



SEPARACION DE PROTEINAS A CONTRACORRIENTE EN SISTEMAS DE DOS FASES ACUOSAS

Ileana Hernández, Jorge Benavides, Marco Rito-Palomares. Centro de Biotecnología, Departamento de Biotecnología e Ingeniería de Alimentos, Tecnológico de Monterrey, Ave. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, NL 64849 México. ileana.hdz@gmail.com

Palabras clave: dos fases acuosas, separación de proteínas, sistemas a contracorriente

Introducción. Existe la necesidad urgente de las industrias biotecnológicas por establecer sistemas de recuperación y purificación eficientes que les permita obtener productos para su validación. En el presente trabajo se explotaron los sistemas de dos fases acuosas con la finalidad de separar proteínas con características similares. La separación se llevó a cabo mediante sistemas a contracorriente simulando una cromatografía líquida, la cual es altamente selectiva para proteínas conjugadas, como por ejemplo el conjunto PEG-Lisozima [1]. Las proteínas que se utilizaron fueron: BSA, ovalbumina (OVA), α -lactalbumina (ALA), Con pesos moleculares de 66, 45 y 14 kDa respectivamente y puntos isoeléctricos en un rango de 4.5 a 4.8. [2][3].

El objetivo principal del trabajo fue separar y cuantificar proteínas con puntos isoeléctricos similares y diferentes pesos moleculares.

Metodología. Se establecieron sistemas de dos fases acuosas en los cuales el coeficiente de partición de las tres proteínas fuera entre 0 y 1. La separación a contracorriente simulada se realizó como se describe en la referencia 1. Brevemente, al primer tubo de 1.5 ml se le agregó 700 μ g de cada una de las proteínas, se agitó por 5 min y se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min. La fase superior se trasladó al tubo 2 y se siguieron los mismos parámetros hasta llegar a formar 32 sistemas. Se realizó la medición de absorbancia a 595 nm para cuantificar la proteína presente en la fase superior de cada sistema.

Resultados y discusión. Los resultados de partición de las proteínas en los sistemas polietileno-glicol-fosfato seleccionados se muestran en la Tabla 1. El sistema I se seleccionó para el estudio a contra-corriente por concentrar las tres proteínas en las dos fases. Lo anterior a fin de facilitar la evaluación de la eficiencia del sistema a contra-corriente con fases acuosas para separar las proteínas en distintas etapas de extracción

Tabla 1. Composición de los sistemas de dos fases acuosas y coeficiente de partición para cada proteína.

Sistema	PEG (%)	PO4 (%)	LLC (%)	Kp*		
				BSA	Ovalbumina	α -Lactalbumina
I	13	15	27	0.35	0.46	0.66
II	19	17	45	∞	∞	95.49
III	11	11.4	23	0.00	0.00	0.18
IV	17.5	14.5	38	0.00	0.00	0.11

Todos los sistemas tienen una relación de volumen de 1 y un pH=7 *Kp promedio. Sistemas I y II contienen PEG 1000, III y IV PEG 3500.

La separación de las proteínas en las 32 etapas de extracción simuladas se observa en la Figura 1. Es claro identificar tres regiones, las cuales corresponden a cada una de las proteínas seleccionadas. En particular, la BSA representa la primera región, la OVA se identificó en la segunda región y finalmente la ALA en la tercera región. Los resultados obtenidos permiten identificar el potencial de la técnica para separar una mezcla de proteínas con puntos isoeléctricos similares y diferentes pesos moleculares. De la figura 1 se puede anticipar que las proteínas se distribuyen de mayor a menor peso molecular en el sistema de 32 etapas de extracción. Consecuentemente, BSA puede ser concentrada en la etapa 8-10, OVA en las etapas 13-18 y ALA en las etapas 20-26.

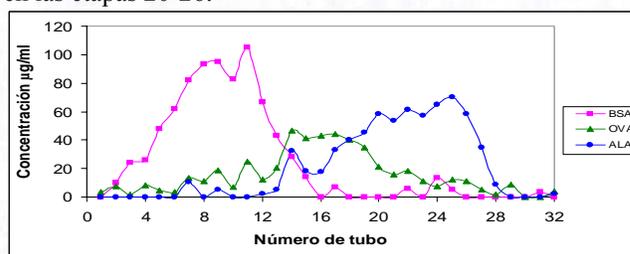


Figura 1. Concentración de BSA, OVA, ALA en 32 sistemas individuales.

Conclusiones. Se demostró que la separación de proteínas con puntos isoeléctricos similares y diferentes pesos moleculares se puede llevar a cabo usando sistemas de dos fases acuosas a contracorriente. Las proteínas pueden ser recuperadas de la fase superior y son distribuidas según su peso molecular, de mayor a menor. Este reporte establece el potencial de esta técnica como una estrategia simple para la separación de proteínas similares.

Agradecimientos. A la cátedra CAT005 del ITESM por el financiamiento económico.

Bibliografía.

- Sookkummerd T, Hsu J. (2000) Purification of PEG-Protein Conjugates by Countercurrent Distribution in Aqueous Two-Phase Systems. *J.Liq.Chrom. & Rel. Technol.* 23(4):497-503.
- Burns D, Sydney A. (2000) Effect of solution pH on protein transport through ultrafiltration membranes. *Biotechnol Bioeng.* 64:27-37
- Sikorski, Z. (2001) *Chemical and Functional Properties of Food Components Series.* TECHNOMIC, USA.