

PURIFICACION POR MEDIO DE SISTEMAS ACUOSOS DE DOS FASES

¿ UNA ALTERNATIVA PARA LA PURIFICACION DE PROTEINAS ?

**Tesina para obtener el diploma de Especialización en
Biotecnología.**

Presenta: Biol. Maria Mercedes González Enríquez.

Asesor: M. en C. Lidia T. Casas

CEINGEBI-UNAM.

**BIBLIOTECA
JUAN A. ESCALANTE N.
UNIDAD ACADÉMICA
LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO / CCN
U N A M**



1991
GEMM
UNAM
EBIOT
1991

ENERO 1991



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	4
Capítulo 1	
PURIFICACION DE ENZIMAS POR METODOLOGIAS TRADICIONALES	
Centrifugación	5
Filtración	7
Precipitación	10
Cromatografías	11
Capítulo 2	
GENERALIDADES DE LOS SISTEMAS ACUOSOS DE DOS FASES	
Esquema general para la purificación de una enzima intracelular.	13
Características físico químicas de los sistemas acuosos de dos fases.	14
- Componentes de los sistemas.	15
- Diagramas de fases.	16
- Composición de algunos sistemas acuosos.	17
- Otras características.	20
Cráterios de evaluación de los sistemas acuosos de dos fases.	
- Coeficiente de distribución.	21
- Rendimiento de la extracción en las fases.	22
- Grado de separación.	22
- Factor de purificación.	22
Teorías	
- Bronsted	24
- Brooks	24
- Modelo virial de King	25
- Modelo de Kim	25
- Modelo de Baskir	26
Capítulo 3	
PURIFICACION DE UNA ENZIMA INTRACELULAR POR MEDIO DE SISTEMAS ACUOSOS DE DOS FASES.	
I. Eliminación de restos celulares.	28
II. Purificación de la enzima.	32
- Tipo, concentración y PM del polímero.	33
- Influencia de los iones sobre la partición de una proteína en sistemas acuosos de dos fases.	35

- Partición por afinidad.	38
- Precipitación con FEG.	39
- Eliminación de polímeros.	42
III. Aspectos Técnicos	
- Mezclado	43
- Separación de fases	43
Capítulo 5	
ASPECTOS ECONOMICOS	
- Rendimiento	45
- Factor de purificación	47
- Volumen de trabajo y condiciones de operación del equipo	48
- Materia prima	48
- Labor energía e inversión	50
CONCLUSIONES	53
APENDICE	
ALGUNOS PROCESOS DE PURIFICACION ESTABLECIDOS PARA LA PURIFICACION DE ENZIMAS USANDO SISTEMAS ACUOSOS DE DOS FASES.	
- Formato deshidrogenasa	60
- D-glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.	61
- Pululanasa y 1,4 α -glucano fosforilasa.	64
BIBLIOGRAFIA	

INTRODUCCION

El establecimiento de un proceso de purificación para una enzima microbiana no es una tarea fácil, ya que generalmente se encuentra diluída en el caldo de fermentación y se tiene que separar de una mezcla compleja de sustancias. No obstante estas dificultades, se han desarrollado procedimientos de purificación para diferentes enzimas (intracelulares y extracelulares).

La purificación de una enzima generalmente se efectua en un proceso que consta de cuatro etapas: eliminación de insolubles, aislamiento primario ó enriquecimiento de la enzima, purificación específica, y formulación del producto (Bettler P. A. et. al.1988).

En la primera etapa, el objetivo es eliminar las células u otros componentes insolubles cuando se trata de la purificación de una enzima extracelular, ó bien cosechar las células cuando se trata de una enzima intracelular. Las metodologías frecuentemente usadas en esta etapa son centrifugación, filtración o decantación, todas ellas basadas en un principio de separación sólido-líquido.

Cuando se trata de una enzima intracelular es necesario realizar dos operaciones más, antes de pasar a la siguiente etapa. Estas operaciones son: la ruptura celular y la eliminación de restos celulares.

