



## REFOLDING DE LACASA UTILIZANDO SISTEMAS DE DOS FASES ACUOSAS.

Calef Sánchez-Trasviña, Karla Mayolo-Deloisa, José González-Valdez, Marco Rito-Palomares.  
Centro de Biotecnología-FEMSA, Tecnológico de Monterrey, Monterrey, N.L. C.P. 64849. [kmayolo@itesm.mx](mailto:kmayolo@itesm.mx).

*Palabras Clave: Refolding, Lacasa, Fases Acuosas.*

**Introducción.** El refolding es considerado el paso limitante en la recuperación de proteínas activas de cuerpos de inclusión (1). Es por ello que se ha convertido en un nuevo campo de estudio, en el cual se han desarrollado diversas metodologías para mejorar su rendimiento (2). Entre estos, se ha demostrado que el polietilenglicol (PEG) se une como intermediario a la proteína promoviendo el refolding apropiado, por lo que se sugiere cumple una función análoga a la de las chaperonas en el refolding *in vivo* (3). Considerando lo anterior, Rahimpour *et al.* (2007) utilizaron sistemas de dos fases acuosas usando cloruro de guanidinio (CG) como agente caotrópico logrando recuperar xilanasa recombinante en estado activo (1). Por su parte, la lacasa (E.C.1.10.3.2) una fenol oxidasa, es una enzima que tiene aplicaciones biotecnológicas tales como: biorremediación, designificación y aplicaciones médicas, entre otras, por lo cual resulta atractiva para la producción a gran escala de manera económica (4) garantizando siempre su correcto plegamiento. El objetivo del presente trabajo es caracterizar la partición y refolding de lacasa en sistemas de dos fases acuosas PEG – fosfato de potasio.

**Metodología.** Se construyeron sistemas PEG – fosfato de 2 g variando el peso molecular (PM) del PEG (400, 1000, 3350 y 8000 g/mol), la longitud de línea de corte (LLC, 15, 25, 35 y 45 % p/p) y la relación de volúmenes ( $V_R$ , 0.33, 1 y 3). Se agregaron 200  $\mu$ L de una solución de lacasa de 10 mg/mL con cloruro de guanidinio (CG) 4 M, se incubó a 30 rpm durante 1 hora, se midió el volumen de cada fase y se cuantificó la cantidad de proteína presente en cada una midiendo absorbancia a 280nm. Posteriormente, se midió la actividad enzimática en cada fase siguiendo el cambio en la densidad óptica a 436 nm usando ABTS como sustrato y un coeficiente de extinción molar  $\epsilon_{436} = 29,300 / M \text{ cm}$  (5).

**Resultados.** La partición de lacasa desnaturalizada se muestra en la Fig. 1; teniendo una partición con rangos en el logaritmo de su coeficiente de partición ( $\ln K_p$ ) de -1.1 a 2.1, con una preferencia a la fase rica en polímero, siendo la más alta en el sistema PEG 400 g/mol con LLC de 45% p/p y  $V_R$  0.33. La proteína en estado nativo mostró el mismo comportamiento pero con mayor afinidad a la fase superior. El refolding observado (Fig. 2), tuvo un máximo de 33% en la fase superior el sistema PEG 1000 g/mol con LLC de 45% p/p, mientras en la fase inferior el máximo fue de 16% con PEG 400 g/mol y LLC de 45% p/p, en ambos casos con  $V_R$  0.33.

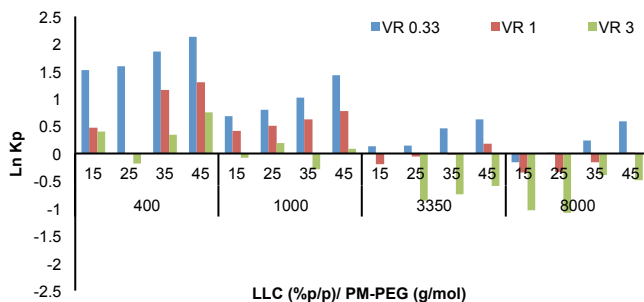


Fig. 1. Partición de lacasa desnaturalizada con 4M de CG.

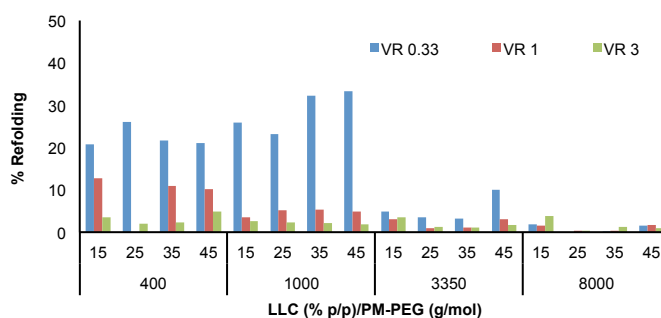


Fig. 2. Porcentaje de refolding de lacasa en fase superior.

**Conclusiones.** La lacasa tiene afinidad por la fase inferior, la cual aumenta conforme lo hace la LLC y disminuye a medida que aumenta el PM del PEG y  $V_R$ . En estado desnaturalizado, esta afinidad disminuye. El refolding es menos eficiente, sin embargo, la presencia de grupos prostéticos hace más complejo el proceso de refolding generando porcentajes bajos (<35%).

**Agradecimiento.** Los autores agradecen el financiamiento otorgado al grupo con enfoque estratégico en Bioprocesos y Biología Sintética del Tecnológico de Monterrey (0821C01004).

### Bibliografía.

1. Rahimpour F., Mamo G., Feyzi F., Maghsoudi S., Hatti-Kaul R. 2007. J. of Chromatography A. Vol (1141): 32-40.
2. Cowgill C., G. Ozturk A., St. John R. 2007. Protein refolding and scale up. En: Process scale bioseparations for the biopharmaceutical industry. A. Shukla A., R. Etzel M., Gadam S. CRC. USA. 123-158.
3. L. Cleland J., Hedgepeth C., Wang D., 1992, J. of Biol. Chem. Vol (267): 13327-13334.
4. Bertrand B., Martínez-Morales F., Trejo-Hernández M.R., 2013, Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol (12): 473-488
5. Tinoco R., Pickard MA., Vazquez-Duhalt R., 2001. Lett Appl Microbiol. Vol (32):331-335.