(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 277 910**

(51) Int. Cl.:
C07K 1/00 (2006.01)
B01D 15/08 (2006.01)
B01J 20/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **01903603 .7**
(86) Fecha de presentación : **08.02.2001**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1257562**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **20.11.2002**

(54) Título: **Nuevos materiales de resina y su uso para recuperar proteínas o péptidos.**

(30) Prioridad: **08.02.2000 DK 2000 00199**
08.02.2000 US 181079 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2007

(73) Titular/es: **UPFRONT CHROMATOGRAPHY A/S**
Lersoe Parkalle 42
DK-2100 Copenhagen Ö, DK

(72) Inventor/es: **Lihme, Allan, Otto, Fog;**
Hansen, Marie, Bendix;
Bisgaard-Frantzen, Hans y
Rahbek-Nielsen, Henrik

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Nuevos materiales de resina y su uso para recuperar proteínas o péptidos.

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de recuperar proteínas o péptidos diana de un medio acuoso poniendo en contacto el medio que contiene la proteína o péptido diana con una resina que es capaz de unir selectivamente la proteína. Específicamente, se describe un procedimiento para recuperar enzimas de coagulación de la leche tales como quimosina y otras proteínas o péptidos usando nuevos materiales de resina.

Antecedentes técnicos y técnica anterior

Están disponibles varias técnicas para recuperar proteínas o péptidos diana de medios acuosos. Dichas técnicas incluyen, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y cromatografía de afinidad. Recientemente, las llamadas resinas cromatográficas de modo mixto han llegado a estar disponibles (véase por ejemplo: Burton y col., (1997) Biotechnol. Bioengin. 56, 45-55). Este tipo de resina realiza la unión de una molécula diana en condiciones hidrófobas y realiza la desorción o elución de la molécula diana en condiciones electroestáticas (iónicas) o hidrófilas. Un problema reconocido asociado con las resinas de modo mixto actualmente disponibles es que las eficacias de unión de moléculas diana menos hidrófobas a la resina no son muy elevadas salvo que se use una concentración salina elevada en el medio acuoso que contiene la molécula diana. Otro problema con las resinas de modo mixto como se menciona en el documento US 5.652.348 es que puede ser necesario aplicar una alta densidad (concentración) de ligando sobre la resina cromatográfica de modo mixto.

Se describen otros materiales de resina en la técnica incluyendo las resinas que se describen en el documento WO 96/00735. Esta solicitud describe resinas útiles para unión de una proteína o péptido seleccionado, particularmente de un medio acuoso tal como un caldo de fermentación, por interacciones hidrófobas entre la resina y la proteína o péptido seleccionado. La resina se caracteriza porque contiene ligandos ionizables y/o funcionalidades que no tienen cargas al pH de unión con la proteína o péptido diana. Sin embargo, en el procedimiento que se describe se reivindica una elevada densidad de ligando que es necesaria para la unión óptima y además, las proteínas seleccionadas sólo se unen a las resinas cuando la resina está sin cargas. Esto enfatiza que el material de resina se une a proteínas debido a la interacción hidrófoba produciendo bajas capacidades de unión.

Se describe otro procedimiento para la purificación de Quimosina (documento US 5.215.907) por interacción hidrófoba con resina de fenilsepharose. Aunque el procedimiento describe el uso de una resina específica para la purificación de la proteína, el resultado del procedimiento que se describe es una recuperación muy baja de la proteína.

Otra implicación más de la unión a materiales de resina sin cargas es que el pKa de la resina debe ser más bajo que el pH de carga del disolvente que contiene la proteína diana. La inactivación irreversible de algunas proteínas, por ejemplo quimosina (Foltmann, B. 1959 Acta. Chem. Scand. 13, 1927-1942) a pH neutro hace de esto un problema grave en la selección de resinas adecuadas.

A pesar de la disponibilidad de esta multiplicidad de técnicas generales para separar y purificar moléculas diana tales como proteínas y péptidos de medios acuosos, generalmente se reconoce en la técnica que cuando debe recuperarse una molécula diana específica en un medio acuoso particular a una elevada eficacia deseada, generalmente las técnicas disponibles raramente, si lo hacen, proporcionan una eficacia de recuperación óptima para el compuesto diana específico seleccionado.

Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad de diseñar nuevas técnicas de recuperación o adaptar las técnicas disponibles siempre que se optimice la recuperación de un compuesto diana específico en un medio acuoso particular.

La presente invención proporciona dicho procedimiento mejorado para recuperar proteínas o péptidos diana de medios acuosos. El procedimiento ha demostrado ser particularmente eficaz en la recuperación de quimosina de medios acuosos incluyendo medios de fermentación y extractos acuosos que contienen la quimosina. La invención se basa en el descubrimiento de que una resina cromatográfica de modo mixto que comprende una matriz de soporte sólida que tiene unido covalentemente a la misma un ligando que comprende un grupo amina es altamente eficaz para recuperar quimosina.

En la presente invención los ligandos se han seleccionado cuidadosamente, para que tengan bajas densidades de ligando y sean capaces de unirse a la proteína diana con alta capacidad en condiciones en las que la resina está cargada o parcialmente no cargada. Por consiguiente, los problemas mencionados anteriormente de los procedimientos existentes se han superado.

Sumario de la invención

Por consiguiente, en un primer aspecto se proporciona un procedimiento para recuperar una proteína diana que tiene actividad de coagulación de la leche de un medio acuoso que contiene dicha proteína, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

(a) poner en contacto dicho medio con un material de resina en condiciones que permiten que la proteína diana se una al material de resina, comprendiendo dicho material de resina una matriz de soporte sólida y, unido covalentemente a la matriz, un ligando que es capaz de unirse a la proteína, siendo dicho ligando bencilamina o un derivado de la misma;

y (b) eluir la proteína del material de resina.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un material de resina cromatográfica que comprende una matriz de soporte sólida y, unido covalentemente a la matriz, un ligando que es capaz de unirse a una proteína o péptido diana, siendo dicho ligando bencilamina o un derivado de la misma.

En un aspecto adicional más, la invención se refiere a un procedimiento para recuperar una proteína o péptido diana de un medio acuoso que contiene la proteína diana, comprendiendo el procedimiento poner en contacto el medio acuoso con el material de resina de la invención en condiciones en las que la proteína o péptido diana se une a la resina, y cambiar las condiciones de modo que la proteína o péptido diana eluya de la resina.

Descripción detallada de la invención

Un objetivo principal de la presente invención es proporcionar un procedimiento para recuperar una proteína diana que tiene actividad de coagulación de la leche de un medio acuoso que contiene dicha proteína.

Como se usa en este documento, la expresión "proteína que tiene actividad de coagulación de la leche" se refiere a cualquier enzima incluyendo proteasas que cause la coagulación de la leche. Dichas enzimas se usan ampliamente en la fabricación de queso y también se conocen generalmente como cuajos (principalmente enzimas de coagulación de leche de origen animal) y coagulantes microbianos. Las fuentes principales de enzimas que coagulan la leche son tejidos animales y microorganismos que producen de forma natural proteasas que tienen actividad de coagulación de la leche. La enzima del cuajo animal principal es quimosina (EC 3.4.23.4), una proteasa ácida que existe en el estómago donde se excreta como precursor, proquimosina, que puede activarse a un pH por debajo de 5. También la pepsina (EC 3.4.23.1-3) que se secreta por la membrana de la mucosa gástrica como una proenzima no activa, pepsinógeno, que se activa por la acción del ácido estomacal, se usa como cuajo. Adicionalmente, un amplio intervalo de microorganismos, bacterias y hongos filamentosos, produce de forma natural proteasas que tienen actividad de coagulación de la leche. Por tanto, varias especies de *Bacillus* son fuentes de dichas enzimas. Entre los hongos filamentosos, al menos las siguientes especies son conocidas por producir enzimas del cuajo: *Rhizomucor pusillus, Rhizomucor miehei* y *Cryphonectria parasitica*. Las preparaciones de dichas enzimas de coagulación de la leche microbianas se proporcionan como fermentados brutos o al menos parcialmente purificados de los organismos fuente. Además, se contempla que extractos vegetales que causan la coagulación de la leche también están incluidos en el procedimiento de la presente invención. Se describen en la técnica varios extractos vegetales que causan la coagulación de la leche incluyendo extracción de las enzimas de coagulación de la leche de *Cynara* spp.

En los últimos años, se han desarrollado procedimientos para producir quimosina de forma recombinante insertando un gen que codifica la enzima en células huésped microbianas adecuadas y cultivando las células huésped en condiciones en las que se expresa el gen, y recuperando la enzima del medio de fermentación (fermentado). Se ha descrito un intervalo de células huésped para este propósito, tales como, por ejemplo, cepas bacterianas de *E. coli* y especies de *Bacillus*, cepas de especies de levaduras incluyendo *Kluyveromyces lactis, Pichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae*, cepas de hongos filamentosos incluyendo por ejemplo especies de *Aspergillus*, especies de *Mucor* o especies de *Rhizomucor*. La recuperación de dichas enzimas de coagulación de la leche producidas de forma recombinante también se incluye en la presente invención.

