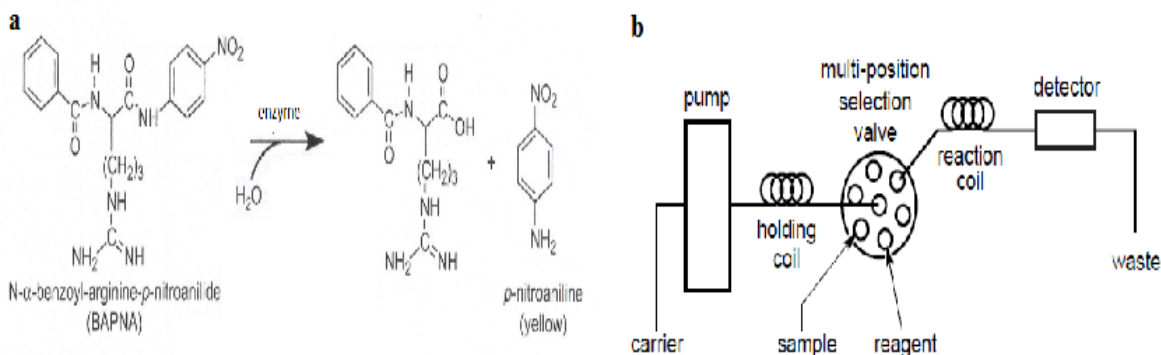


Figura 1. a) Reacción de la formación de *p*-NA a partir del sustrato sintético BAPNA; b) Esquema del sistema de análisis de inyección secuencial

Metodología

Solución reactiva: Se preparó una solución A, disolviendo BapNA(Sigma B4875) en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 10mM. La solución B consistió un buffer de fosfatos 50mM a pH 7. La solución reactiva se prepara al instante mezclando 18 volúmenes de solución B con un volumen de solución A, agregada gota a gota y agitando a 2500 rpm con ayuda de un Vortex-Genie 2[®], Daigger[®].

Extractos enzimáticos: Se utilizaron dos extractos enzimáticos comerciales diferentes: látex de *Carica papaya* (sigma P3375) y pancreatina porcina (sigma P7545).

Cinéticas de actividad amidasa en el sistema SIA: La soluciones A, B y los extractos enzimáticos se hicieron pasar a través de diferentes válvulas multiposición, las cuales fueron programadas para recrear la metodología de un ensayo convencional de actividad amidasa en el laboratorio. La secuencia obtenida para este experimento se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Metodología para la detección de la actividad amidasa en el sistema SIA.

<u>Tiempo(s)</u>	<u>Acción de bomba</u>	<u>Posición de válvula</u>	<u>Flujo (μL/s)</u>
<u>10</u>	<u>Inyección(Acarreador)</u>	<u>5</u>	<u>14.6</u>
<u>2</u>	<u>Succión(Solución B)</u>	<u>3</u>	<u>14.6</u>
<u>1</u>	<u>Succión(Solución A)</u>	<u>4</u>	<u>14.6</u>
<u>2</u>	<u>Succión(Solución B)</u>	<u>3</u>	<u>14.6</u>
<u>1</u>	<u>Succión(Extracto Enzimático)</u>	<u>2</u>	<u>14.6</u>
<u>1</u>	<u>Succión(Solución A)</u>	<u>3</u>	<u>14.6</u>
<u>20</u>	<u>Inyección(Acarreador)</u>	<u>19</u>	<u>14.6</u>
<u>30</u>	<u>Apagado</u>		=
<u>900</u>	<u>Encendido(espectrofotómetro)</u>	<u>USB400</u>	=
<u>20</u>	<u>Inyección(Solución Final)</u>	<u>19</u>	<u>14.6</u>

Cinéticas de actividad amidasa en microplaca: Una parte de extracto enzimático diluido convenientemente se mezcla con la solución reactiva justo antes del ensayo. Los ensayos se llevaron a 30°C por triplicado en un lector de microplacas X-Mark[™] de BIO-RAD, durante 15 minutos a una longitud de onda de 415 nm.