Para efectuar la ruptura celular existen diferentes métodos, los cuales difieren en su principio de operación, así tenemos métodos físicos (homogenizador de alta presión ó con perlas de vidrio), químicos (solventes) y biológicos (enzimas).

Para eliminar los restos celulares la centrifugación y en ciertos casos la filtración, son las metodologías frecuentemente usadas.

La etapa siguiente es una etapa de purificación preliminar, en ella se aplican procedimientos poco selectivos con el objeto de separar unicamente materiales muy diferentes y lograr un enriquecimiento de la enzima de interés. Una de las metodologías usadas frecuentemente, es la precipitación con sales (sulfato de amonio), con polímeros (polietilenglicol) e incluso con solventes orgánicos (acetona, etanol).

Posteriormente se pasa a una etapa de purificación más selectiva, en donde se busca purificar a la enzima de otros

compuestos semejantes en constitución química y/o funcionalidad. La metodología más comunmente usada en esta etapa es la cromatografía en una o más de sus diferentes modalidades: adsorción, partición, intercambio iónico y afinidad.

En la última etapa las características requeridas para el uso de la enzima son las que definen las metodologías utilizadas, pero los pasos típicos para productos de alta calidad son cristalización seguido por centrifugación ó filtración y secado.

Los procesos desarrollados con estas metodologías son eficientes y adecuados para la purificación de enzimas a nivel laboratorio, pero no siempre son los más adecuados a niveles de producción, especialmente para las enzimas intracelulares.

El hecho de que un proceso de purificación sea más difícil para una enzima intracelular se debe en primer término al problema de eliminar los restos celulares.

Con la ruptura celular las propiedades de la suspensión celular cambian (el tamaño de la partícula es más pequeño, la diferencia de densidad entre las partículas y el medio disminuye y la viscosidad aumenta) por lo que la eliminación de restos celulares por medio de la centrifugación pierde eficiencia (Shwu-Man Lee 1989).

Los problemas encontrados para la eliminación de restos celulares por medio de la filtración se refieren basicamente a la obstrucción de las membranas (Shwu-Maan Lee 1989).

También existen otras metodologías para la purificación de enzimas que presentan problemas al cambiar de escala, tal es el caso de las cromatografías en columna. Los principales problemas de esta técnica son las dificultades técnicas de operación de las columnas, además de los altos costos de inversión inicial y de reemplazo de los geles.

Debido esta problemática es que se han hecho estudios para mejorar estas metodologías, además de explorarse otras alternativas para obtener las enzimas puras.

Una de las metodologías prometedoras para la purificación de enzimas intracelulares es la extracción en sistemas acuosos de dos fases (Kula M. R. et. al. 1982). La formación de dos fases acuosas se debe a que cuando se mezclan dos polímeros o un polímero y una sal a determinadas concentraciones ocurre una

separación de fases cada una rica en uno de los componentes. Estas fases presentan determinadas características que ocasionan la separación de los componentes de una mezcla en base a la afinidad que presentan hacia estas.

Las características que favorecen el uso de esta metodología para la purificación de proteínas intracelulares es que se pueden eliminar restos celulares eficientemente por centrifugación a bajas gravedades, y en ciertos casos se pueden lograr factores de purificación comparables a los que se obtienen por ejemplo por precipitación fraccionada. Desde el punto de vista técnico presenta ventajas como que el equilibrio se alcanza rápidamente y el escalamiento es directo. Además por los cortos tiempos de residencia en el equipo se pueden establecer procesos en continuo y con equipo pequeño, trayendo como consecuencia un ahorro en energía y mano de obra.

Por estas razones en el presente trabajo se analiza esta metodología como una alternativa para la purificación de enzimas en forma especial para las intracelulares.

OBJETIVO GENERAL:

El presente trabajo tiene como objetivo presentar un panorama general del uso de sistemas acuosos de dos fases para la purificación de enzimas intracelulares y evaluar a nivel de producción su aplicación.

