

Programa de RECUPERACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Carrera: *Licenciatura en Biotecnología*

Asignatura: *Recuperación y Purificación de Proteínas*

Núcleo al que pertenece: *Obligatoria (Ciclo Superior)*¹

Profesores/as: *Mariano Grasselli; María Laura Carbajal; Silvia Soto*

Correlatividades previas: *Bioquímica I (y condiciones de acceso al Ciclo Superior)*

Objetivo:

El objetivo es que el/la estudiante comprenda las diferentes etapas de recuperación y purificación que involucran la obtención de un producto biotecnológico (*downstream*). El análisis y la comparación de las diferentes tecnologías para cada operación unitaria, para introducir en la problemática de la escala piloto-industrial.

Propósitos:

Se propone que los/las estudiantes puedan:

- Lograr la integración de los conceptos teóricos adquiridos aplicándolos en los seminarios y trabajos prácticos.
- Captar la complejidad particular de cada sistema en estudio, para poder establecer el mejor diseño para la recuperación y purificación del producto deseado.
- Desarrollar destreza en el manejo y lectura de la bibliografía, y habilidad en la confección de gráficos, matrices y modelos
- Desarrollar sus capacidades analíticas y de juicio crítico.
- Tomar contacto con diferentes fuentes de información y de documentación y adquirir familiaridad en su manipulación.

¹ En plan vigente, Res CS N° 125/19. Para el plan Res CS N° 277/11, pertenece al Núcleo de Orientación.

- Lograr una actitud positiva hacia el conocimiento, la investigación y sus técnicas.

Se tiene especial interés en que la/os alumna/os adquieran: integración entre teoría y práctica, poder de análisis y juicio crítico, manejo de la bibliografía, habilidad en la confección e interpretación de información estadística y gráfica, criterio y destreza manual en la práctica experimental, así como los mínimos elementos de higiene y seguridad en el laboratorio.

Contenidos mínimos:

Introducción a la separación industrial de proteínas (*downstream processing*). Técnicas de disrupción celular. Separación sólido-líquido: centrifugación y filtración; filtración tangencial; ultrafiltración. Precipitación de proteínas. Extracción líquido-líquido en fases acuosas. Cromatografías adsortivas de proteínas: iónica, hidrofóbica, de pseudoafinidad y afinidad. Cromatografía no adsortiva: exclusión molecular. Escalado y análisis de rendimiento de los procesos.

Carga horaria semanal: 6 hs por semana

Programa analítico:

UNIDAD 1: Introducción al *downstream processing*: Importancia de la recuperación y purificación del producto (*downstream processing*). Tipos de producto según sus características químicas y su ubicación en el ente productor. Operaciones unitarias utilizadas en la recuperación y purificación de productos. Productos recombinantes. Importancia y mercado actual.

UNIDAD 2: Ruptura celular: Métodos utilizados. Escala de los mismos. Mecanismo. Descripción de los equipos usados. Ventajas e inconvenientes de cada uno. Elección del método según el microorganismo y la localización del producto en el mismo.

UNIDAD 3: Separaciones sólido-líquido: Centrífugas industriales. Filtración, microfiltración, ultrafiltración y ósmosis reversa. Equipos industriales. Estudio comparativo de la centrifugación y la filtración para su uso en distintos procesos biotecnológicos.

UNIDAD 4: Precipitación: Clasificación de los métodos aplicables en biotecnología según el agente precipitante. Fundamento teórico y utilización práctica. Ventajas e inconvenientes de cada uno.

UNIDAD 5: Partición en dos fases acuosas: Concepto teórico. Aplicación a los procesos biotecnológicos para la purificación de proteínas de interés comercial. Factores que influyen en la partición de proteínas. Ventajas e inconvenientes. Partición por afinidad.

UNIDAD 6: Cromatografía de exclusión molecular: Concepto teórico. Distintos modos de cromatografía de exclusión molecular. "*Scale-up*". Equipos utilizados industrialmente. Características de las matrices utilizadas.

UNIDAD 7: Cromatografía de intercambio iónico: Concepto teórico. Distintos modos de cromatografía de intercambio iónico. Elección de la matriz cromatográfica. Procesos de unión y de elución. "*Scale-up*". Equipos utilizados industrialmente. Características de las matrices utilizadas.