El procedimiento de la invención para recuperar de un medio acuoso una proteína diana como se ha definido anteriormente, que tenga actividad de coagulación de la leche comprende la etapa de poner en contacto el medio acuoso con un material de resina cromatográfica de modo mixto en condiciones que permiten que la proteína diana se una al material de resina. El material de resina de la invención comprende una matriz de soporte sólida y, unido covalentemente a la matriz, un ligando como se ha definido anteriormente en este documento que es capaz de unirse a la proteína. La expresión "matriz de soporte sólida" se refiere al material estructural sólido de la resina que contiene una funcionalidad reactiva que permite la unión covalente del ligando a dicho material estructural.

El material estructural puede ser inorgánico tal como por ejemplo, sílice, u orgánico. Los materiales estructurales orgánicos que son útiles en este documento incluyen como ejemplos celulosa y derivados de la misma, agarosa, dextrano, polímeros tales como por ejemplo poliacrilatos, poliestireno, poliacrilamida, polimetacrilato, copolímeros. Adicionalmente, pueden usarse ter-polímeros o polímeros superiores con la condición de que al menos uno de los monómeros contenga una funcionalidad reactiva en el polímero resultante.

Las funcionalidades reactivas de la matriz de soporte sólida que permiten la unión covalente del grupo ligando son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, hidroxilo, carboxilo, tiol y amino.

Como se usa en este documento, el término "ligando" se refiere a un grupo que consta de una amina seleccionada como se define en este documento, y un brazo espaciador para unir covalentemente el ligando a la matriz de soporte sólida donde la amina es preferiblemente capaz de estar electrostáticamente cargada a un pH y estar electros-

táticamente no cargada a otro pH. El brazo espaciador puede ser cualquier grupo o sustituyente que sea capaz de unir covalentemente la amina seleccionada a la matriz de soporte sólido. Dichos brazos espaciadores son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, grupos alquileno, grupos aromáticos, grupos alquilaromáticos, grupos amido, grupos amino, grupos urea, grupos carbamato, grupos -R_1-Y-R_2 en los que R_1 y R_2 son grupos alquileno e Y es por ejemplo oxígeno o azufre. Un ejemplo de un brazo espaciador útil es epiclorhidrina.

El medio acuoso que contiene la proteína diana se pone en contacto con la resina de la invención en condiciones que permite que la proteína diana se una al material de resina. El contacto se hace típicamente cargando el medio acuoso en una columna cromatográfica que contiene un lecho del material de resina. El lecho puede se un lecho compactado o un lecho expandido o cualquier otra forma de lecho que sea adecuada para el propósito pretendido. Cuando se usa un modo de lecho expandido, la carga se hace convenientemente bombeando el medio en la columna desde la parte inferior o sobre la parte superior de la columna. El caudal depende del volumen del lecho y la cantidad de material de resina en la columna. Un caudal típico está en el intervalo de 1-20 cm/min tal como 5-10 cm/min, por ejemplo 7,5 cm/min. Dicha velocidad provoca que el lecho del material de resina llegue a estar fluidizado, creando de este modo un lecho expandido.

En realizaciones útiles, el ligando que se une a la proteína diana se selecciona para que obtenga el ligando, en las condiciones que permitan que la proteína diana se una al material de resina, que puede estar electrostáticamente cargado o no cargado dependiendo del pH del tampón. Antes de cargar el medio acuoso en la columna, el material de resina típicamente se equilibra a las condiciones de pH a las que sucede la unión de la proteína diana. La etapa de equilibrado se realiza típicamente aplicando un tampón a un pH en el intervalo de 3-10 tal como en el intervalo de 5-7.

El pH del medio acuoso por ejemplo se preajusta a un pH tal como en el intervalo de 3-10 incluyendo el intervalo de 5-7. Se ha descubierto que los materiales de resina de la invención son altamente eficaces incluso a una densidad relativamente baja. Por tanto, se descubrió que puede conseguirse una eficacia de recuperación muy elevada para quimosina usando un material de resina que tenga una concentración (densidad) de ligando que sea al menos 150 μmol por ml del material de resina sedimentado, tal como un máximo de 100 μmol/ml o incluso como máximo 75 μmol/ml.

En realizaciones preferidas, el procedimiento de la invención recupera al menos el 50% de la cantidad total de proteína diana inicialmente presente en el medio acuoso, incluyendo al menos el 60%, 70%, 80% o 90% de recuperación. Se han descubierto índices de recuperación incluso mayores, tales como al menos el 92,5% 95%, 97,5% o al menos el 99%.

El procedimiento de la invención para recuperar enzimas de coagulación de la leche puede usarse para cualquiera de dichas enzimas que se han definido anteriormente. Por tanto, el procedimiento incluye procedimientos en los que el medio acuoso que contiene la proteína diana es un medio de fermentación microbiano, incluyendo un medio que se ha usado para cultivar un microorganismo recombinante capaz de expresar una enzima de coagulación de la leche de origen animal, vegetal o microbiano, o un extracto acuoso de un material de tejido animal. Una proteína diana de coagulación de la leche particularmente interesante incluye quimosina, pro-quimosina, pre-pro-quimosina y pepsina. En este contexto, dichas enzimas animales pueden obtenerse de cualquier especie animal que produzca de forma natural las enzimas, incluyendo una especie rumiante tal como especies bovinas, ovejas o cabras; cerdos y camellos.

Como se ha mencionado anteriormente, las enzimas que tienen actividad de coagulación de leche pueden producirse de forma recombinante, por ejemplo, en células huésped de especies fúngicas y especies bacterianas que expresan la enzima. Por consiguiente, el medio acuoso usado en el presente procedimiento puede ser un medio de fermentación de dichas células huésped recombinantes incluyendo especies filamentosas tales como especies de *Aspergillus*, especies de *Rhizomucor*, especies de *Penicillium*, y especies de levaduras incluyendo especies de *Pichia*, especies de *Hansenula*, especies de *Saccharomyces* y especies de *Kluyveromyces*. En este contexto, la especies de células huésped bacterianas adecuadas también incluyen especies de *Bacillus* y *E. coli*.

En una realización preferida, la matriz de soporte sólida está en forma de partículas compuestas que comprenden un componente de baja densidad de y un componente de alta densidad. Dichas partículas se describen en el documento WO 92/00799 del mismo propietario que se incorpora por la presente como referencia.

Los ejemplos de materiales que pueden usarse en dichas partículas como componente de baja densidad incluyen partículas de vidrio huecas, agarosa, celulosa y polímeros sintéticos tales como los mencionados anteriormente. Como componente de alta densidad puede usarse un material, por ejemplo, seleccionado entre partículas de vidrio sólidas, partículas cerámicas y partículas metálicas. Las ventajas de usar dichos materiales de matriz de soporte sólida compuestos incluyen que es posible, seleccionando la proporción apropiada entre los componentes de alta densidad y los componentes de baja densidad, proporcionar materiales de resina de la invención que tengan una densidad que se adapte específicamente a los requisitos específicos definidos por la proteína diana y el medio acuoso que la contiene. Por tanto, pueden proporcionarse materiales de resina que son útiles en la presente invención que tengan una densidad en el intervalo de 1,01 a 5,0 por ejemplo, en el intervalo de 1,1 a 2,0, 1,2 a 1,8 o 1,3 a 1,7. También es posible proporcionar resinas que tengan una densidad por debajo de 1,0 tal como una densidad en el intervalo de 0,5 a 0,99, por ejemplo en el intervalo de 0,6 a 0,9 incluyendo el intervalo de 0,7 a 0,8.

El presente procedimiento para recuperar una proteína que tenga actividad de coagulación de la leche es útil para procesar medios acuosos en volúmenes de gran escala en condiciones de fabricación industrial. Por tanto, el procedimiento es aplicable como un procedimiento en el que el material de resina, por ejemplo, en un modo de lecho expandido, esté contenido en una columna que tenga un volumen total de 100 litros o más, tal como al menos 200 litros, o al menos 500 litros, por ejemplo 1000 litros o incluso varios miles de litros.

