

Separación de proteínas en mezclas biológicas complejas mediante procesos continuos de extracción líquido-líquido

Cabrera, Rosa¹; Stumpo, Rita²; López, Paula³; Ferraro, Graciela³;
Cascone, Osvaldo^{1*}; Fernández-Lahore, Héctor M.¹

¹) Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología;

²) Cátedra de Inmunología e IDEHU-CONICET;

³) Cátedra de Farmacognosia. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina.

Tel: 54 11 4964 8270; Fax: 54 11 4964 8274; e-mail: mflahore@huemul.flyb.uba.ar

RESUMEN: La cromatografía en contracorriente (CCC) se basa en un procedimiento repetido de extracción líquido-líquido y encuentra usos en la separación de productos naturales. A efectos de una CCC es posible retener la fase líquida estacionaria mediante aplicación de fuerza centrífuga sobre un tubo espiralado (o "columna") que rota sobre su propio eje y simultáneamente sobre el eje del rotor (centrífuga "planetaria"). De esta forma es posible obtener separaciones cromatográficas en ausencia de un soporte sólido. En este trabajo, extendemos la aplicación de la CCC al fraccionamiento de macromoléculas mediante el uso de sistemas de dos fases acuosas (ATPS) durante la CCC.

Utilizando columnas semipreparativas a una velocidad de rotación constante (1000 rpm), hemos obtenido retenciones de alrededor de 35% de la fase superior de un ATPS formado por polietilenglicol 1540 (12,5%) y fosfatos (12,5%). Dicho nivel de retención es estable en el tiempo y corresponde a un valor $\leq 1,8$ para la relación de volúmenes de fases, lo que compara ventajosamente con el de la cromatografía en columna.

La optimización del sistema CCC permitió separar mezclas artificiales de proteínas y su aplicación al fraccionamiento de un suero equino hiperinmune.

Estos resultados abren la posibilidad de realizar separaciones de proteínas mediante CCC/ATPS y el posterior escalado de la metodología propuesta en separadores industriales.

Palabras clave: Purificación, Proteínas, Cromatografía, Contracorriente.

SUMMARY: *Protein separation from biological complex mixtures by continuous liquid-liquid extraction processes.* Cabrera, Rosa⁽¹⁾; Stumpo, Rita⁽²⁾; López, Paula⁽³⁾; Ferraro, Graciela⁽³⁾; Cascone, Osvaldo^(1*); Fernández-Lahore, Héctor M.⁽¹⁾. Counter-current chromatography (CCC) – based on a multiple liquid-liquid extraction principle - is successfully utilised for natural product separation. A purpose-designed "planetary" centrifuge allows retention of a stationary (liquid) phase into the column. In this way, chromatographic separations in the absence of a solid phase are possible. Herein, we are extending the application of counter current chromatography to the separation of complex protein mixtures through the utilisation of aqueous two-phase systems (ATPS).

By using semipreparative columns at 1000 rpm, 35% retention of the top phase of an ATPS composed by polyethyleneglycol 1540 (12.5%) and phosphate buffer (12.5%) was obtained. Such retention level is stable alongside the standard running separation time. Under such experimental conditions, a phase-volume ratio value of $\leq 1,8$ can be calculated, this comparing favourably with that of the column chromatography.

The optimised CCC system allowed the separation of model proteins as well as the fractionation of an hyperimmune horse sera. These results open the possibilities of achieve protein separation with CCC/ATPS and to envision the further process scale up by employing industrial separators.

Key words: Purification, Proteins, Chromatography, Counter-current.