UNIDAD 8: Cromatografía de afinidad: Concepto teórico. Tipos de cromatografía de afinidad según su especificidad. Matrices comerciales y de preparación propia. Procesos de unión y elución. "*Scale-up*". Ventajas e inconvenientes de su aplicación a la purificación de biomoléculas en biotecnología.

UNIDAD 9: Cromatografía de interacción hidrofóbica: Concepto teórico. Comparación con la cromatografía líquida de fase reversa. Matrices y solventes utilizados. "*Scale-up*". Equipos utilizados industrialmente.

UNIDAD 10: Cromatografía preparativa: Concepto teórico. Isotermas de adsorción en el equilibrio. Interacciones soluto-matriz cromatográfica y soluto-soluto en cromatografía preparativa. Estudios en condiciones de sobrecarga

UNIDAD 11: Diseño y optimización de procesos de purificación: Esquemas racionales según las características de las operaciones unitarias. Influencia del número de y del rendimiento de las etapas. Optimización del proceso de purificación: resolución, carga de muestra y velocidad del proceso.

UNIDAD 12: Cromatografía convectiva: Soportes difusivos y convectivos. Diferencias en relación a la transferencia de masa. Usos industriales

Clases de trabajo experimental - Fundamentación para su elección:

1- Determinación de parámetros de seguimiento de un proceso de purificación

Este tema se ha elegido con el objetivo de introducir en las dimensiones analíticas que intervienen en todo proceso de purificación de proteínas. Como, por ejemplo, la determinación de actividad específica, rendimiento y factor de purificación que se resumen en un cuadro de purificación. Familiarizar al alumno con las técnicas de determinación de actividad enzimática y proteínas totales,

manejo de diluciones y análisis del error. Incluye además un trabajo práctico computacional enfocado en el análisis de datos.

2- Ruptura Celular de microorganismos

Uno de los métodos más ampliamente utilizados para la ruptura celular es el de homogenización por alta presión. Se aplica en las industrias química, farmacéutica, biotecnológica, cosmética, alimenticia y láctea para el procesamiento de gran variedad de productos. El objetivo es estudiar el método de ruptura celular mediante homogeneizador de alta presión sobre un cultivo bacteriano. Establecer el número óptimo de pasajes para maximizar el rendimiento. Otra alternativa es estudiar el método de ruptura celular enzimático sobre un cultivo bacteriano por medio de cinéticas de liberación de proteínas. Evaluar el efecto de la combinación de este método con métodos químicos (agentes quelantes y detergentes). Comparación con método de disrupción mecánica.

3- Partición en dos fases acuosas

La purificación de enzimas mediante partición en sistemas de dos fases acuosas resulta interesante desde un punto de vista tecnológico debido a los siguientes factores: a) las operaciones de extracción líquido-líquido son comunes en la industria, b) buena recuperación del producto, y c) fácil escalado. El objetivo es extraer y purificar peroxidasa (Px) de tegumento de raíz de *Raphanus sativus* en dos pasos que permita eliminar el colorante y los desechos vegetales presentes en el extracto original. En una primera etapa, se busca el mejor sistema de partición para la Px para lo cual se analiza el comportamiento de la enzima en sistemas conteniendo PEG de distintos PM. Cálculo de la composición global en % P/P de PEG y fosfatos para cada sistema.

4- Partición en dos fases acuosas y ultrafiltración: proceso y escalado

En esta segunda etapa, se realiza una Extracción a mediana escala de la enzima con el sistema PEG/sales escogido en la primera, y luego se llevará a cabo la Recuperación de la peroxidasa de la fase PEG por ultrafiltración. Estudio del proceso en función del número de ciclos de diafiltración y del porcentaje de recuperación obtenido. Determinación de los parámetros del proceso de purificación (rendimiento, pureza, factor de purificación) y obtención del cuadro de purificación (en cada etapa y el global).

5- Cromatografía: Isoterma de adsorción

Ajustar los datos experimentales, por regresión no lineal, a la isoterma de Langmuir para obtener los parámetros capacidad máxima (q_m) y constante de disociación (K_d) ambos con un significado físico real y práctico. K_d permite estimar la mínima concentración de la proteína de interés en la muestra y q_m permite hacer estimaciones de la cantidad de matriz a utilizar en un proceso

cromatográfico donde se pretenda optimizar el tamaño de la columna. También usar la ecuación linearizada y ajustar los datos por regresión lineal (doble recíprocos). Comparar los resultados obtenidos por ambos procesamientos. Estudiar el efecto de las sales sobre la adsorción de la proteína de interés sobre la matriz cromatográfica escogida mediante el comportamiento de estos parámetros.