En una realización más específica, el procedimiento para recuperar una proteína diana que tenga actividad de coagulación de la leche comprende uno o más ciclos comprendiendo cada uno al menos una de las siguientes etapas: (i) proporcionar un lecho expandible (fluidizable) del material de resina en una columna cromatográfica a una altura de lecho sedimentado por encima de 20; (ii) equilibrar el material de resina a un pH en el intervalo de 3-10; (iii) cargar el medio acuoso en la columna a una velocidad lineal que está en el intervalo de 5-10 cm/min para unir la proteína diana; (iv) lavar la columna cargada usando un tampón de lavado que tiene un pH en el intervalo de 3-10; (v) eluir la proteína diana unida de la columna aplicando a la columna un tampón que tiene un pH por debajo del pI de la proteína diana, típicamente un tampón de pH < 7; por ejemplo < 6, < 5 o < 4, y (vi) regenerar la columna en condiciones alcalinas. Dicho procedimiento es útil para recuperar quimosina y preferiblemente, se usa una resina seleccionada que tiene una capacidad de unión a quimosina de al menos 100 Unidades Internacionales de Coagulación de la Leche (IMCU)/ml de resina sedimentada, tal como al menos 1000 IMCU/ml de resina sedimentada, incluyendo 5000 IMCU/ml de resina sedimentada, tal como 7.500 IMCU/ml de resina sedimentada incluyendo al menos 10.000 IMCU/ml. Un ligando actualmente preferido para recuperar quimosina es bencilamina o un derivado de la misma.

Puede preferirse realizar el procedimiento anterior usando dos columnas cromatográficas cargadas con material de resina de acuerdo con la invención, donde las dos columnas están conectadas en serie. En dicha realización, la primera columna se sobrecarga, es decir, el volumen de medio acuoso aplicado a la columna excede la capacidad de unión máxima del material de resina, para obtener la concentración más alta posible de quimosina purificada en el afluente de la primera columna. La proteína diana que no se une a la primera columna debido a la sobrecarga se unirá en la segunda columna. Cuando la primera columna se carga completamente, se desconectan las columnas. La primera columna se lava, se eluye, se regenera y se ajusta su pH. Después se coloca la primera columna en serie después de la segunda columna y la segunda columna puede ahora sobrecargase con quimosina. Se realizan ciclos repetidos hasta que se recupere sustancialmente toda la proteína diana.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un material de resina cromatográfica seleccionado como se ha definido anteriormente en este documento que comprende una matriz de soporte sólida y, unido covalentemente a la matriz, un ligando que es capaz de unirse a la proteína o péptido diana. Se contempla que dicho ligando es útil en un procedimiento para recuperar una proteína o péptido diana de un medio acuoso que contiene la proteína diana, comprendiendo el procedimiento poner en contacto el medio acuoso con el material de resina en condiciones en las que la proteína o péptido diana se une a la resina, y cambiar las condiciones de modo que la proteína o péptido diana eluya de la resina. En una realización útil de dicho procedimiento general, el ligando que es capaz de unirse a la proteína o péptido diana es bencilamina incluyendo derivados de la misma. Las proteínas o péptidos diana que pueden recuperarse por dicho procedimiento incluyen proteínas o péptidos farmacéuticamente activos incluyendo como ejemplos, hormonas peptídicas, insulina y citoquinas, y enzimas que no tienen actividad de coagulación de la leche tales como por ejemplo otras proteasas, lipasas, fosfolipasas, enzimas que degradan carbohidratos incluyendo enzimas que degradan disacáridos y oligosacáridos incluyendo almidón, celulosa y hemicelulosa, produciéndose típicamente dichas enzimas usando células huésped recombinantes que expresan la proteína o péptido.

Cuando el procedimiento de la invención se realiza en un modo de lecho expandido, la columna que contiene el lecho puede estar provista de un medio para agitar al menos parte del lecho fluidizado u otro medio para obtener una distribución uniforme de las partículas que componen el lecho fluidizado y evitar de este modo la existencia de turbulencia o formación de canales en el lecho. Típicamente, dicho medio de agitación u otro medio tal como un medio de distribución, por ejemplo, una placa perforada, puede proporcionarse en la parte inferior de la columna que contiene el material de resina.

La invención se ilustra adicionalmente en el siguiente ejemplo y los dibujos, en los que

la Figura 1 es un diagrama esquemático de un ajuste de Adsorción de Lecho Expandido (EBA) incluyendo las condiciones convencionales EBA usadas durante la etapa de carga, lavado, elución, limpieza en el sitio (CIP) y equilibrado. RV: volúmenes de resina (lecho sedimentado);

la Figura 2 es un gráfico que muestra el rendimiento de recuperación para quimosina y la capacidad de unión para quimosina de MIMO™ 1300 (Upfront Chromatography, Copenhagen, Dinamarca) (resina con bencilamina como ligando), respectivamente frente a la altura de lecho de resina a una velocidad lineal v = 7,5 cm/min;

la Figura 3 muestra la recuperación de quimosina de camello recombinante;

la Figura 4 representa una ilustración esquemática del ajuste EBA para la purificación de quimosina y pepsina de extractos de ternera y buey incluyendo las condiciones usadas durante la fase de carga, lavado, elución, CIP y equilibrado;

la Figura 5 ilustra la recuperación para coagulantes de cuajo animal usando Mimo™ 1300.

la Figura 6 es un gráfico que muestra los resultados de un estudio de unión de quimosina a Mimo™ 1300 a diferentes valores de pH; y

la Figura 7 es un gráfico que ilustra la valoración de la resina Mimo™ 1300 con el ligando bencilamina, línea negra dV/dpH, línea delgada ml aplicados de NaOH 0,1 M.

Ejemplo 1

Recuperación de quimosina de un medio de fermentación

En este experimento, se filtró un lote de un fermentado producido cultivando una cepa recombinante de *Aspergillus awamori* que expresa quimosina bovina para retirar sustancialmente la biomasa fúngica y los desechos celulares. El pH del filtrado se ajustó a aproximadamente 2. Este filtrado que contiene quimosina bruto se usó como material de partida en un ciclo de procedimiento de recuperación que se describe a continuación (véase la Figura 1). Antes del procedimiento de recuperación, se ajustó el pH de filtrado ácido a un pH de aproximadamente 6,0 usando NaOH al 27% (p/p).

La quimosina se recuperó del filtrado neutralizado de este modo usando una columna cromatográfica que contiene un lecho de resina Mimo™ 1300 a una altura de lecho sedimentado de aproximadamente 55 cm. En las condiciones usadas, la resina tenía una capacidad de unión de quimosina de aproximadamente 9000 IMCU de quimosina por ml de resina sedimentada. La capacidad de unión y el rendimiento aumentaron cuando se aumentó la altura del lecho del material de resina como se observa en la Figura 2.

Antes de cargar el filtrado a la columna, se equilibro el lecho de resina para ajustar al pH usado durante la carga. El equilibrado se hizo aplicando tampón fosfato sódico 25 mM, pH 5,5.

La etapa de carga (etapa 1) se realizó bombeando el filtrado en la columna en la parte inferior a un caudal lineal de aproximadamente 7,5 cm/min y la carga de la columna se continuo hasta que se hubo alcanzado o incluso se hubo excedido la capacidad de unión de la resina, es decir, hasta el 150% tal como el 135% de la capacidad de unión.

Después de la etapa de carga, se lavó la columna para retirar cualquier sustancia no unida de la columna usando 4 volúmenes de resina (sedimentada) (RV) de tampón fosfato sódico 25 mM, pH 5,5 (etapa 2).

En una etapa posterior, se eluyó la quimosina unida (etapa 3) aplicando 4 RV de tampón fosfato sódico 150 mM, pH 2,5 en la columna previamente lavada.

Después de la etapa de elución, la resina se sometió a una etapa de regeneración (o CIP) (etapa 4) para retirar las sustancias restantes del material de partida que no se habían retirado en la etapa de elución. Esta etapa se realizó aplicando 4 RV de NaOH 1 M (pH > 12) en la columna. En una etapa final 5, la resina regenerada de este modo de la columna regenerada se sometió a una etapa de equilibrado usando 4 RV de tampón fosfato sódico 250 mM, pH 5,5.

Después de esta etapa de equilibrado la columna estuvo lista para usarse en un ciclo de procedimiento de recuperación adicional tal como un ciclo que se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 2

Purificación de quimosina de camello recombinante de caldo de Aspergillus awamori usando absorción en lecho expandido

En este experimento, se cultivó la cepa recombinante de *Aspergillus awamori* que expresa el coagulante de camello en un medio nutriente complejo en un fermentador. Después de que finalizará la fermentación se filtró el fermentado para retirar la biomasa fúngica y los desechos celulares. Posteriormente se ajustó el pH del filtrado transparente a pH aproximadamente 2. Este filtrado bruto que contenía la quimosina de camello se usó como material de partida en el procedimiento de recuperación mostrado en la figura (Figura 1). Además, antes del procedimiento de recuperación se ajustó el pH del filtrado a aproximadamente pH 6 usando NaOH al 27% (p/p).

Se cargó una columna semi-piloto de lecho expandido (2 cm de diámetro, 200 cm de altura) a 70 cm (245 ml) de resina Mimo™ 1300. En las condiciones usadas, la resina tenía una capacidad de unión dinámica de aproximadamente 5000 IMCU/ml de resina sedimentada.

Antes de cargar el filtrado en la columna, se expandió la resina a un caudal lineal de 7,5 cm/min en tampón de equilibrado usando tampón $NaPO_4$ 25 mM, pH 6. Al mismo caudal se cargó el filtrado (Figura 1, etapa 1) en la columna y se continuó la carga hasta que se hubo alcanzado o incluso excedido la capacidad de unión de la resina.

