



PROCESADO DE EXTRACTOS DE PROTEÍNA DE SOYA EN SISTEMAS DE DOS FASES ACUOSAS (SDFA) COMO PRIMERA ETAPA DE RECUPERACION DE PROTEINAS RECOMBINANTES.

Aguilar, Oscar; Rito-Palomares, Marco; Centro de Biotecnología, Departamento de Biotecnología e Ingeniería de Alimentos, Tecnológico de Monterrey. Campus Monterrey, Ave. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, 64849, México. TEL: (52) 81 8328-4132, Fax: (52) 81 8328-4136, e-mail: mrto@itesm.mx

Palabras clave: β -glucuronidasa, sistemas de dos fases acuosas, proteína de soya.

Introducción. El uso de semillas como órganos de producción de proteínas recombinantes, presenta múltiples ventajas, debido a su naturaleza como órgano de almacenamiento y sus altos niveles de expresión de proteínas. Sin embargo, esta ventaja representa también todo un reto en las operaciones posteriores de bioseparación, en especial cuando la proteína de interés debe ser extraída y purificada del extracto vegetal (1).

En el presente estudio, se explora la posibilidad de utilizar los SDFA como etapa primaria de recuperación de una proteína recombinante (β -glucuronidasa) expresada en soya, como modelo de un sistema complejo de expresión en plantas.

Metodología. Se seleccionó β -glucuronidasa (GUS) como un modelo de proteína recombinante expresada en frijol de soya (*Glycine max*). Se emplearon dos tipos de extractos proteicos, denominados 7S y 11S, obtenidos mediante el procedimiento de precipitación isoelectrica previamente reportado (2). Se realizó un estudio de caracterización del comportamiento de la proteína de soya en SDFA PEG-Fosfato con y sin GUS, así como de la enzima purificada (3). Los SDFA formulados, evaluaron el efecto de la composición y del peso molecular del polímero (de 600 a 3350 g/gmol). Los extractos proteicos 7S y 11S contenían 60939 U/mL de GUS determinada mediante una adaptación del ensayo reportado previamente (4). La concentración de proteína se determinó mediante el microensayo de Bradford.

Resultados y discusión. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la recuperación de GUS de extractos ricos en proteína de soya en sistemas de PEG 600 a pH 7. Los rendimientos de recuperación moderados que se observaron en fase superior se vieron afectados por la pérdida de actividad enzimática en la interfase, donde se calculó la recuperación necesaria para cumplir el balance de materia. Se pudo observar la notoria preferencia de la enzima por la interfase y la fase superior tanto para los que contenían proteína de soya, como para los sistemas modelo sin proteína vegetal (no mostrados).

De los dos extractos obtenidos por precipitación isoelectrica, aquellos que contenían mayoritariamente proteína 7S, presentaron mayor recuperación de GUS en fase superior, sin embargo, en ambos tipos de extractos, la concentración en interfase parece ser una constante. El potencial de uso de los SDFA como etapa primaria de recuperación de proteínas expresadas en sistemas vegetales, radica en la posibilidad de procesar extractos con una alta concentración de proteínas

contaminantes como los aquí utilizados, que presentaron hasta 33 mg/mL de proteína.

Tabla 1. recuperación y purificación de GUS de extractos de proteína de soya mediante SDFA PEG 600/Fosfato.

Sistema	% recuperación GUS			Factor de purificación Fase Sup.
	Fase sup.	Fase Inf.	Interfase	
Extracto de proteínas 7S				
1	30 ±1.5	8±0.4	62±3	2.5
2	30±1.5	4±0.2	66±3	2.5
3	33±1.5	0.0	67±3	3.0
4	33±1.5	0.0	67±3	3.0
Extracto de proteínas 11S				
1	15±0.7	3±0.1	82±4	1.0
2	20±1	4±0.2	76±3	2.1
3	23±1	0.0	77±3	2.2
4	28±1	0.0	72±3	3.0

Si bien estos resultados de recuperación pueden optimizarse, los factores de purificación obtenidos indican un cierto grado de selectividad por la enzima, considerando el alto contenido y la diversidad de proteínas presentes.

Conclusiones. Los resultados obtenidos sugieren que los SDFA tienen el potencial de ser utilizados como primera etapa de aislamiento y purificación de proteínas recombinantes expresadas en sistemas vegetales con alta concentración de contaminantes de naturaleza proteica. Los sistemas aquí evaluados, pueden resultar potencialmente viables considerando el bajo costo de los SDFA y su capacidad de procesar altos volúmenes de trabajo.

Agradecimiento. A la cátedra de Investigación CAT005 del ITESM por el financiamiento para realizar este proyecto.

Bibliografía.

- Bai, Y., y Nikolov, Z.L. (2001). Effect of processing on the recovery of recombinant β -glucuronidase (rGUS) from transgenic canola. *Biotechnol Prog* 17:168-174.
- Thanh, V.H., y Shibasaki, K. (1976) Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and characterization. *J Agric Food Chem* 24:1117-1121.
- Aguilar, O., Albiter, V., Serrano-Carreón, L. y Rito-Palomares, M. (2006). Direct comparison between ion-exchange chromatography and aqueous two-phase processes for the partial purification of penicillin acylase produced by *E. coli*. *J Chromatogr B* 835:77-83.
- Feurtado, J.A., Banik, M. y Bewley, J.D. (2001) The cloning and characterization of α -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. *J Experimental Botany* 52:1239-1249.