

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

ESTUDIO DEL SISTEMA DE DOS FASES ACUOSAS PARA LA INTEGRACIÓN DE LOS PROCESOS FERMENTACIÓN-PURIFICACIÓN

Laura Varas Sarzo^I, Analeydis García Labaceno^{II}, Yanay Proenza Jimenez^{III}, Laydel Espinosa Martínez^{IV}, Victoria M. Lugo Hernández^V, Jorge Valdés Hernández^{VI}.

^I Ingeniera Química. Máster en Ingeniería de los Procesos Biotecnológicos.

Biotecnóloga de Segundo nivel. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba. laura.varas@cigb.edu.cu

^{II} Ingeniera Química. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba.

^{III} Ingeniera Química. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba.

^{IV} Ingeniero Químico. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

^V Licenciada en Microbiología. Tecnóloga de Segundo nivel. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba.

^{VI} Ingeniero Químico. Doctor en Ciencias Técnicas. Biotecnólogo de Primer nivel. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba.

Resumen

El sistema de dos fases acuosas tiene gran potencial como método de separación de alta productividad y resulta económico en la obtención de productos biotecnológicos. La aplicación de este sistema no se ha expandido debido al extenso trabajo de desarrollo experimental necesario para establecer los parámetros óptimos que aseguren la partición selectiva del producto de interés. El objetivo de este trabajo es estudiar el comportamiento de la partición de las proteínas contaminantes y la proteína de interés, utilizando PEG 4000/K₂HPO₄, mediante la evaluación de diferentes longitudes de línea de enlace (TLL), pH y concentraciones de NaCl como aditivo. Se tomó como modelo la cepa *Escherichia coli* BL21 transformada con el vector negativo y como proteína de interés, un anticuerpo de simple cadena que se aplicará a la enfermedad denominada degeneración macular asociada a la edad. Se realizaron diseños experimentales de un solo factor categórico y se utilizó como alimentación del sistema en un caso, el cultivo con la cepa negativa y en el otro, la proteína proveniente del proceso de gel-filtración. Se determinó la concentración de proteínas totales por microcoomassie a las fases formadas, para luego calcular la selectividad. Se obtuvo como resultado que en el sistema de dos fases acuosa PEG 4000/ K₂HPO₄ debe trabajarse a TLL=15% (m/m), pH=6.0 y el aditivo al 10% (m/m) para lograr la mejor selectividad. Esto permitirá aplicarlo al proceso de fermentación una vez terminado, lo cual posibilitará la integración de dos operaciones unitarias.

Palabras clave: Sistema de dos fases acuosas, Polietilenglicol, integración de procesos.

Abstract

The aqueous two-phase system has great potential as a method of separation of high productivity and economic for biotechnology products. The application of these systems has not been expanded because of the extensive experimental development work necessary to establish the optimal parameters of the system to ensure the selective partition of the product of interest. The aim of this paper is to study the behavior of the partition of the contaminating proteins and the protein of interest using 4000/K₂HPO₄, by evaluating different tie length line (TLL), pH and concentrations of NaCl as an additive. It was modeled with the strain *Escherichia coli* BL21 transformed with the negative vector and with the protein of interest, a single chain antibody to be applied to the disease called macular degeneration associated with age. Were performed experimental designs on a single categorical factor and system feed in one case was, the cultivation with negative strain and the other, the protein from the gel-filtration process. The concentrations of total proteins were determined by microcoomassie to the phases formed, and then calculate the selectivity. Was obtained as a result that in the aqueous two-phase system PEG 4000 / K₂HPO₄ must work to TLL = 15% (m/m), pH= 6.0 and the additive to 10% (m/m) to achieve better selectivity. This will apply to the fermentation process once finished; which will enable the integration of two unit operations.

Keywords: aqueous two-phase system, polyethylene glycol, process integration.