Resultados

Para la cuantificación de la actividad amidasa una curva estándar de pNA es necesaria para conocer el coeficiente de extinción molar. Se tomaron concentraciones conocidas de pNA hasta generar un gradiente de absorbancias que permita correlacionarlas con la concentración de pNA desprendida en las cinéticas. La curva fue medida en un espectrofotómetro de celdas, GENESYS 10_{UV}[™] de Thermo y en el equipo SIA, a manera de determinar el factor de dispersión del equipo y poder determinar con mayor exactitud los ensayos. Para la comparación de los cálculos de actividad, curvas y cinéticas fueron realizados en paralelo en el lector de microplacas antes mencionado.

En la Figura 2A se muestra la calibración con el barrido inicial, para determinar el tiempo que le toma en llevar la muestra al espectro. En la 2B se observan los perfiles de

absorbancia de las diferentes concentraciones conocidas de pNA generados con el SIA. En la Figura 3C se observan los máximos de absorbancia para la pNA en el SIA. De esta forma se pudo obtener una curva estándar para determinar el coeficiente de extinción molar y poder cuantificar la aparición de este compuesto que nos permita determinar la actividad amidasa.

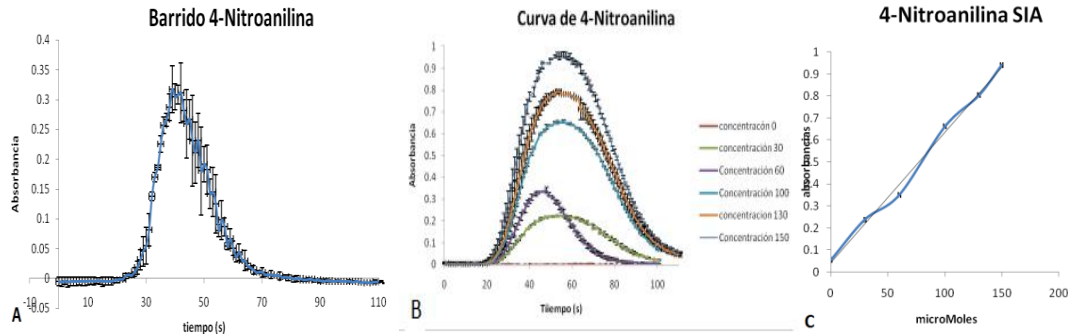


Figura 2. Gráficas obtenidas del equipo SIA para la curva estándar. **A)** barrido de la absorbancia con respecto al tiempo. **B)** Gráfica que muestra la curva de estándar de pNA **B)** Gráfica que muestra el máximo de absorbancia de cada punto en la curva de estándar de pNA

Los valores obtenidos del SIA y del espectrofótomero de celdas. nos ayudan a conocer el factor de dispersión del equipo. Esta dispersión es consecuencia del gradiente de concentraciones en las orillas del volumen de reacción que están en contacto con el acarreador (agua), que cambia dependiendo de las condiciones de operación, tales como volumen de inyección y velocidades. Esto se define de la siguiente manera: $D = D_0 / D_{max}$, donde D_0 es la absorbancia inicial, es decir la absorbancia obtenida en el espectro de celdas, D_{max} es la absorbancia máxima obtenida por el equipo [4], dando como resultado una $D = 1.37$, a una velocidad de $14.6 \mu\text{Ls}^{-1}$ y un volumen de reacción de $294 \mu\text{L}$.

Las Figuras 3A y 3B muestran las cinéticas de actividad amidasa así como las pendientes obtenidas con el sistema SIA para la pancreatina porcina (PP) y el látex de *Carica papaya* (LCP), respectivamente.

