



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA EN LA SOLUBILIZACIÓN Y PLEGAMIENTO DE CUERPOS DE INCLUSIÓN, UTILIZANDO UN DISEÑO EXPERIMENTAL 3<sup>2</sup>.

Ma. Rocío Zamora, Ma. De Lourdes Muciño, Nestor Perez, Rodolfo Salazar y Norberto Cruz, Probiomed S.A. de C.V. Departamento de Investigación y Desarrollo, Tenancingo, Edo. México, CP 52400, [rocio.zamora@probiomed.com.mx](mailto:rocio.zamora@probiomed.com.mx).

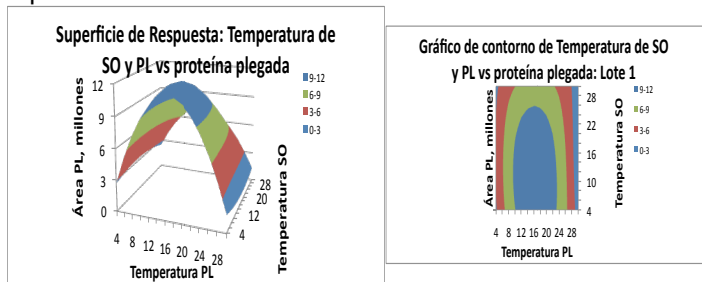
*Diseño de experimentos, solubilización, plegamiento.*

**Introducción.** Muchas de las proteínas de interés obtenidas de cultivos biológicos se producen como cuerpos de inclusión (CI). Los CI son agregados proteicos insolubles e inactivos. Generalmente, el primer paso de purificación es solubilizar (SO) estos agregados y enseguida plegarlos (PL) para llevarlos a su conformación activa (1). Varios estudios se han realizado para optimizar la cantidad de producto plegado. Una herramienta muy útil para cumplir con este objetivo es el diseño de experimentos (DoE), cuyo propósito es identificar y/o optimizar variables críticas que intervienen en las etapas de proceso dentro de un espacio de diseño (2).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la temperatura en la SO y PL de CI, utilizando un Diseño Factorial Completo 3<sup>2</sup>.

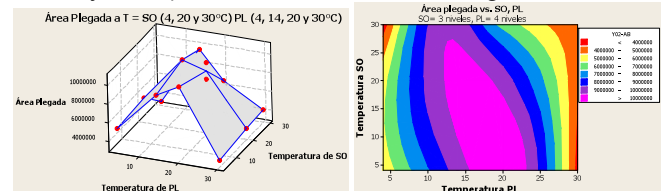
**Metodología.** Los CI se solubilizaron con urea y se plegaron a pH alcalino. El monitoreo del producto plegado se realizó por FR-HPLC analítico. Se aplicó un Diseño Factorial Completo 3<sup>2</sup>. Los factores estudiados fueron: temperatura de SO y temperatura de PL, ambos con 3 niveles: 4, 20 y 30°C. Dentro del estudio se evaluaron 3 lotes de CI. Para el análisis de datos se utilizó el software Minitab y Excel.

**Resultados.** El análisis estadístico de cada matriz de experimentos arrojó como variable significativa la temperatura de plegamiento con un  $\alpha$  de 0.05. Para el análisis se utilizó un modelo cuadrático completo. A continuación se presenta un gráfico típico de superficie de respuesta (sr) y de contorno (gc) para una matriz de experimentos evaluada:



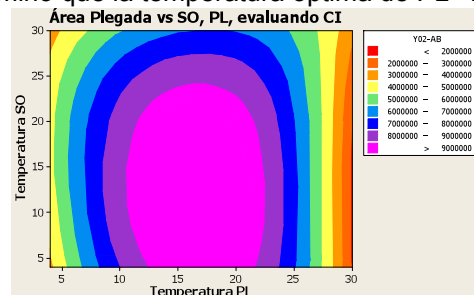
**Fig. 1.** Análisis de un lote de CI. Gráficos de superficie de respuesta (izquierda) y de contorno (derecha) de un DoE 3<sup>2</sup>, evaluando el efecto de la temperatura en SO y PL. En el eje "x" y "y" se grafican las temperaturas de PL y SO, respectivamente. En el eje de la "z" se encuentra nuestra variable de respuesta: área de PL por FR-HPLC, en unidades de millones.

Con el modelo aplicado se obtuvo un máximo de área plegada a las temperaturas de PL a 14°C ± 2°C y SO de 4 a 22°C. A partir de esto, se realizaron 3 experimentos comprobatorios fijando la temperatura de PL a 14°C y manteniendo los niveles de SO. Con esto se complementó el análisis con SO (4, 20 y 30°C) y PL (4, 14, 20 y 30°C). Los resultados son los siguientes:



**Fig. 2.** Gráficos de superficie de respuesta y de contorno de un diseño con temperatura de: SO 3 niveles, PL 4 niveles.

Dentro del mismo estudio se evaluó si los diferentes lotes de CI tienen un efecto significativo. Ampliando el estudio a un DoE 3<sup>2</sup> con Bloques en las réplicas y cada lote bloque es un lote de CI. De este análisis se obtuvo que los lotes de CI no tienen un efecto significativo y se determinó que la temperatura óptima de PL = 16 ± 2°C.



**Fig. 3.** Gráficos de contorno de un DoE 3<sup>2</sup> con bloques. Cada bloque es un lote de CI.

**Conclusiones.** Con el DoE planteado se identificó la temperatura de PL como variable significativa que afecta las etapas de proceso estudiadas y se determinaron los valores óptimos de temperatura de SO y PL en la purificación de una proteína producida en CI, dentro del espacio de diseño estudiado.

**Agradecimiento.** Probiomed S.A de C.V.

### Bibliografía.

- Ming L, Zhi-Guo S, and Jan-Christer J. 2004. *Protein Expression & Purification*. vol 33: 1-10.
- Montgomery Douglas. 2006. Diseños factoriales y factoriales fraccionados con tres niveles y con niveles mixtos. En: *Diseño y análisis de Experimentos*. Zetina-Véles G. Limusa Wiley, México. 363-387.