Introducción

Los sistemas de dos fases acuosas están compuestos por soluciones acuosas de polímeros solubles en agua o por un polímero y una sal; pueden ser utilizados tempranamente en el proceso de purificación con soluciones que contienen células o restos celulares. Este sistema líquido-líquido es formado al mezclar dos sustancias solubles en agua, las cuales al superar cierta concentración se vuelven inmiscibles entre sí, dando como resultado la formación de dos fases. Existen sistemas polímero – polímero (polietilenglicol (PEG) – Dextrano y PEG – Polivinil alcohol, entre otros); sin embargo, el uso de dichos sistemas está limitado por los costos de algunos polímeros (principalmente dextrano). Adicionalmente, el PEG forma sistemas de dos fases acuosas cuando es mezclado con solución salina concentrada (PEG – fosfato de potasio y PEG – sulfato de sodio, entre otros)¹. Debido a su bajo costo y corto tiempo de separación los sistemas PEG – sal son frecuentemente empleados. Los sistemas de dos fases acuosas más utilizados y mejor caracterizados son los formados por PEG – fosfato de potasio. En años recientes, el interés sobre la aplicación de estos sistemas como método de recuperación primaria y purificación parcial de compuestos biológicos ha aumentado notablemente. Entre las principales ventajas que ofrece esta técnica de recuperación se encuentran: alta eficiencia, factibilidad de escalamiento, bajos costos de inversión y operación y permitir generalmente la recuperación y purificación de compuestos biológicos en su forma nativa, lo cual es de gran valor, ya que al conservar la estructura se conserva al mismo tiempo su función específica².

Es necesario en el proceso tecnológico para la obtención de la molécula de CIGB166, la implementación de condiciones de semipurificación suaves y no desnaturalizantes

que garanticen la calidad de la molécula en cuanto a su actividad biológica y un alto rendimiento que satisfaga las necesidades de producto para los estudios clínicos, por lo cual la aplicación de un sistema de dos fases sería la solución a este problema planteado.

El objetivo del presente trabajo es estudiar el comportamiento de la partición de las proteínas contaminantes y la proteína de interés utilizando el sistema de dos fases acuosas formado por PEG 4000/K₂HPO₄, mediante la evaluación de diferentes longitudes de línea de enlace (TLL), pH y concentraciones de NaCl como aditivo.

Métodos

Se realizaron diseños experimentales de un solo factor categórico y se utilizó como alimentación del sistema, en un caso, el cultivo de la cepa negativa crecida en medio químicamente definido y en el otro, la proteína de interés proveniente del proceso de gel-filtración en tampón acetato de sodio 50 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, pH=4,0. Las fases se formaron mediante una mezcla de PEG 4000/ K₂HPO₄ en diferentes concentraciones (tabla 1), posteriormente se ajustó el pH, se agitaron por 30 min a 180 rpm y 25°C en una zaranda y por último, se centrifugaron a 1500 g por 10 min. La alimentación representó el 66 % (m/m) del sistema. Cada variante se hizo por duplicado. En el experimento 2 se procedió de igual forma, y se adicionó el NaCl después del K₂HPO₄ (tabla1). Ambos experimentos se estudiaron a pH =6,0 y pH=9,5. A las muestras tomadas de ambas fases se les determinó la concentración de proteínas por microcoomassie. Este método se basó en la determinación de las absorbancias de las muestras dadas a longitudes de ondas, 620-450 nm respectivamente, ello mejora considerablemente la sensibilidad y linealidad de la curva

de calibración en pequeñas concentraciones de proteínas. Posteriormente se calcula la selectividad según la siguiente fórmula: $\alpha = \frac{C_{P FL} \cdot C_{C FP}}{C_{P FP} \cdot C_{C FL}}$, donde $C_{P FL}$ es la concentración de la proteína en la fase ligera, $C_{P FP}$ es la concentración de la proteína en la fase pesada, dichas concentraciones se obtienen cuando se alimenta el sistema con la proteína proveniente del proceso de gel-filtración. $C_{C FL}$ es la concentración de proteínas totales en la fase ligera y $C_{C FP}$ es la concentración de proteínas totales en la fase pesada. Estos últimos valores se obtienen cuando se alimenta el sistema con el cultivo de la cepa negativa.