6- Cromatografía: Cromatografía de proteínas en columna empacada

Cambiar la composición del buffer de una solución de proteína utilizando una cromatografía de exclusión molecular (CEM). Cromatografía CEM a escala preparativa. Separar dos proteínas de una mezcla por cromatografía de intercambio iónico (CII). Estudiar la separación de una proteína con carga en columnas rellenas con intercambiador de iones, en un caso un intercambiador débil (CM-Sepharose) y en otro con uno fuerte (SP- Sepharose FF).

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía Obligatoria

□ "Proteínas puras, entre el laboratorio y la industria". Grasselli, M compilador. (2015)

Universidad Nacional de Quilmes Editorial. Bs. As. Argentina

□ "Bioseparaciones". Tejada, A., Montesinos R. M. y Guzman, R. (1995) Editorial Unison. México.

□ "Bioseparation of proteins" Sadana, A. (1998). Academic Press. New York

□ "Bioseparations- Downstream processing for biotechnology". Reinhold Van Nostrand,

Belter P.A, Cussler E.L, Hu W.S. (1988), John Wiley and Sons. New York.

□ Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise; edited by H.J. Rehm and G.

Reed; in cooperation with A. Pühler and P. Stadler. (1993-2001) Tomo 3: "Bioprocessing".

□ "Guide to Protein Purification". Deutscher M.P. (1990) Academic Press, San Diego CA.

□ "Biochemical Engineering" Blanch H.W. and Clark, D.S. (1996) CRC Press. Bibliografía de consulta:

- Biochemical Engineering Journal
- Brazilian Journal of Chemical Engineering
- Current Opinion in Biotechnology
- Bioprocess and Biosystems Engineering
- Biotechnology Progress

Páginas web para ser consultadas:

- [http:// www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- <http://www.springerlink.com/>
- <http://pubs.acs.org>

La bibliografía que no se encuentra en la Biblioteca de la UNQ es suministrada por los docentes, ya sea porque se dispone de las versiones electrónicas y/o se dispone del ejemplar en el grupo de investigación asociado.

Organización de las clases:

En la primera parte del cuatrimestre lectivo se tratarán los ejes temáticos o las unidades 1 a 7, incluyendo los trabajos prácticos (4) y seminarios correspondientes (4). Se propone entonces la realización de una instancia de evaluación parcial de estos contenidos. En la segunda parte del cuatrimestre, se desarrollarán las temáticas 8 a 12 incluyendo trabajos prácticos (2) y seminarios correspondientes (4). Al término de esta etapa, se propone una segunda instancia de evaluación parcial de estos contenidos. Las últimas semanas del cuatrimestre se destinarán a las instancias de recuperación en caso de desaprobación de alguna de las instancias parciales de evaluación, de integración de conceptos adquiridos y al cierre de la asignatura.

ENCUADRE METODOLOGICO

Los contenidos conceptuales se abordarán con el desarrollo de pasos metodológicos:

- Revisión de técnicas de estudio (redes conceptuales, mapas conceptuales, ideas principales, cuadros sinópticos, diagramas, etc.)
- Resolución de problemas planteados en clase a través de la lectura comprensiva de bibliografía indicada, tanto en trabajo individual como grupal.
- Espacio para el debate y presentaciones orales de trabajos científicos relacionados con los contenidos

- Exposiciones grupales e individuales
- Realización de trabajos prácticos
- Presentación de informes de las actividades prácticas con lineamientos generales y específicos.
- Exploración bibliográfica en centros de información concretos (visitas a bibliotecas, archivos, etc.) y virtuales (vía Internet)
- Relevamiento y selección de fuentes de información adecuadas al tema

RECURSOS

- Guías de lecturas, de ejercicios prácticos y de laboratorio.
- Cuestionarios
- Consulta virtual a centros de documentación y de información
- Herramientas multimedia
- Elementos informáticos de análisis

Modalidad de evaluación:

Se proponen diferentes instancias de evaluación:

1. Una evaluación diagnóstica, relevando expectativas, saberes previos y supuestos de la/os alumna/os en relación con los temas de la materia.
2. Una instancia de evaluación de proceso, que se realizará en base a:
 - a) participación en los debates que se generan en relación con el análisis conceptual de publicaciones científicas específicas (*papers*)
 - b) exposición sintética de las hipótesis e interpretaciones de la/os autores analizados
 - c) discusión y formulación colectiva de estrategias didácticas para el tratamiento de los contenidos desarrollados.
 - d) realización correcta de los trabajos prácticos en tiempo y forma.
 - e) informes de laboratorio, individuales y grupales
 - f) seguimiento y monitoreo, mediante lista de cotejo, de las tareas realizadas.

