



COMPARACION DE PROCESOS CROMATOGRÁFICOS Y DE FASES ACUOSAS: RECUPERACION DE PENICILA ACILASAS PRODUCIDA POR *E. COLI*.

Oscar Aguilar^a, Verónica Albiter^b, Leobardo Serrano-Carreón^b y Marco Rito-Palomares^a

^aCentro de Biotecnología, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Campus Monterrey, Ave. Eugenio Garza Sada 2501-Sur 64849, México, ^bInstituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, E-mail: mrito@itesm.mx

Palabras Clave: Penicilin acilasa, ATPS.

Introducción. La penicilina G acilasa (PGA) (E.C. 3.5.1.11) cataliza la hidrólisis de Penicilina G en ácido fenilacético (PAA) y ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), éste último es un importante precursor en la síntesis de algunos antibióticos β -lactámicos (1). PGA es una proteína periplásmica típicamente purificada a gran escala de lisados celulares usando columnas cromatográficas empacadas con celulosas modificadas o sefarosas (1). El alto costo que las resinas cromatográficas utilizadas en el proceso se puede potencialmente evitar mediante el uso de sistemas de dos fases acuosas (ATPS). Esta técnica de partición ha sido estudiada por diversos autores con numerosas enzimas y otras proteínas. El uso de ATPS para el aislamiento y purificación de PGA recombinante (rPGA), se ha reportado previamente (2) como una técnica eficiente para este propósito, sin embargo, existen pocos reportes específicos sobre las diferencias entre esta técnica y cromatografía enfocados en aspectos prácticos y económicos.

En el presente trabajo, se estableció un proceso prototipo con fases acuosas para la recuperación y purificación de penicilina acilasa de lisados celulares con el objetivo de efectuar un análisis comparativo técnico y económico entre ATPS y la técnica cromatográfica.

Metodología. El extracto de rPGA fue producido como se reporto previamente (1). Este extracto, con una actividad específica de 5.05 U/mg proteína, se empleó para preparar sistemas de dos fases acuosas PEG-Fosfato de potasio como se describe anteriormente (3). La concentración del extracto en los sistemas ATPS para pesos moleculares de 600 a 3350 g/gmol fue variada de 10 a 30% p/p. El comportamiento de partición de la enzima se determinó por mediciones de su actividad con el método del *p*-dimetilaminobenzaldehído (1). La proteína total se determinó por el método de Bradford.

Resultados y Discusión. En la Tabla 1 aparecen resultados preliminares que permiten una comparación inicial de ambos sistemas de producción.

Tabla 1. Parámetros de comparación en la purificación de rPGA mediante cromatografía y ATPS.

	Cromatografía iónica ¹	ATPS
% recuperación de enzima	89 %	62 %
Factor de purificación	5.71	1.57
Tipo de proceso	Semi continuo	Batch
Carga máxima	60 mg prot. /mL gel	180 mg prot /mL sistema ATPS
Flujo de entrada	3.3 mL/min	NA
Costo de materias primas	\$ 12.00/mL resina	\$ 0.37/gr PEG
Reutilizable	Si	Si

¹Escala planta piloto con resina CM-Sepharose.

El potencial del proceso que utiliza ATPS para el manejo de volúmenes de trabajo mayores, comparado con el volumen de

carga del proceso cromatográfico, es evidente. El proceso de ATPS puede procesar flujos o suspensiones biológicas tres veces más concentradas (30% p/p equivalente a 180mg de proteína por mL de sistema ATPS; en Tabla 1). Si bien de los sistemas de ATPS evaluados hasta el momento reportan un rendimiento de recuperación de la enzima no optimizado del 60% con PEG 1450, es posible incrementar este valor mediante de estrategias de optimización utilizadas previamente. Los rendimientos de recuperación moderados obtenidos en los sistemas de dos fases acuosas pueden estar asociados a la pérdida de actividad enzimática en la interfase, la cual retiene parte de la proteína total suministrada al sistema. Es importante notar el atractivo que presenta el proceso de dos fases acuosas en cuanto al bajo costo de las materias primas, con respecto al costo de las resinas cromatográficas. Lo anterior podría justificar los menores rendimientos de recuperación que se obtienen en ATPS. De los pesos moleculares probados, solo los sistemas con PEG 1450 y VR=1 mostraron rendimientos de recuperación comparables con la cromatografía (Tabla 1); sin embargo, el desarrollo de un proceso optimizado - comparable técnicamente al sistema cromatográfico - es posible.

Conclusiones. De los sistemas probados al momento, los rendimientos de recuperación en fases acuosas son ligeramente menores a los reportados por cromatografía de intercambio iónico: sin embargo, la principal ventaja de ATPS es su mayor capacidad de carga, así como el bajo costo de los materiales utilizados. Adicionalmente, la posibilidad de recuperar la enzima de la fase polimérica en procesos de inmovilización *in situ* lo colocan como un proceso potencialmente viable frente a la cromatografía.

Agradecimientos. A la cátedra de Investigación CAT005 del ITESM por el financiamiento para la realización de este proyecto.

Referencias.

- (1) Rodríguez, M. Güereca, L. Valle, F. Quintero, R. López-Munguía, A. (1992) Penicillin acylase extraction by osmotic shock. *Proc. Biochem.* 27:217-223.
- (2) Guan, Y. Lilley, T. Brook, A. (2001). Production of immobilized penicillin acylase using aqueous polymer systems for enzyme purification and *in situ* immobilization. *Enzyme Microb. Technol.* 28:218-224.
- (3) Benavides, J. Rito-Palomares, M. (2004) Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *J. Chromatogr. B.* 807:33-38