Resultados

En el experimento 1 se obtuvieron los siguientes resultados: a altos valores de la línea de enlace se evidenció para ambos pH estudiados que disminuyó la selectividad del sistema (Fig. 1 y 2). Por lo que se fijó para el segundo experimento, la TLL a 15% para ver la influencia de la adición de NaCl sobre el sistema. Se observó que a mayor concentración del aditivo se favorecía la selectividad del sistema ya sea con pH =6 como con pH=9.5 (Fig. 3 y 4). En la variante de mayor concentración de NaCl del experimento 2, al comparar la selectividad en cada valor de pH estudiado, se observó que con pH=6,0 la selectividad es mayor que cuando se utiliza pH=9,5.

Discusión

La proteína de interés en este trabajo es un anticuerpo de simple cadena que se aplicará a la enfermedad denominada degeneración macular asociada a la edad. Esta proteína tiene un peso molecular de 28 kDa y es hidrofílica.

Los resultados del experimento 1 mostraron que el aumento de la TLL, parámetro directamente relacionado con la concentración de polímero y sal, disminuye la afinidad

de la proteína de interés hacia la fase ligera, pues al aumentar la concentración de PEG en ella, mayor es el volumen excluido de la misma y provoca un aumento de la hidrofobicidad. Resultados similares fueron obtenidos por Benavides y Rito – Palomares³ en los compuestos hidrofílicos de altos peso molecular.

Para mejorar los resultados del proceso se recomienda la utilización de sales neutrales como el NaCl. Esta sal incrementa la migración de compuestos moleculares de talla menor de 50 kDa hacia la fase rica en el polímero⁴. Como se evidenció en este trabajo, el aumento de la concentración de NaCl incrementó la selectividad del sistema de dos fases acuosas

Por todo lo anterior, se puede concluir que en el sistema de dos fases acuosas PEG 4000/ K_2HPO_4 debe trabajarse con TLL=15% (m/m), pH=6,0 y NaCl como aditivo al 10% (m/m) para lograr la mejor selectividad. Ello permitirá aplicarlo al proceso de fermentación una vez terminado, lo cual posibilitará la integración de dos operaciones unitarias.

Referencias bibliográficas

- 1- Albertsson PA, Johansson G, Tjerneld F. Aqueous Two-Phase Separations. In: Asenjo JA (Ed). *Separation in Biotechnology*. Dekker, New York, 1990; 2: 287-327.
- 2- Rito-Palomares M. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *Journal of Chromatography* 2004; 807: 3-11.
- 3- Benavides J, Rito-Palomares M. Aplicación genérica de sistemas de dos fases acuosas polietilenglicol-sal para el desarrollo de procesos de recuperación primaria de compuestos biológicos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2008; 7: 99-110.
- 4- Benavides J, Rito-Palomares M. Practical experiences from the development of aqueous two-phase processes for the recovery of high value biological products. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*. 2008; 83: 133-42.

Tabla 1. Composición del sistema de dos fases acuosas para los experimentos 1 y

2.

Experimento 1			
TLL(%m/m)	PEG 4000 (%m/m)	K₂HPO₄ (%m/m)	NaCl (%m/m)
15	14,6	9,4	-
20	15,6	9,9	-
25	16,8	10,5	-
30	18,1	11,2	-
35	19,7	12,0	-
40	21,5	12,9	-
45	23,3	13,8	-
50	25,3	14,8	-
Experimento 2			
TLL (%m/m)	PEG 4000 (%m/m)	K₂HPO₄ (% m/m)	NaCl (% m/m)
15	14,6	9,4	0
15	14,6	9,4	2,5
15	14,6	9,4	5,0
15	14,6	9,4	7,5
15	14,6	9,4	10,0

