

## CARACTERIZACIÓN TRIDIMENSIONAL DE EXTRACTOS PROTÉICOS DE ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA*)

Oscar Aguilar<sup>1</sup>, Charles E. Glatz<sup>2</sup>, Marco Rito-Palomares<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología e Ingeniería de Alimentos, Centro de Biotecnología, Tecnológico de Monterrey. Campus Monterrey, Ave. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, NL 64849, México. e-mail: *mrito@itesm.mx*

<sup>2</sup> Department of Chemical and Biological Engineering, 2114 Sweeney Hall, Iowa State University, Ames, Iowa 50011-2230, U.S.A.

Palabras clave: *proteína, alfalfa, electroforesis, APTS*

**Introducción.** Para facilitar la aceptación general de las plantas como biorreactores, el establecimiento de operaciones de recuperación y purificación eficientes resulta crítico. Se ha propuesto que un mejor entendimiento de las propiedades de las proteínas contaminantes beneficiaría el diseño y operación de etapas de purificación<sup>1</sup>. La aplicación conjunta de la electroforesis 2D (2DE) con los sistemas de dos fases acuosas (SDFA) se propone como un método práctico para la caracterización tridimensional de potenciales proteínas contaminantes de extractos vegetales.

En el presente trabajo se establece la metodología para la caracterización tridimensional de proteínas de extractos del tejido verde de alfalfa. La adición de una proteína objetivo al extracto crudo ilustra la aplicación genérica de esta metodología para la recuperación de una proteína recombinante de extractos vegetales.

**Metodología.** Se adaptó la metodología descrita por Gu y Glatz (2007) para la caracterización de proteínas de maíz para caracterizar las proteínas extraídas del tejido verde de *Medicago sativa*<sup>2</sup>. La partición de las proteínas de alfalfa en SDFA se llevó a cabo en un sistema PEG 3350 (14.8% p/p) y fosfato de potasio (10.3% p/p). Muestras de cada fase fueron sometidas a precipitación con ácido tricloroacético previo a la electroforesis de dos dimensiones. El análisis de los geles por densitometría permitió determinar Mr, pI y la hidrofobicidad de proteínas individuales expresada como Log Kp en el SDFA. Se aplicó esta metodología a un extracto complejo de alfalfa conteniendo una proteína modelo (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, rGM-CSF).

**Resultados y discusión.** Mediante la aplicación de esta metodología a un extracto crudo de alfalfa, fue posible elaborar un gráfico tridimensional con las propiedades moleculares Mr, pI y una escala de hidrofobicidad Log Kp obtenida a partir del SDFA (Figura 1). El SDFA empleado permitió la caracterización del 69% de las proteínas totales distribuidas en ambas fases, permitiendo la obtención de sus propiedades moleculares. La presencia de enzimas fotosintéticas, así como una proteína modelo recombinante en el extracto (rGM-CSF) presentó un reto para la aplicación potencial de esta técnica a un extracto

recombinante donde una cantidad relativamente baja de la proteína objetivo pudiera estar presente. El uso de los mapas tridimensionales para el análisis del perfil de proteínas permitió la identificación de las propiedades moleculares de las principales proteínas contaminantes. Tal información facilitará el establecimiento de condiciones de pre-fraccionamiento y purificación para el procesamiento de extractos de tejido verde.

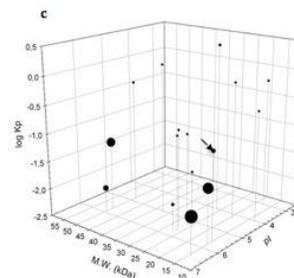


Fig. 1. Gráfico Tridimensional de las proteínas del tejido verde de alfalfa.

**Conclusiones.** Un método de caracterización tridimensional fue aplicado a proteínas de tejido verde de alfalfa proporcionando información sobre las propiedades moleculares de un gran número de proteínas del hospedero. El método permitió obtener un gráfico tridimensional para las principales proteínas de alfalfa, caracterizadas por Mr y pI de los geles 2D y una tercera dimensión, la hidrofobicidad, obtenida de los SDFA. La información obtenida de esta estrategia experimental fue útil para la identificación de las potenciales proteínas contaminantes que se presentarían en alfalfa cuando esta planta sea empleada como hospedero para la producción de proteínas recombinantes.

**Agradecimientos.** A la cátedra de Investigación en Bioingeniería y nano-biopartículas 020CAT161.

**Bibliografía.** 1. Asenjo, JA, Andrews, BA. (2004) Is there a rational method to purify proteins? From expert systems to proteomics. *J. Mol. Recognit.* 17:236-247.  
2. Gu, Z, Glatz, CE. (2007). A method for three-dimensional protein characterization and its application to a complex plant (corn) extract. *Biotechnol. Bioeng.* 97:1158-1169.