Después de la etapa de carga se lavó la resina (Figura 1, etapa 2) con tampón de equilibrado para retirar las impurezas y las sustancias unidas débilmente de la columna usando 2-3 RV de tampón. En la etapa posterior (Figura 1, etapa 3) se eluyó el coagulante de camello de la resina aplicando 4 RV de tampón $NaPO_4$ 122 mM; pH 2,5.

En la siguiente etapa (Figura 1, etapa 4) se sometió la resina a regeneración (o CIP) para retirar los componentes del filtrado que no se habían retirado durante la etapa de elución. Se aplicaron 5 RV de NaOH 1 M en la columna para la regeneración de la resina. Finalmente, la resina se sometió a una etapa de equilibrado (Figura 1, etapa 5) usando 3 RV de MQ-agua y 6 RV de tampón de equilibrado. Después de la etapa 5 la resina estuvo lista para usarse en un ciclo de recuperación adicional como se ha descrito anteriormente.

La purificación de quimosina de camello recombinante se repitió exitosamente en 5 ciclos de purificación con recuperaciones que varían del 85% hasta el 93% (Figura 3).

Ejemplo 3

Purificación y separación de quimosina y pepsina del estómago de ternera y buey (cuajo animal)

El siguiente ejemplo describe la purificación y separación de cuajo animal, es decir, quimosina y pepsina del estómago de ternera y buey.

El extracto bruto usado en el procedimiento se preparó de una extracción salina pH neutro de estómagos animales (ternera o bovino adulto). Después de finalizar la extracción se filtró el extracto para retirar las partículas insolubles, biomasa y desechos celulares. El extracto que contenía las enzimas inactivas principales se activó posteriormente ajustando el pH a aproximadamente 2. Los coagulantes encontrados en el extracto de cuajo animal activado constaban de quimosina, es decir, al menos seis variantes de pI 4,6-5,0, mwt 35000, pepsina, de cinco a siete variantes (fosforilaciones) de aproximadamente pI 1,6-2,0, mwt 35000 y gastricsina, un componente minoritario, aproximadamente pI 3,5-3,8, mwt 35000. La quimosina constituía el 20-80%, la pepsina el 15-80% y la gastricsina el 1-5% de la actividad total (dependiendo del tipo de estómago). El extracto activado se usó como material de partida en el procedimiento de recuperación mostrado en la figura (Figura 4).

Se cargó una columna semi-piloto de lecho expandido (2 cm de diámetro, 200 cm de altura) a 50 cm (175 ml) de resina Mimo™ 1300. Antes de cargar el extracto en la columna, se expandió la resina a un caudal lineal de 5,0 cm/min en tampón de equilibrado usando tampón H_3PO_4 20 mM, pH 5,8. Al mismo caudal se cargó el extracto del cuajo (Figura 4, etapa 1) en la columna y se continuó la carga hasta que se hubo alcanzado o incluso excedido la capacidad de unión de la resina.

Después de la etapa de carga se lavó la resina (Figura 4, etapa 2) con tampón de equilibrado para retirar las impurezas y las sustancias unidas débilmente de la columna usando 8-10 RV. En la etapa posterior (Figura 4, Elución I - etapa 3) se eluyó principalmente quimosina de la resina aplicando 6-7 RV de tampón $NaPO_4$ 150 mM; pH 3,0 seguido por una etapa de elución adicional (Figura 4, Elución II - etapa 4) en la que se desorbió principalmente pepsina de la resina usando 6-7 RV de HCl 50 mM.

Después de la elución, se sometió la resina a regeneración (Figura 4, etapa 5) para retirar los componentes del extracto que no se habían retirado durante la etapa de elución. Se aplican a un 7 RV de NaOH 1 M en la columna para la regeneración de la resina. Finalmente, la resina se sometió a una etapa de equilibrado (Figura 4, etapa 6) usando 3 RV de MQ-agua y 6 RV de tampón de equilibrado. Después de la etapa 6, la resina estuvo lista para usarse en un ciclo de recuperación adicional, como se ha descrito anteriormente.

La purificación de los coagulantes de cuajos animales se repitió exitosamente en 7 (5 experimentos en los que se separó quimosina y pepsina y 2 experimentos sin separación) ciclos de purificación con recuperaciones que varían del 72% hasta el 88% (Figura 5).

Ejemplo 4

Estudio de unión de quimosina a Mimo™ 1300 a diferentes valores de pH

En el presente experimento se cultivó la cepa recombinante de *Aspergillus awamori* que expresa el coagulante en un medio nutriente complejo en un fermentador. Después de la finalización de la fermentación, se filtró el fermentado para retirar la biomasa fúngica y los desechos celulares. Posteriormente se ajustó el pH del filtrado transparente a pH aproximadamente 2. Este filtrado bruto que contenía el coagulante se usó como material de partida en el estudio de unión de quimosina a Mimo™ 1300 a diferentes valores de pH (Figura 6). Antes del procedimiento de recuperación se ajustó el pH del filtrado a pH 4,5-5,0, 5,5 y 6,0, respectivamente.

Se cargó una columna semi-piloto de lecho expandido (2 cm de diámetro, 200 cm de altura) con 70 cm (245 ml) de resina Mimo™ 1300. Antes de cargar el filtrado en la columna, se expandió la resina a un caudal lineal de 7,5 cm/min en tampón de equilibrado usando tampón $NaPO_4$ 25 mM. Al mismo caudal, se cargó el filtrado ajustado al valor de pH deseado (Figura 1, etapa 1) en la columna. La carga (aproximadamente 10500 IMCU/ml de resina sedimentada) se continuó hasta que se hubo alcanzado o incluso excedido la capacidad de unión de la resina.

Después de la etapa de carga se lavó la resina (Figura 1, etapa 2) con tampón de equilibrado para retirar las impurezas y las sustancias unidas débilmente de la columna usando 2-3 RV de tampón. En la etapa posterior (Figura 1, etapa 3) se eluyó la quimosina de la resina aplicando 4 RV de tampón $NaPO_4$ 122 mM, pH 2,5. En la siguiente etapa

(Figura 1, etapa 4) la resina se sometió a regeneración (o CIP) para retirar los componentes del filtrado que no se había retirado durante la etapa de elución. Se aplicaron 5 RV de NaOH 1 M en la columna para la regeneración de la resina. Finalmente, la resina se sometió a una etapa de equilibrado (Figura 1, etapa 5) usando 3 RV de MQ-agua y 6 RV de tampón de equilibrado. Después de la etapa 5 la resina estuvo lista para usarse en un ciclo de recuperación adicional como se ha descrito anteriormente.

La purificación de quimosina recombinante con respecto a la capacidad de unión y porcentaje de quimosina encontrados en la realización a través de la fracción a los diferentes valores de pH de carga se muestran en la Figura 8. A partir de la Figura 8 se concluye que la unión de quimosina en la resina es posible a todos los valores de pH medidos. La capacidad de unión, sin embargo, se reduce disminuyendo el pH, probablemente un resultado debido a la reducción en la interacción electrostática entre quimosina (pI 4,5) y el ligando (pKa 7) responsable de la interacción bioespecífica entre quimosina y la resina Mimo™ 1300. Por tanto, la resina es capaz de unirse al coagulante en condiciones en las que la resina está cargada a más de 50% durante la carga.

Ejemplo 5

Estudio de viabilidad de purificación de proteasa de Rhizomucor miehei por resina Mimo™ 1300

En este ejemplo se fabricó una enzima de coagulación de la leche por fermentación sumergida del hongo *Rhizomucor*. La enzima de coagulación de la leche activa es la proteasa de *Rhizomucor miehei* (EC 3.4.23.23) que pertenece a las aspartil proteasas. El estudio a escala pequeña descrito a continuación se realizó para aclarar si la resina Mimo™ 1300 era viable para la purificación de la proteasa de *Rhizomucor miehei*.