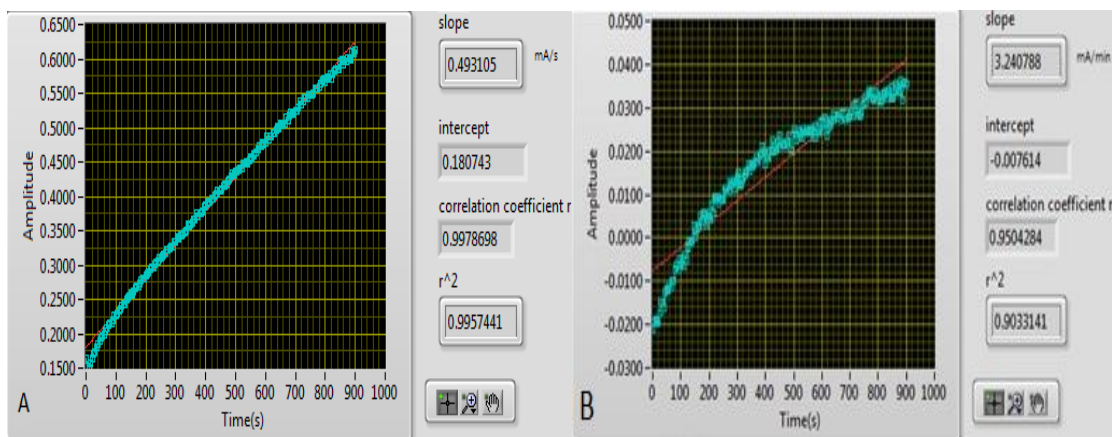


Figura 3. Gráficas obtenidas del equipo SIA **A)** Cinética 15 min de pancreatina porcina. **B)** Cinética 15 min de latex de *Carica papaya*.

Las actividades fueron cuantificadas con el método en microplaca y SIA. Para determinar la actividad real se multiplicó por el factor de dispersión del equipo, tanto las actividades como el porcentaje de error en el ensayo se reportan a continuación en la Tabla 2

Tabla 2. Cálculos de actividad amidasa en el sistema SIA y Microplaca.

	SIA U/g	(SIA)(D) U/g	Microplaca U/g	% Error
PP	27.4±0.32	37.5±0.4	35.6±3.3	5.3
LCP	248.14±19.7	339.9±27.1	419.8±14.2	19

Conclusiones

A pesar de mostrar algunas diferencias de cuantificación de actividad respecto al método de referencia en microplaca, el sistema SIA puede ser empleado para el monitoreo y control en continuo de la actividad amidasa en bioprocesos.

La exactitud de las mediciones puede ser optimizada, esto ocurre si se modifican las condiciones de operación como son diferentes volúmenes de reacción y las diferentes velocidades en el flujo. A destacar que volúmenes mayores en los reactivos y en las muestras, así como velocidades de flujo bajas aumenta la precisión y disminuye el porcentaje de error del ensayo. Por lo que el porcentaje de error se considera aceptable y encuentra su justificación con el uso de cantidades de inyección menores, que reducen el gasto en los reactivos, y a su vez reduce los volúmenes requeridos de muestra.

Agradecimientos.

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca de maestría 290747, y por el apoyo al proyecto del Fondo Sectorial Ciencia Básica 128894.

Referencias

1. Erlanger B.F., Kokowsky N. and Cohen W., *The preparation and properties of two new chromogenic substrate of trypsin*. Arch. Biochem. Biophys., 1961. 95: p. 271-278.
2. Galindo-Estrella T., Hernández-Gutierrez R., Mateos-Díaz J.C., Sandoval-Fabián G., Chel-Guerrero L., Rodríguez-Buenfil I. and Gallegos-Tintoré S., *Proteolytic activity in enzymatic extracts from Carica papaya L. cv. Maradol harvest by-products*. Process Biochemistry, 2009. 44: p. 77-82.
3. J.Ruzicka, G. Marshall, *Anal. Chim. Acta* 273(1990)329.
4. *Flow Injection Analysis By Jaromír Ruzicka. Chapter 2, page 24. John Wiley & Sons, 1988*