

Cromatografía y Filtración de afinidad: Desarrollo de un adsorbente de afinidad basado en la célula de levadura *S. cerevisiae* para el aislamiento y purificación de proteínas de interés industrial.

Paola D. Ramos, Ulises A. Gonzalez, **M. Pilar Ferraris**

Facultad de Química Bioquímica y Farmacia - Universidad Nacional de San Luis. Laboratorio de Biología Molecular. Instituto de Investigaciones en Tecnología Química (INTEQUI), CONICET. Av. Ejército de los Andes 950.

E-mail: pilarferraris05@gmail.com

Resúmen

La purificación de proteínas constituye un proceso clave en la investigación científica, y dependiendo de su aplicación final, estas biomoléculas requieren ser aisladas y purificadas. Las tecnologías de purificación de proteínas basadas en mecanismos moleculares de afinidad son consideradas actualmente como una de las técnicas más eficientes y con mayor potencial de aplicación en procesos separativos a escala de laboratorio y a mayor escala. El término “afinidad” es empleado, en general, en el sentido de “atracción” entre moléculas o también reconocimiento molecular. En las metodologías de afinidad, también existen otras terminologías como “pseudo-afinidad” o “bio-mimetización”, los cuales describen la interacción del sitio de unión de la proteína con un componente artificial (no natural). La tecnología de afinidad más ampliamente usada es la cromatografía de afinidad en columna y la Filtración de afinidad. Actualmente, existe interés en la innovación de tecnologías separativas con eficiencia en resolución, rendimientos y de fácil escalado para la purificación de proteínas.

En el presente trabajo se consideró las características de adsorción y propiedades de las células de levadura utilizadas como microsoporte para la preparación de un macroligando de afinidad y ser utilizadas en procesos de filtración y cromatografía de afinidad, una tecnología que presenta un elevado potencial para la purificación de proteínas.

Se preparó un adsorbente o macroligando de afinidad utilizando células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* como microsoporte insoluble, modificadas por tratamiento químico y con la molécula ligando Cibacron Blue F3GA acoplada en forma covalente a la pared celular (Figura 3). Luego del proceso de inmovilización se estudió las propiedades físico-químicas mediante determinaciones de concentración de ligando acoplado al microsoporte y estudios morfológicos de las células por microscopía electrónica de barrido (SEM) y óptica (Figura 1 y 2).

Al microscopio óptico se observó un aumento en la intensidad de tinción con el pigmento Cibacron Blue en las células tratadas con etanol a elevadas temperaturas, con respecto a las obtenidas sin este tratamiento previo, observándose una fuerte coloración azul (Figura 1).

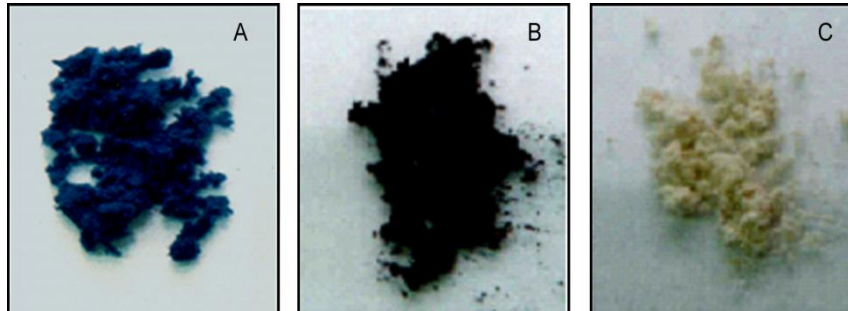


Figura 1: Imágenes fotográficas del macroligando. (A) Células de levadura liofilizadas sin tratamiento químico previo con etanol y con el pigmento Cibacron Blue acoplado a la pared celular. (B) Células de levadura liofilizadas, tratadas con etanol y con el pigmento Cibacron Blue inmovilizado (macroligando Cél-Cib). (C) Células de levadura liofilizadas, tratadas con etanol y sin el pigmento Cibacron Blue inmovilizado (micropartícula Célula-blanco).

La imagen al microscopio electrónico del adsorbente Célula-Cibacron Blue liofilizado no mostró descomposición de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 2). Las células presentan un tamaño uniforme de aproximadamente 5µm de largo.