Se equilibró una columna de 10 ml Mimo™ 1300 cargada en una columna Econo-Pac 1,5 x 12 cm (BioRad, Hercules, CA) con 2 volúmenes de resina (RV) de tampón acetato sódico 80 mM a pH 5,5. El flujo de disolvente en la columna fue de aproximadamente 1-2 ml/min, dirigido por gravedad. La columna Mimo™ 1300 se cargó con 18 ml de medio de fermentación filtrado, conservado con NaCl al 15% y benzoato sódico al 0,4% (Chr. Hansen A/S, Hørsholm, Dinamarca). Después de la carga se lavó la columna con 2 RV de tampón de equilibrado y se eluyó con 2 RV de fosfato sódico 25 mM pH 2,5. Las muestras se recogieron durante la carga, lavado y elución de la columna. Las muestras se recogieron en fracciones de acuerdo con la actividad de coagulación de la leche determinada. La actividad de la fracción y el porcentaje de recuperación se presentan en la siguiente Tabla:

TABLA 1

Recuperación de unidades de coagulación de la leche, en purificación de proteasa de Rhizomucor miehei por resina Mimo™ 1300

Fracción	Volumen, ml	Actividad, IMCU	% de Recuperación
Fermentado	18	31.500	-
Procesamiento	18	<36	0
Lavado	20	1.900	6%
Eluido 1	6	<12	
Eluido 2	10	19.859	63%

Conclusión

La resina Mimo™ 1300 es muy adecuada para la purificación de la proteasa de *Rhizomucor miehei*. Puede conseguirse una recuperación mejorada, más que la obtenida del 63% de la actividad cargada demostrada en el presente experimento, cuando se aplican alturas de lecho de resina mayores (como se observa en la Figura 2). Además, como se no se ha hecho optimización del flujo, pH y conductividad durante la carga en este experimento, se espera que aparezca un rendimiento significativamente mejor a condiciones optimizadas.

Ejemplo 6

Aislamiento de quimosina/pepsina de extracto de estómago de buey usando cromatografía

Se acopló agarosa al 6% activada con epoxi con los siguientes ligandos amino:

4-(2-aminoetil)morfolina

1,8-diaminooctano

Octilamina

2-(2-aminoetil)piridina

2-aminopiridina

N-fenil-etilendiamina

1-fenil-5-mercapto tetrazol

2-mercaptopirimidina

Bencilamina

La concentración final de ligando de las diferentes matrices se determinó por valoración con HCl 0,1 N, véanse los resultados en la siguiente Tabla 2

TABLA 2

Ilustración de la concentraciones de ligando

Ligando	Concentración de ligando, μmol/g de matriz drenada por succión
4-(2-aminoetil)morfolina	59
1,8-diaminooctano	61
Octilamina	62
2-(2-aminoetil)piridina	67
2-aminopiridina	25
N-fenil-etilendiamina	40
1-fenil-5-mercapto tetrazol	40
2-mercaptopirimidina	20
Bencilamina	63

Materiales y procedimientos

El extracto de estómago de buey que contenía pepsina y quimosina se activó ajustando el pH a 2,2 con HCl 1 M. Después de 30 minutos se aumentó el pH a 5,7 con NaOH 1 M. El extracto se aclaró por el uso de un filtro auxiliar. Se determinó la actividad del extracto como de 25 IMCU/ml de extracto.

Cada matriz se equilibró con agua corriente. Se incubaron 0,5 ml de las matrices respectivas durante 1 hora con 50 ml del extracto aclarado (pH 5,7).

Después de la incubación, se recogió la matriz y se transfirió a una columna cromatográfica. El material no unido se eliminó de las matrices con agua corriente.

Las proteínas unidas se eluyeron añadiendo HCl 50 mM. El eluido se neutralizó con NaOH 1 M.

Resultados

La capacidad (ilustrada en la Tabla 3) de las diferentes matrices se estimó por ensayo de coagulación de la leche en los sobrenadantes después de incubación con las matrices.

TABLA 3

Capacidad de diferentes ligandos

Ligando	Capacidad
4-(2-aminoetil)morfolina	+
1,8-diaminooctano	+++
Octilamina	+++
2-(2-aminoetil)piridina	++
2-aminopiridina	0
N-fenil-etilendiamina	+++
1-fenil-5-mercapto tetrazol	0
2-mercaptopirimidina	0
Bencilamina	+++
+++ unida más del 90% de la enzima aplicada ++ unida el 50-90% de la enzima aplicada + unida el 10-50% de la enzima aplicada 0 unida menos del 10% de la enzima aplicada	

Recuperación de enzimas

La cantidad de enzimas eluidas de cada matriz se estimó por ensayo de coagulación de la leche. Véanse los resultados en la siguiente Tabla 4.

TABLA 4

Recuperación de enzimas de coagulación de la leche

Ligando	
4-(2-aminoetil)morfolina	+++
1,8-diaminooctano	+
Octilamina	+
2-(2-aminoetil)piridina	+++
2-aminopiridina	-
N-fenil-etilendiamina	+++
1-fenil-5-mercapto tetrazol	-
2-mercaptopirimidina	-
Bencilamina	+++
- sin resultados + 0-25% de las enzimas unidas se recuperaron en el eluido. +++ > 90% de las enzimas unidas se recuperaron en el eluido	

Ejemplo 7

Determinación de densidades de ligando y valores de pKa de resinas de Bencilamina, Morfolinamina y Octilamina

Preparación de resina. La resina se aclaró en un embudo de filtro de vidrio con 150 ml de solución de NaOH 0,1 M, HCl 0,1 M y NaCl 1 M. Entre cada solución se aclaró la resina con agua Milli-Q desgasificada (MQW). Para la valoración, se pesaron 5 g de resina en un recipiente de 100 ml y se suspendieron en 30 ml de MQW. La resina se valoró con NaOH a 0,1 M en un Methrohm 716 DMS Tritrino, usando aumentos de volumen de 0,020 ml, tolerando 3 mV de desplazamiento de señal y un tiempo de equilibrado de 600 segundos. Antes de la valoración, se preparó la solución de NaOH 0,1 M a partir de gránulos de NaOH y se ajustó el pH de la suspensión de resina con 100 μl de HCl 0,5 M.

Resultados

Usando el consumo básico de la valoración de las tres resinas se calcularon las densidades de ligando y se obtuvieron las siguientes densidades de ligando: 36 μmol de bencilamina/g de resina, 96 μmol de 4-(2-aminoetil)morfolina/g de resina y 35 μmol de octilamina/g de resina. Los valores de pKa se estimaron a partir de dV/dpH representada como función del pH. Las estimaciones de los pKa fueron 7,5, 5,5 y 7,7 para la resina de bencilamina, la resina de 4-(2-aminoetil)morfolina y la resina de octilamina respectivamente. A partir de las curvas de valoración presentadas (Figura 7, 8 y 9) es obvio que una parte significativa de las diferentes resinas se cargará si las resinas se hacen funcionar por debajo de pH 7.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para recuperar una proteína diana que tiene actividad de coagulación de la leche de un medio acuoso que contiene dicha proteína, comprendiendo el procedimiento las etapas de

(i) poner en contacto dicho medio con un material de resina en condiciones que permitan que la proteína diana se una al material de resina, comprendiendo dicho material de resina una matriz de soporte sólida y, covalentemente unido a la matriz, un ligando que es capaz de unirse a la proteína, siendo dicho ligando bencilamina, y

(ii) eluir la proteína del material de resina.

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en las condiciones que permiten que la proteína diana se una al material de resina, una proporción del ligando que está en el intervalo del 5-100% está cargado.

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el material de resine tiene una concentración de ligando que es como máximo 100 μmol por ml de material de resina.

4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se recupera al menos el 90% de la cantidad total de proteína diana inicialmente presente en el medio acuoso.

5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio acuoso que contiene la proteína diana se selecciona entre el grupo constituido por medio de fermentación microbiana y un extracto acuoso de un material de tejido animal o vegetal.

6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el medio de fermentación es un medio usado para cultivar un microorganismo recombinante capaz de expresar una enzima de coagulación de la leche de origen animal, el cultivo es en condiciones en las que se expresa la enzima.

7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la enzima de coagulación de la leche se selecciona entre el grupo constituido por quimosina, pro-quimosina y pepsina.

8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el microorganismo recombinante se selecciona entre el grupo constituido por especies fúngica y especies bacteriana.

9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que las especies fúngica se seleccionan entre el grupo constituido por especies de *Aspergillus*, especies de *Rhizomucor*, especies de *Penicillium* y especies de levaduras incluyendo especies de *Pichia*, especies de *Hansenula*, especies de *Saccharomyces* y especies de *Kluyveromyces*.

10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína diana que tiene actividad de coagulación de la leche se obtiene de una especie microbiana tal como especies de *Bacillus*.

11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el material de resina está en forma de partículas compuestas que comprende un componente de baja densidad y un componente de alta densidad.

12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el componente de baja densidad comprende un material seleccionado entre el grupo constituido por partículas de vidrio huecas, agarosa, celulosa y un polímero sintético.

13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, en el que el componente de alta densidad comprende un material seleccionado entre el grupo constituido por partículas de vidrio sólidas, partículas cerámicas y partículas metálicas.

14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la densidad de las partículas compuestas está en el intervalo de 1,01 a 5,0.

15. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la densidad de las partículas compuestas está en el intervalo de 0,5 a 0,99.

16. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el material de resina está contenido en una columna que tiene un volumen total de 100 litros o más.

17. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, en las condiciones que permiten que la proteína diana se una al material de resina, el ligando está esencialmente no cargado electrostáticamente y, en las condiciones en las que la proteína diana eluye, el ligando está cargado electrostáticamente.

18. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, en las condiciones que permiten que la proteína diana se una al material de resina, el ligando está esencialmente cargado electrostáticamente y, en las condiciones en las que la proteína diana eluye, el ligando está no cargado electrostáticamente.

19. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende uno o más ciclos que comprende las siguientes etapas:

(i) proporcionar un lecho del material de resina en una columna cromatográfica a una altura de lecho sedimentado por encima de 20 cm,

(ii) equilibrar el material de resina a un pH en el intervalo de 3-10,

(iii) cargar el medio acuoso en la columna a una velocidad lineal que está en el intervalo de 3-10 cm/min para unir la proteína diana;

(iv) lavar la columna cargada usando un tampón de lavado que tiene un pH en el intervalo de 3-7;

(v) eluir la proteína diana unida de la columna aplicando en la columna un tampón que tiene un pH por debajo del pI de la proteína diana, típicamente un tampón de pH <4, y

(vi) regenerar la columna en condiciones alcalinas.

20. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 19, en el que el material de resina tiene una capacidad de unión de quimosina de al menos 5.000 IMCU/ml.

21. Un material de resina cromatográfica que comprende una matriz de soporte sólida y, covalentemente unido a la matriz, un ligando que es capaz de unir la proteína o péptido diana, siendo dicho ligando bencilamina.

22. Un procedimiento para recuperar una proteína o péptido diana de un medio acuoso que contiene la proteína diana, comprendiendo el procedimiento poner en contacto el medio acuoso con el material de resina de la reivindicación 21 en condiciones en las que la proteína o péptido diana se une a la resina, y cambiar las condiciones de modo que la proteína o péptido diana eluya de la resina.

23. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en el que la proteína o péptido diana es una proteína o péptido farmacéuticamente activo.

24. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en el que la proteína o péptido diana es una enzima que no tiene actividad de coagulación de la leche.

25. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el material de resina es un lecho fluidizado expandido contenido en una columna cromatográfica.

26. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el material de resina contenido en la columna cromatográfica está en un estado de lecho fluidizado (expandido) y la columna está provista con un medio para agitar al menos parte del lecho fluidizado.

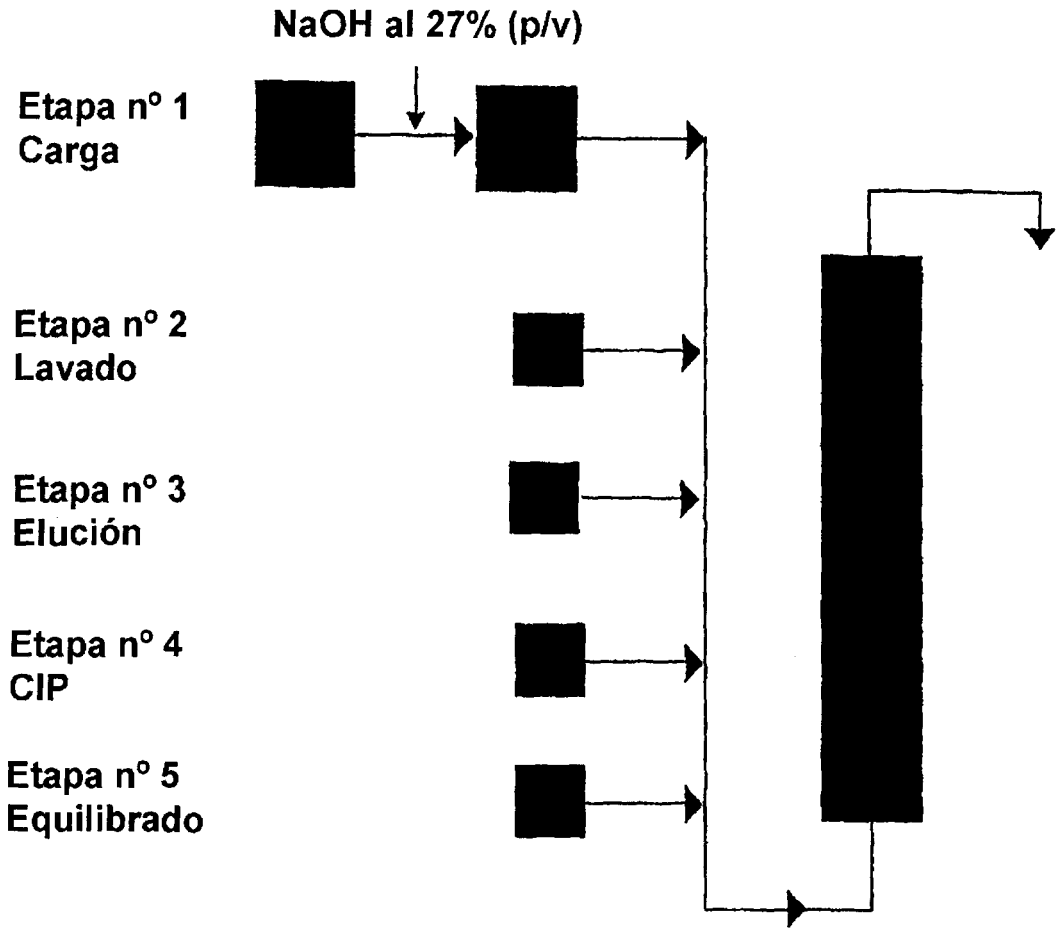

NaOH al 27% (p/v)
Etapa nº 1
Carga
Etapa nº 2
Lavado
Etapa nº 3
Elución
Etapa nº 4
CIP
Etapa nº 5
Equilibrado

Fig. 1

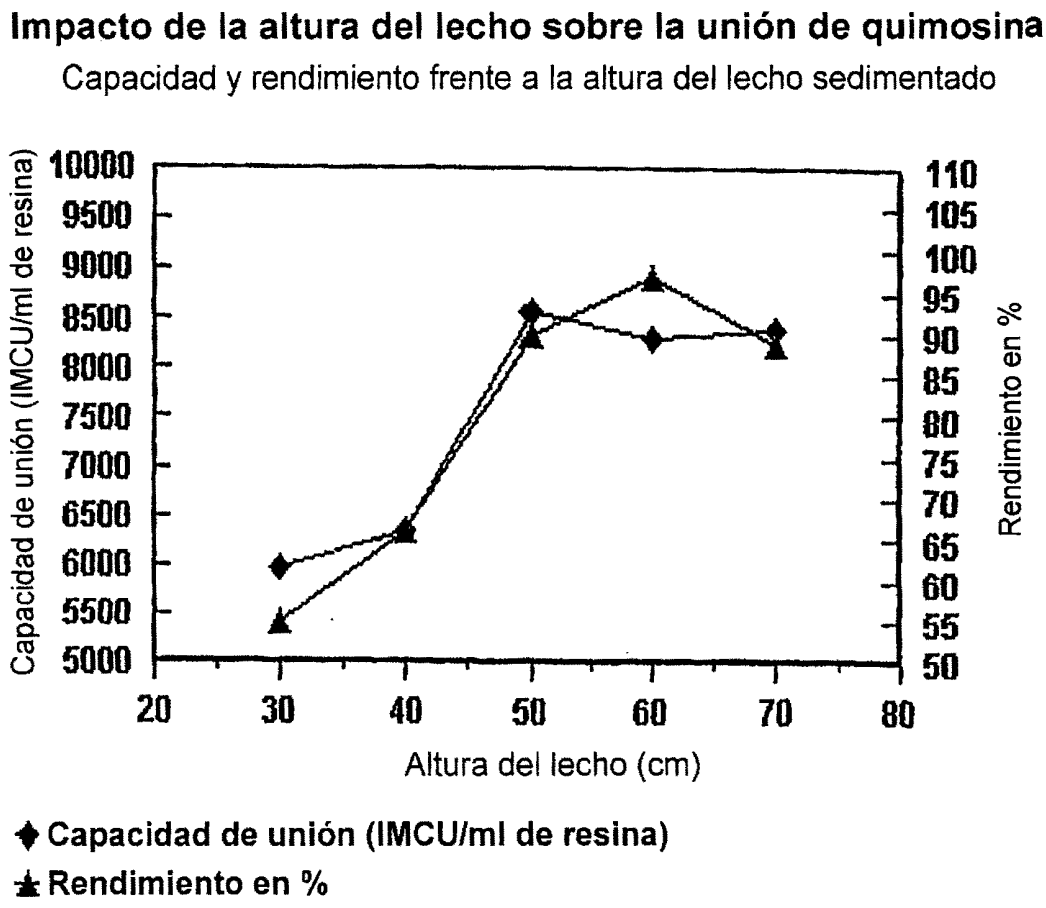

Impacto de la altura del lecho sobre la unión de quimosina
Capacidad y rendimiento frente a la altura del lecho sedimentado
Capacidad de unión (IMCU/ml de resina)
10000
9500
9000
8500
8000
7500
7000
6500
6000
5500
5000
110
105
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
Rendimiento en %
20
30
40
50
60
70
80
Altura del lecho (cm)
Capacidad de unión (IMCU/ml de resina)
Rendimiento en %