OBJETIVOS PARCIALES:

Para cumplir con nuestro objetivo se plantearán los siguientes objetivos parciales:

1.- Exponer la problemática que existe en torno al escalamiento de un proceso de purificación de una enzima intracelular enfocandonos a aquellas metodologías, donde el uso de sistemas acuosos de dos fases puede ser la alternativa.

2.- Exponer los fundamentos de dicha metodología así como los lineamientos generales para su aplicación en la purificación de una enzima. Esto es con el objeto de evaluar la factibilidad de implementar esta metodología en los procesos de purificación de una enzima.

3.- Por último se analizan aspectos económicos del uso de los sistemas acuosos de dos fases para la separación de proteínas, con el objeto de presentar criterios adicionales para evaluar y comparar el uso de sistemas acuoso de dos fases con otras metodologías.

CAPITULO UNO

En las primeras etapas de purificación de una proteína las metodologías más usadas para la separación de células y de restos celulares son la centrifugación y la filtración, ambas basadas en un principio de separación sólido-líquido.

Después de la eliminación de restos celulares generalmente se realiza una precipitación para enriquecer y concentrar el producto y por último se usan técnicas más específicas de purificación (ejemplo cromatografías).

La elección de las metodologías más adecuadas va a estar en función de las características del producto que se desea purificar, así como de las ventajas y desventajas de la metodología a nivel técnico y económico.

CENTRIFUGACION

La centrifugación es una operación unitaria en donde el tamaño de la partícula a separar, la diferencia de densidades entre los sólidos y el líquido, así como la viscosidad del material procesado son fundamentales para lograr una separación eficiente. En una centrífuga de flujo continuo la forma en que se relacionan estos parámetros es mediante la siguiente ecuación:

$$Q = \frac{D^{2\text{lim}} \Delta \rho g}{18 \eta} \cdot \frac{W^2 r}{g} \cdot F$$

Donde : Q = Flujo en la centrífuga

D lim = Limite inferior del diámetro de la partícula.

$\Delta \rho$ = Diferencia de densidad.

η = Viscosidad.

g = Fuerza de la gravedad.

W = Velocidad angular.

r = Radio de rotación.

F = Superficie efectiva de clarificación.

Los parámetros del primer término estan relacionados al material procesado mientras que los otros se relacionan al equipo empleado.

Durante la cosecha de células el tamaño de partícula es de 10 y 1 μm para levaduras y bacterias respectivamente, por lo que la eficiencia en el proceso es menor con estas últimas. Cuando se eliminan restos celulares la problemática es mayor porque el tamaño de la partícula decrece más ($.1\mu\text{m}$), la diferencia de densidades es mínima y la viscosidad de la solución se incrementa por la liberación de ácidos nucleicos y polímeros.

Una forma de solucionar esta problemática es floculando o aumentando la fuerza de gravedad. La primera alternativa no es muy adecuada porque la presencia de floculantes puede complicar más el proceso de purificación, la segunda es factible en centrifugas de laboratorio, en donde el equipo alcanza gravedades de hasta 6×10^5 , sin embargo no siempre es factible cuando se usa equipo nivel piloto porque las centrifugas no alcanzan altas gravedades y el tiempo de residencia es pequeño.

El equipo que existe para la separación de material por medio de la centrifugación a nivel piloto se puede clasificar en centrifugas por sedimentación y centrifugas por filtración. La diferencia entre ellas es que las primeras tienen una pared sólida, mientras que las de filtración están constituidas por una pared perforada, en donde la fase sólida se retiene en una membrana permeable a través de la cual pasa el fluido.

Dentro de las centrifugas de sedimentación encontramos a las de rotor tubular y las de discos. En las centrifugas de rotor tubular el rotor gira alrededor de un eje vertical y el material a separar es alimentado por la parte inferior del rotor. Durante la centrifugación las partículas pesadas son recolectadas en la pared del rotor, mientras que la fase ligera sale por la parte superior del mismo. Las gravedades alcanzadas son de 13000 a 17000 g. La principal desventaja de este tipo de centrifugas es que es un proceso en lote, en el que es necesario desarmar la centrifuga para quitar los sólidos del rotor, lo cual es impráctico cuando se manejan grandes volúmenes.