3. Un instrumento de evaluación final que deberá reflejar el recorrido formativo que realiza los/las alumnos/as; tendrá como objetivo indagar y analizar en qué grado las acciones realizadas y los resultados obtenidos responden a lo planificado y posibilitan realizar las rectificaciones necesarias en la práctica cotidiana.

La nota final, surgirá del promedio de los informes parciales, de los informes de laboratorio y de la nota conceptual. Un coloquio final individual, que consistirá en la presentación escrita y oral de un trabajo de investigación sobre un tema teórico o práctico relacionado al temario del curso, se realizará en el anteúltimo encuentro de manera tal que se pueda realizar una instancia de devolución y/o recuperación en caso de desaprobación.

- Notas en exámenes parciales (pondera un 60 % de la nota final)
- El 25% de la nota final corresponderá a informes, trabajo en el laboratorio y seminarios, evolución y concepto.
- El 15 % a la defensa oral, tanto de la promoción como de la instancia de integrador.

Aprobación de la asignatura según Régimen de Estudios vigente de la Universidad Nacional de Quilmes:

La aprobación de la materia bajo el régimen de regularidad requerirá: Una asistencia no inferior al 75 % en las clases presenciales previstas, y cumplir con al menos una de las siguientes posibilidades:

- (a) la obtención de un promedio mínimo de 7 puntos en las instancias parciales de evaluación y de un mínimo de 6 puntos en cada una de ellas.
- (b) la obtención de un mínimo de 4 puntos en cada instancia parcial de evaluación y en el examen integrador, el que será obligatorio en estos casos. Este examen se tomará dentro de los plazos del curso.

Los/as alumnos/as que obtuvieron un mínimo de 4 puntos en cada una de las instancias parciales de evaluación y no hubieran aprobado el examen integrador mencionado en el Inc. b), deberán rendir un examen integrador, o en su reemplazo la estrategia de evaluación integradora final que el programa del curso establezca, que el cuerpo docente administrará en los lapsos estipulados por la UNQ.

Modalidad de evaluación exámenes libres:

En la modalidad de libre, se evaluarán los contenidos de la asignatura con un examen escrito, un examen oral e instancias de evaluación similares a las realizadas en la modalidad presencial. Los contenidos a evaluar serán los

especificados anteriormente incluyendo demostraciones teóricas, laboratorios y problemas de aplicación.

Anexo II

CRONOGRAMA TENTATIVO

Clase	Tema/unidad	Actividad*				Evaluación
		Teórico	Práctico			
			Res Prob.	Lab.	Otros Especificar	
1 y 2	Presentación - Introducción a la Purificación Industrial de Proteínas (U1)	T1	Sem 1	TP1 + TPC1	Actividad seminari o discusión	
3 y 4	Separación sólido-líquido (U3)	T2, T3	Sem 2	TP2		
4	Precipitación-Concentración (U4)	T4				
5 y 6	Ruptura celular (U2)	T5	Sem 3	TP3		
6 y 7	Partición en dos fases acuosas (U5)	T6	Sem 4	TP4	Exposició n trabajos	
8	Consulta y Evaluación Parcial					X
9, 10 y 11	Adsorción y Cromatografía de Intercambio Iónico (U7, U10, U11)	T7, T8	Sem 5 y 6	TP5 y TP6	Actividad seminari o discusión	
11	Cromatografía de fase reversa y HIC (U9, U11)	T9	Sem 7			
12 y 13	Cromatografía de afinidad y Pseudo-afinidad (U8, U11)	T10 y T11	Sem 8			

13 y 14	Cromatografía de Exclusión Molecular (U6)	T12	Sem 9			
14 y 15	Cromatografía convectiva (U12)	T13			Exposición trabajos e integración	
15 y 16	Consultas, Evaluación Parcial					x
16 y 17	Consultas, Recuperatorios					x
17 y 18	Evaluación final (Promoción/Integrador + defensa Oral)					x

****indique con una cruz la modalidad***