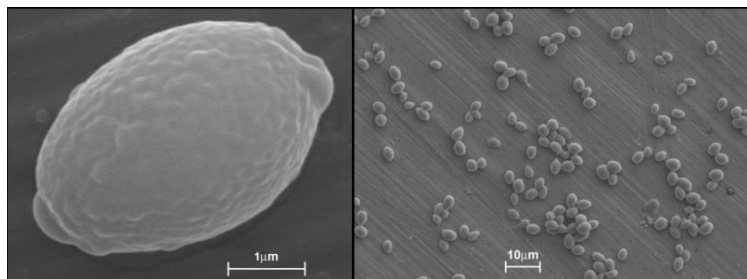


Figura 2: SEM micrografías del macroligando de afinidad Cél-Cib liofilizado

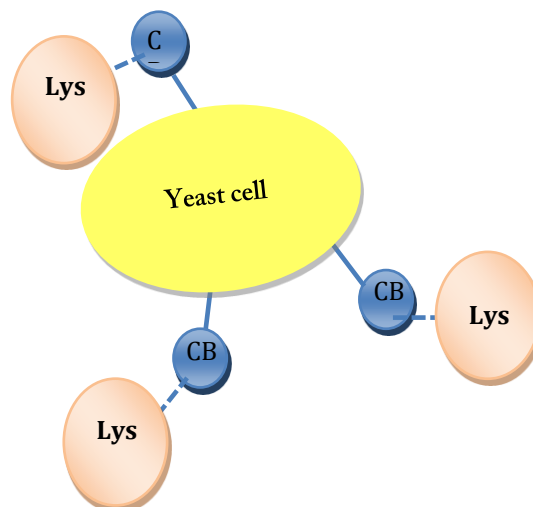


Figura 3: Representación esquemática del macroligando de afinidad Cél-Cib-Lis. CB: Cibacron Blue; Lys: Lisoizima

El macroligando de afinidad fue caracterizado funcionalmente mediante determinación de la capacidad de adsorción (q^*) y constante de afinidad (K_d , constante de disociación) en el equilibrio a través de isothermas de adsorción usando Lisozima (Lis) y Albúmina de Suero bovina (BSA) como proteínas experimentales, las cuales poseen afinidad por el macroligando. Los valores calculados de estos parámetros de adsorción son resultados que se aplicaron en modelos matemáticos que predicen el comportamiento del complejo adsorbente-proteína en sistemas separativos como la filtración de afinidad o columna cromatográfica (Tabla 1 y 2)

Tabla 1. Constantes de Langmuir y Freundlich para la adsorción de Lis a Cél-Cib

Constantes de Langmuir		Constantes de Freundlich		Coeficientes de correlación	
q_m (mg/g)	K_d (M)	K	n	Langmuir	Freundlich
315	$7,8 \times 10^{-6}$	239,06	3,135	$R^2=0,999$	$R^2= 0,92$

Tabla 2. Constantes de Langmuir y Freundlich para la adsorción de BSA a Cél-Cib

Constantes de Langmuir		Constantes de Freundlich		Coeficientes de correlación	
q_m (mg/g)	K_d (M)	K	N	Langmuir	Freundlich
120 mg/g	$5,82 \times 10^{-5}$	22,18	1,40	$R^2= 0,9907$	$R^2= 0,999$

Se analizó la selectividad y rendimientos del macroligando de afinidad mediante ensayos de aislamiento de Lis, BSA y HSA a partir de mezclas de proteínas provenientes de la fuente natural de estas como son la clara de huevo, suero o plasma bovino o humano.

Se analizó la aplicación del macroligando de afinidad Célula-Cibacron, como material adsorbente, en un sistema separativo de filtración de afinidad por flujo tangencial. Para ello se realizaron experiencias a escala de banco de separación de Lis a partir de clara de huevo. Se analizó cada una de las etapas del proceso y las diferentes variables operativas que intervienen en este proceso separativo (ver diagrama de flujo).

Diagrama de flujo

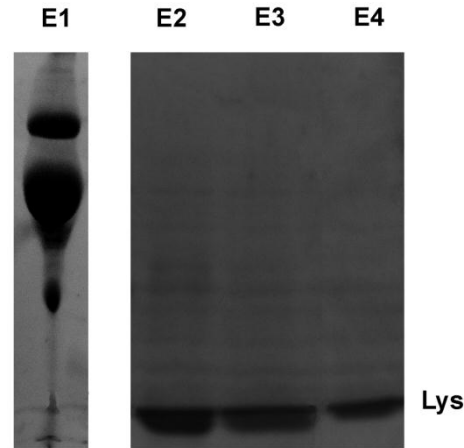
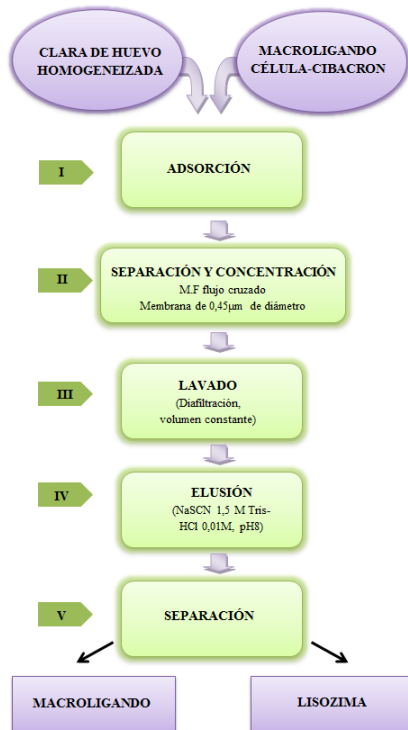


Figura 4: SDS-PAGE al 13%. Lis purificada a partir de clara de huevo con el sistema separativo de microfiltración. E1: sobrenadante de clara de huevo con proteínas no unidas, E2 y E3: Lis eluida desde el macroligando con buffer 0.01M Tris/HCl conteniendo 1.5 M NaSCN, pH 8. E4: standard Lysozyme, 10μg (inovatech)

La interacción de Lis con el macroligando es fuerte y selectiva (Figura 4). Lis no se disocia del macroligando en la etapa de lavado ni con caudales de flujo altamente turbulentos y tampoco afecta la integridad de la partícula adsorbente. El grado de pureza de la enzima aislada es significativo, logrando una pureza superior al 90%, con una elevada recuperación de la enzima.