Las centrifugas de discos se caracterizan porque el interior del rotor está dividido en varios discos con lo cual se reduce la distancia de sedimentación de una partícula y se incrementa el área de sedimentación, dando como consecuencia una alta capacidad de sólidos. Otras de las ventajas de este tipo de centrifuga es

que se puede establecer un proceso continuo. Sin embargo el contenido de humedad de los sólidos es mayor que cuando se recuperan los mismos por una centrifuga de rotor tubular. Las principales ventajas y desventajas entre dos clases de centrifuga son mostradas en la tabla 1.1.

CENTRIFUGA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Rotor tubular	<ul style="list-style-type: none"> -Fuerza de centrifugación alta. -Fácil de limpiar. -Buen desagüe -Fácil de quitar el rotor. 	<ul style="list-style-type: none"> -Capacidad de sólidos limitada. -Formación de espuma. -Para recuperar los sólidos es necesario quitar el rotor.
Discos	<ul style="list-style-type: none"> -La descarga de sólidos es posible. -La descarga de líquido bajo presión elimina la espuma. 	<ul style="list-style-type: none"> -Desagüe deficiente. -Difícil de limpiar.

Tabla 1.1. Comparación de la centrifuga de rotor tubular y la de discos (Shwv-Maan Lee 1989)

FILTRACION

La filtración es un proceso que separa los componentes de acuerdo al tamaño de la partícula, por lo que la disminución de la diferencia densidades no es de vital importancia y se puede lograr una separación más eficiente por filtración que por centrifugación, pero solo en pequeña escala. Su principal desventaja es la obstrucción de poros de la membrana, por lo que es necesario un continuo reemplazamiento de las mismas o la introducción de filtros ayuda.

Existen dos tipos de sistemas de filtración que difieren basicamente en la manera de operación: la filtración de flujo perpendicular a la membrana y la de flujo transversal. Para la filtración de flujo perpendicular existen sistemas que operan a gran escala siendo los más comunes la filtración en tambor continuo y la filtración en placa (en lote).

La filtración en placa, es adecuada para la separación de células porque el paquete presenta relativamente poca humedad y es fácil de lavar. Los principales inconvenientes de este tipo de filtración, es que debido a la naturaleza coloidal y a la alta viscosidad del extracto celular, su capacidad es pequeña. Por otra parte el tiempo de preparación es grande y la introducción de filtros ayuda puede ser costoso.

Los filtros en tambor son menos adecuados para la separación de dentritus, porque el producto obtenido presenta una menor cantidad de sólidos que el obtenido de centrifugas capaces de procesar la misma cantidad de restos celulares.

La filtración de flujo transversal es una técnica relativamente nueva que presenta un gran potencial para los procesos bioquímicos. El hecho de que la solución a separar presente un flujo paralelo a la membrana, disminuye la formación de la capa de sólidos sobre la membrana por lo que se mejora la eficiencia de filtración. Por otra parte la membrana da una barrera uniforme por lo que la separación de células o dentritus es más uniforme y el filtrado es adecuado para ser usado en columnas. Actualmente existen varios módulos comerciales para este tipo de filtración.

Los principales problemas encontrados están en relación al ensuciamiento de la membrana y a la polarización de la misma, ocasionando la disminución del flujo.

La elección de la metodología más adecuada para la separación de células o dentritus celulares va a depender tanto de factores técnicos, así como económicos. En la tabla 1.2 se muestran algunas de las ventajas y desventajas de la centrifugación y filtración. Como se puede observar la centrifugación es un método de separación adecuado cuando se necesitan procesar grandes cantidades de material porque se puede establecer un proceso continuo, los tiempos de retención son pequeños y el proceso es relativamente económico. Sin embargo es importante tener presente que la recuperación de sólidos es menor al 90 %, además de que se pueden presentar problemas de desnaturalización por las condiciones de operación.