Fig. 2

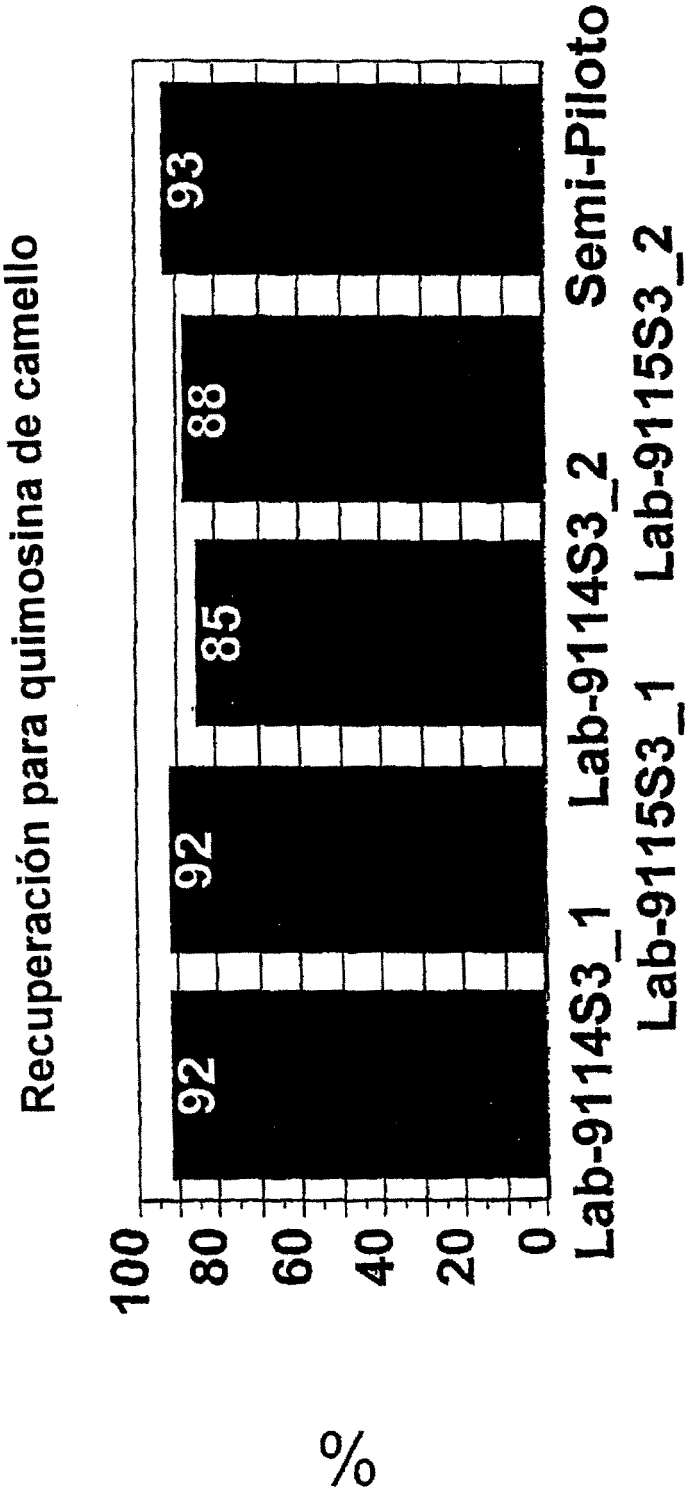

Recuperación para quimosina de camello
100
80
60
40
20
0
%
92
92
85
88
93
Lab-9114S3_1
Lab-9115S3_1
Lab-9114S3_2
Lab-9115S3_2
Semi-Piloto
Experimento

Fig. 3

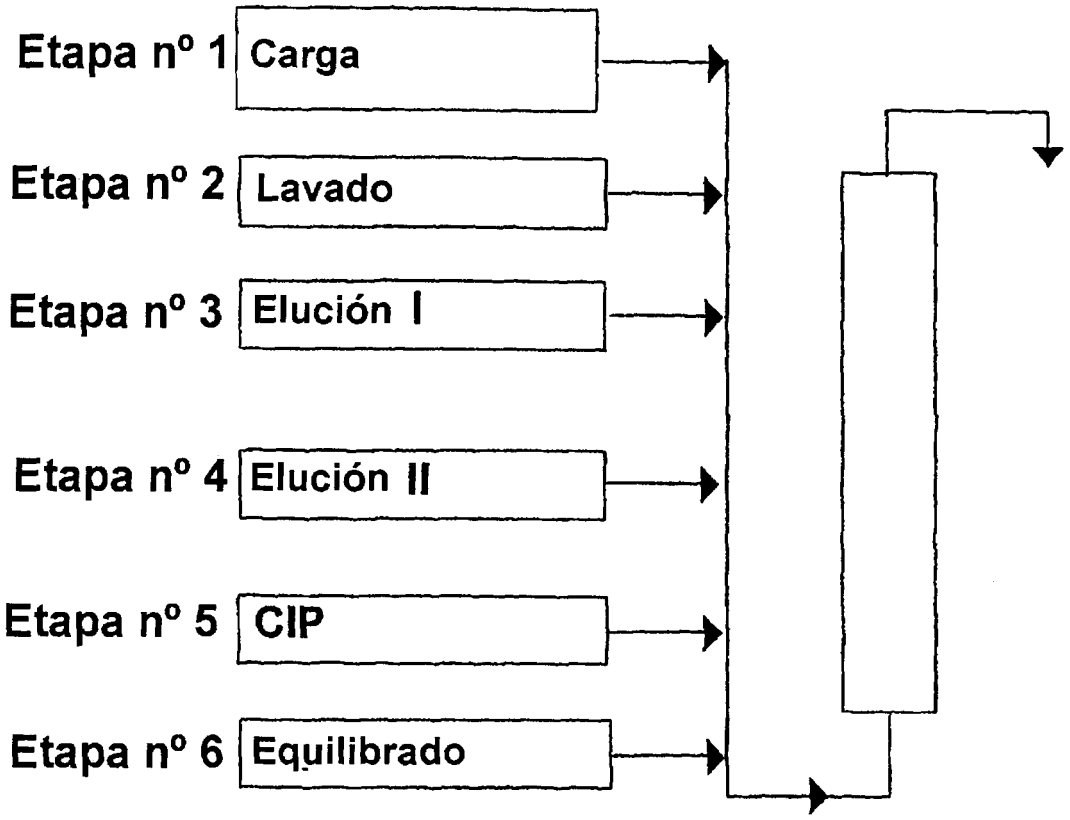

Etapa nº 1
Carga
Etapa nº 2
Lavado
Etapa nº 3
Elución I
Etapa nº 4
Elución II
Etapa nº 5
CIP
Etapa nº 6
Equilibrado