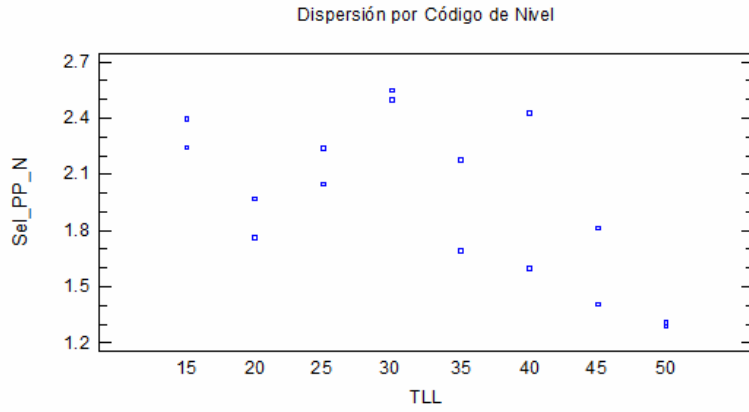


Figura 1. Influencia del TLL sobre la selectividad del sistema a pH=6,0

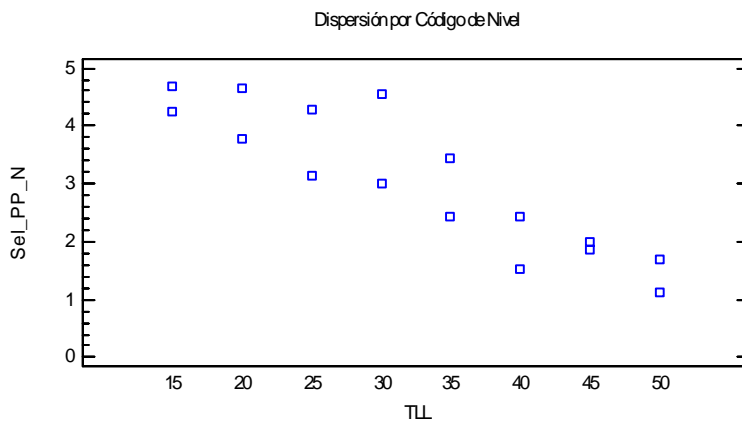


Figura 2. Influencia del TLL sobre la selectividad del sistema a pH=9,5

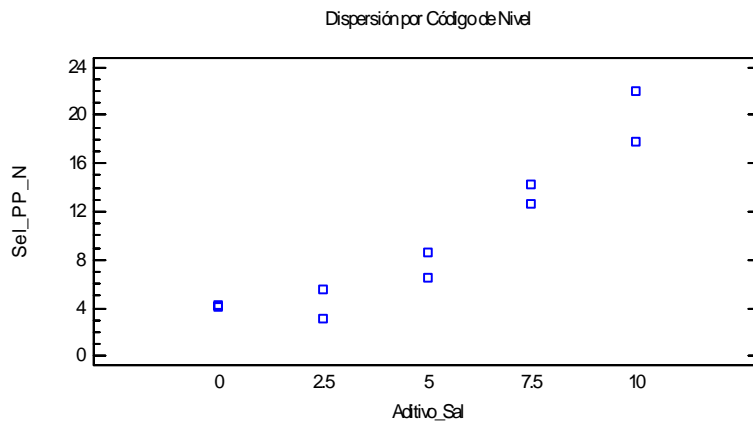


Figura 3. Influencia de la concentración del NaCl sobre la selectividad del sistema a pH=6,0

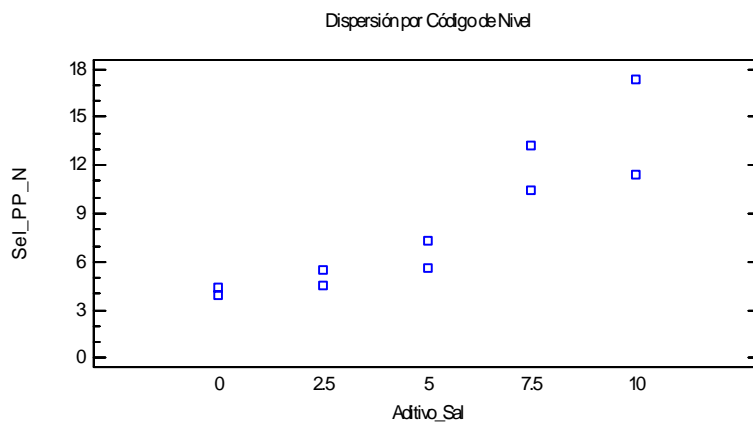


Figura 4. Influencia de la concentración del NaCl sobre la selectividad del sistema a pH=9,5