CENTRIFUGACION	FILTRACION (Flujo transversal)
<p style="text-align: center;">VENTAJAS</p> <ul style="list-style-type: none"> - Capacidad para una operación continua. - Buena contención biológica. - Tiempos de retención cortos. - Fácil control de la separación. - Relativa economía en gran escala. 	<ul style="list-style-type: none"> - Recuperamiento potencial de sólidos (100%). - Lavado fácil del producto. - Buena contención biológica - Fácil control de temperatura - La capacidad puede ser incrementada adicionando módulos.
<p style="text-align: center;">DESVENTAJAS</p> <ul style="list-style-type: none"> - Capital y costos de mantenimiento altos - Posible desnaturalización del producto. - Significante incremento de la temperatura a flujos bajos. - A menudo se recupera menos del 90% de sólidos. - Problemas de limpieza y esterilización. - No adecuado para la separación donde los sólidos forman sedimentos compactos. 	<ul style="list-style-type: none"> - El flujo es dependiente del tiempo. - Los costos del reemplazamiento de membranas y de bombeo son altos. - Control limitado sobre la separación. - No económico a gran escala. - A menudo la transmisión del soluto es baja. - Posible pérdida de la actividad

Tabla 1.2.- Principales ventajas y desventajas de la centrifugación y la filtración de flujo transversal (Mackay D y Salusbury T. 1988).

La filtración de flujo transversal es recomendada cuando el volumen de trabajo es pequeño porque se recupera el 100% de sólidos y el control de temperatura y de lavado del producto es sencillo. Algunas de las desventajas que presenta a nivel técnico son: tiempo de residencia grande, flujo dependiente del tiempo y un limitado control sobre la separación.

PRECIPITACION

La precipitación es una metodología frecuentemente usada en las primeras etapas de purificación de una proteína. El principal objetivo de dicha metodología es concentrar el producto de interés aunque en muchas ocasiones se logra una parcial purificación.

En la mayoría de las veces, la precipitación es realizada con sulfato de amonio pero también puede ser en solventes como etanol, acetona o con polímeros como el polietilenglicol.

La manera en que cada uno de estos agentes actúa para lograr el fenómeno deseado es alterando las características del producto o bien cambiando las condiciones físico-químicas del solvente (agua). Así por ejemplo los solventes orgánicos reduce la constante dieléctrica del medio acuoso, por lo que las interacciones electrostática de las proteínas es realizada y ocurre la precipitación probablemente ocurra como resultados de una reducción del agua disponible para la solvatación.

La elección del agente precipitante depende de diferentes factores como estabilidad del producto, condiciones de operación que sean factibles a escalar, economía del proceso, entre otras.

Existen varios procesos a gran escala y que utilizan la precipitación para obtener el producto deseado. Así por ejemplo en la industria se utiliza la precipitación isoeléctrico a pHs ácidos para la obtención de la caseína de la leche (Beeby R., et.al. 1970) y para aislados de proteína de soya. (Smith A.K et.al. 1972). La precipitación con solventes orgánicos es usada para la producción de enzimas industriales (Boing J.T.P 1982).

La experiencia que se ha tenido en el escalamiento de la precipitación no ha sido buena porque el rendimiento y la actividad específica decaen. Esto es consecuencia de que el proceso se lleve a cabo en tiempos más largos, por lo que la alternativa podría ser, efectuar procesos en continuo.

Aunque la precipitación es una operación usada a nivel de producción es importante realizar estudios en relación a diferentes aspectos de ingeniería bioquímica como las condiciones de mezclado, el diseño de los tanques de mezclado y del equipo de centrifugación. La razón es que durante la operación, las proteínas precipitadas son sujetas tanto a fuerzas de crecimiento

como de ruptura de acuerdo a las fuerzas hidrodinámicas a las que esten sujetas. Estos cambios pueden ocurrir durante el mezclado, en el tanque de sedimentación, en tuberías o en el equipo usado para recuperar el producto.