Finalmente, se estudió la aplicación de una columna cromatográfica para la separación de Lis a partir de sus fuentes naturales. Para lo cual se elaboró un sistema de columna de lecho fijo con cubos de agarosa-macroligando inmovilizado y se analizó la selectividad del adsorbente mediante purificación de Lisozima de clara de huevo (Figura 5)

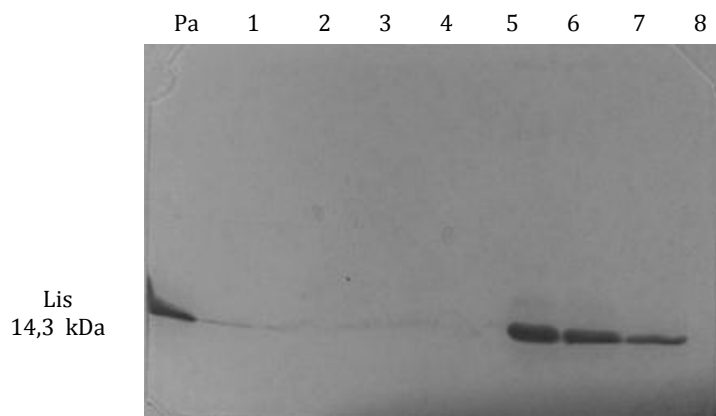


Figura 5: SDS-PAGE al 13%. Purificación de Lis en columna cromatográfica con cubos de agarosa-macroligando. (Pa) Patrón de Lis. 2,5mg/ml, Carril 1-5: lavados post elución; carriles 6-8: 1°, 2° y 3° elución.

En el gel de la Figura 5 se puede visualizar una sola banda que correspondía a Lis pura, por lo tanto se cuantificó la cantidad de la enzima presente en las muestras de elución mediante espectrofotometría a 280 nm. Con este método de purificación se obtuvo que la cantidad de Lis que se une es de 190 mg de Lis/g de adsorbente. Finalmente, la pureza de Lis en los geles analizada con el programa *Gel-Pro Analyzer 4.0*, proporcionó un valor de 96.7 a 99.9% de pureza.

Chromatography and affinity filtration: development of an affinity adsorbent based on the yeast cell *S. cerevisiae* for the isolation and purification of proteins of industrial interest

Paola D. Ramos, Ulises A. Gonzalez, **M. Pilar Ferraris**

Facultad de Química Bioquímica y Farmacia - Universidad Nacional de San Luis. Laboratorio de Biología Molecular. Instituto de Investigaciones en Tecnología Química (INTEQUI), CONICET. Av. Ejército de los Andes 950.

E-mail: pilarferraris05@gmail.com

ABSTRACT

Protein purification is an essential process in scientific research. Considering its final application these biomolecules need to be isolated and purified. The most effective affinity purification technique has been affinity chromatography, which combines conventional column chromatography with affinity interactions. The aim of this project is to develop suitable methodologies for technological innovation in the field of protein purification performing affinity chromatography and filtration based on the use of macroligand Cell-Cibacron. Affinity macroligand was prepared from yeast cells modified by chemicals and with the Cibacron Blue F3GA ligand molecule immobilized to the wall cell by covalent bond. The maximum attachment of ligand on the wall cell was $224 \mu\text{mol g}^{-1}$. In the affinity filtration process, the affinity macroligand and the hen egg white homogenized and diluted were contained in a 2 L stirred bioreactor. A tubular inorganic membrane of $0.45 \mu\text{m}$ pore size was coupled to bioreactor through a peristaltic pump. The filtrate was collected and the retentate was recirculated to the bioreactor until the achievement of the desired separation. The purity of Lysozyme (Lys) was assayed by gel electrophoresis (SDS-PAGE). Preliminary experiments indicated that Lys was purified with high purity (more than 80%) from hen egg white. An fixed-bed column system with immobilized agarose-macroligand cubes was prepared. Lys adsorption from hen egg white was studied. The degree of recovery and purity of Lys was analyzed. Supernatants from each adsorption sample as elution were analyzed by SDS-PAGE. Protein concentration was determined by spectrophotometry. Lys was purified with high purity (more than 90%) with the affinity chromatography column system using agarose-macroligand cubes. Using this model, we obtained 190 mg of Lys/g of adsorbent. It is an easily reproducible system, which also demonstrated an adequate sample processing speed. There was no occlusion or blockage of the affinity column during the separation process.