Fig. 4

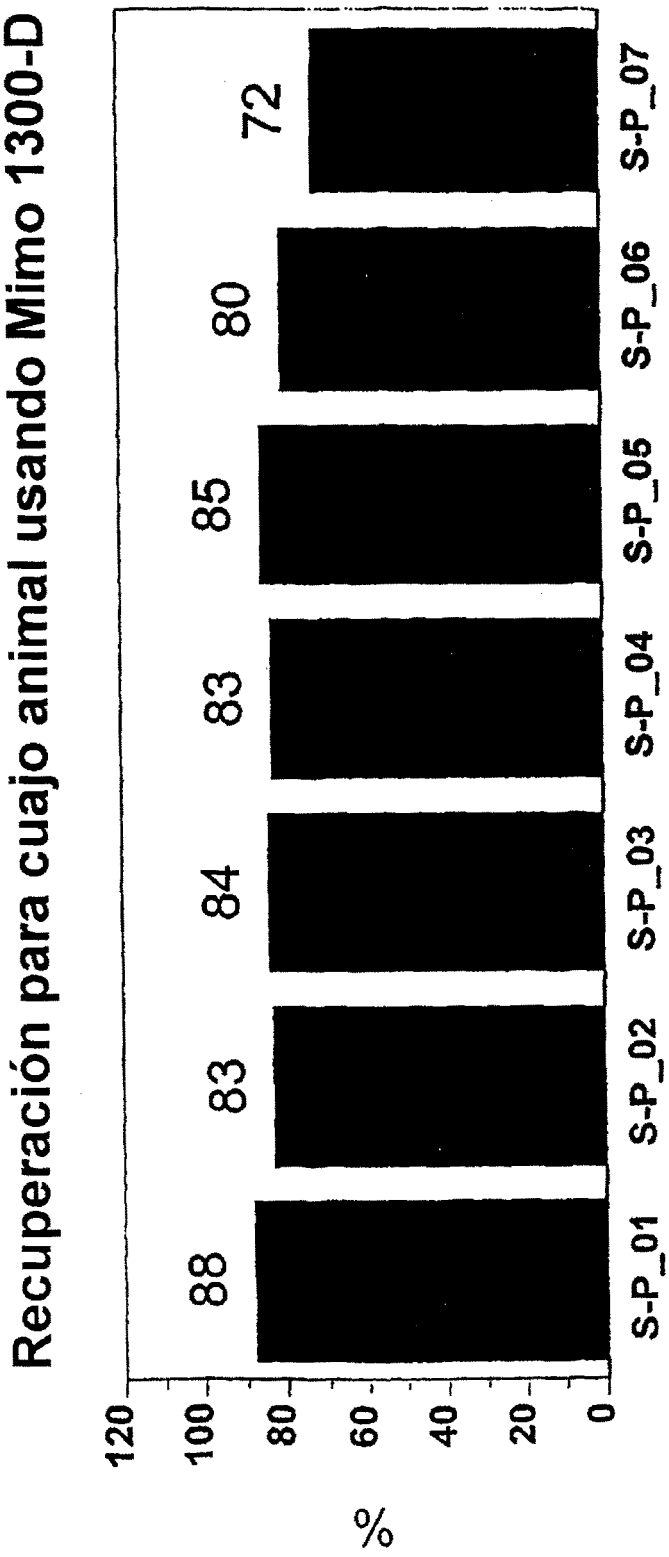

Recuperación para cuajo animal usando Mimo 1300-D
120
100
80
60
40
20
0
%
88
83
84
83
85
80
72
S-P_01
S-P_02
S-P_03
S-P_04
S-P_05
S-P_06
S-P_07
Experimento

Fig. 5

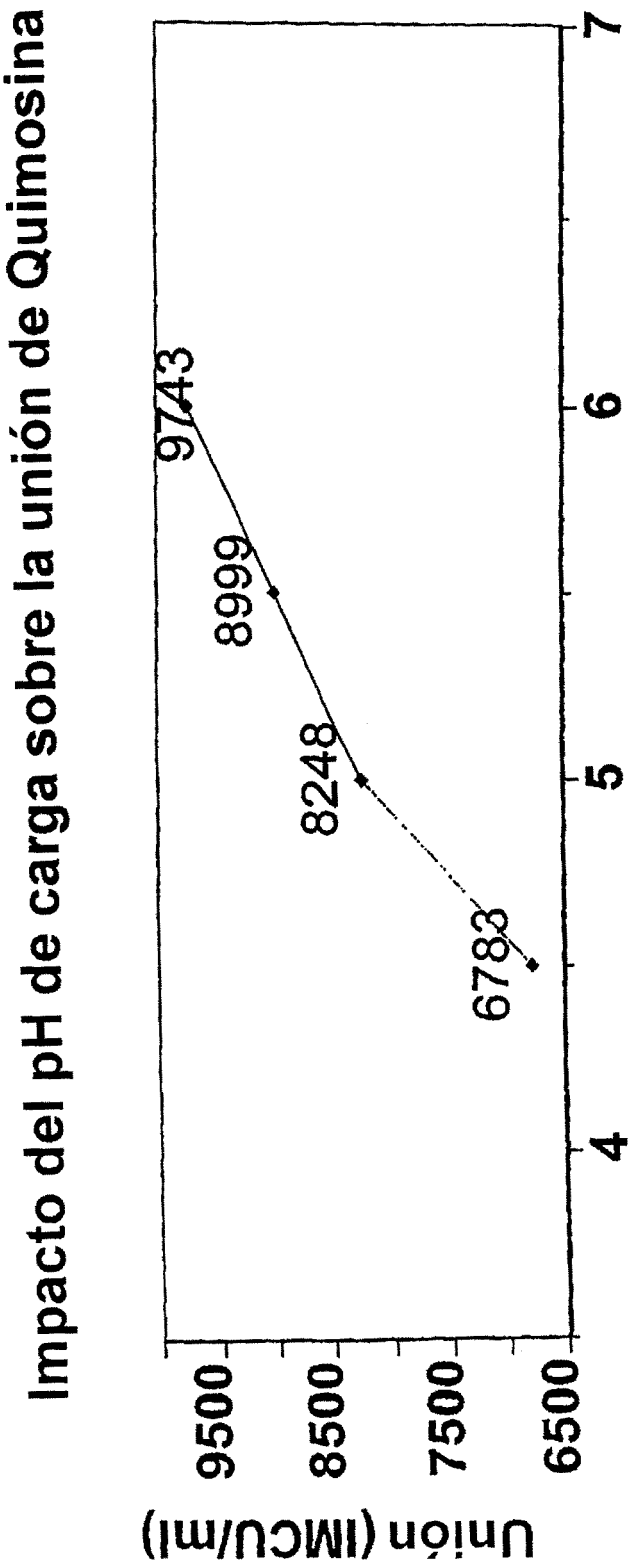

Impacto del pH de carga sobre la unión de Quimosina
Unión (IMCU/ml)
9500
8500
7500
6500
4
5
6
7
pH de carga
9743
8999
8248
6783

Fig. 6

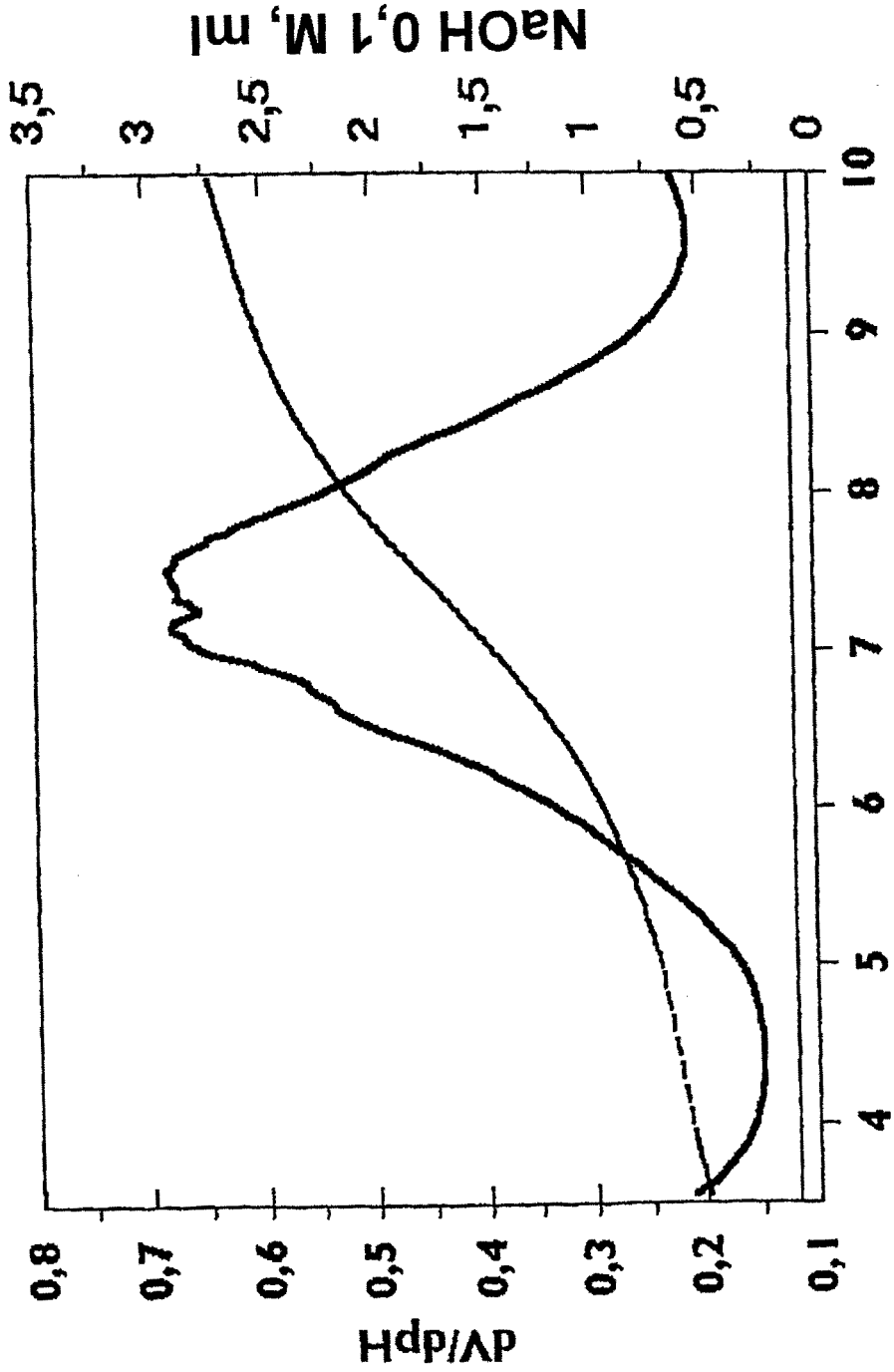

NaOH 0,1 M, ml
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
10
9
8
7
6
5
4
pH
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
dV/dpH

Fig. 7