CROMATOGRAFIA

Las cromatografías son metodologías frecuentemente usadas en la purificación de una proteína cuando se desean separar el producto de interés de otros compuestos similares por lo que representan una purificación específica. Generalmente han sido usadas para productos (proteína terapéutica y de diagnóstico) en donde las cantidades requeridas son mínimas, pero su calidad es de vital importancia.

Existen diferentes tipos de cromatografías que difieren en su principio de operación, así tenemos filtración en gel (separación en función del tamaño de partícula), cromatografía de intercambio iónico, interacción hidrofóbica y afinidad. Las cromatografías son una buena herramienta para la purificación de proteínas en el laboratorio en donde en promedio se logra factores de purificación de 10 para cromatografías de intercambio iónico y de 100 para cromatografía de afinidad.

Todas las cromatografías pueden ser operadas a gran escala, sin embargo los objetivos planteados así como las condiciones de operación a nivel laboratorio son diferentes de las requeridas a nivel de producción.

Generalmente a nivel laboratorio se prefiere un producto con la mayor pureza posible aún a costa de un bajo rendimiento. Para lograr una buena separación y por consiguiente una mejor purificación es recomendable usar soportes pequeños y un flujo lento en la columna.

A nivel de producción en cambio la productividad es fundamental para el proceso por lo que se prefiere flujos altos en lugar de una buena resolución. La solución es llegar a un compromiso entre rendimiento, purificación y productividad.

Para escalar se recomienda que el proceso a nivel laboratorio sea entendido y optimizado usando equipo convencional (para baja presión) o equipo adecuado para el funcionamiento a

alta presión. El siguiente paso es incrementar la cantidad de muestra por un factor de 10-20 . La altura de la columna podría ser mantenida constante y únicamente incrementar el área en proporción a la muestra. El flujo lineal, la fuerza iónica y el pH deben permanecer constantes. Si un gradiente de elución es usado, la tasa del volúmen de gradiente /volúmen de columna debe ser la misma. Es importante asegurarse que la carga de proteína por volumen de columna sea la misma, porque a nivel de producción los extractos contienen una concentración de proteína más alta.

Teóricamente el escalamiento de un proceso de cromatografía, puede ser realizado incrementando el diámetro de una columna. Sin embargo en la práctica se puede observar diferencias entre los resultados obtenidos a nivel laboratorio y a nivel de producción. Una de las posibles causas puede ser debido al "efecto de pared". Este efecto se debe a que cerca de la pared, la estructura del empacamiento y el flujo son diferentes al del resto de la columna, esta diferencia es insignificativa en columnas de producción, pero en columnas pequeñas el efecto es importante porque tienen efecto sobre el modelo de flujo y porque ejerce un considerable grado de soporte para el material de empacamiento lo cual es importante cuando el soporte usado no es rígido.

CAPITULO DOS

GENERALIDADES DE LOS SISTEMAS ACUOSOS DE DOS FASES

Como se mencionó anteriormente una metodología atractiva para la purificación de enzimas intracelulares a nivel industrial es la extracción y la purificación en sistemas acuosos de 2 fases.

ESQUEMA GENERAL PARA LA PURIFICACION DE UNA ENZIMA INTRACELULAR

El esquema general para un proceso de purificación mediante sistemas de dos fases, consiste básicamente en introducir el extracto celular a un primer sistema (fig 2.1.), en donde la enzima de interés tenga afinidad hacia la fase superior y los restos celulares junto con otros contaminantes queden en la fase inferior. De esta manera la eficiencia en la purificación no se ve disminuida por problemas técnicos, como sería el caso cuando los restos celulares quedan en la fase superior (Hustedt H. et. al. 1985).

Después de este primer paso, la enzima purificada de los restos celulares, es introducida a un segundo sistema acuoso de dos fases para purificarla del resto de la proteína, de aquí que en el sistema usado, la enzima deba presentar un comportamiento diferente al del resto de la proteína para que se distribuyan en fases diferentes. Así mismo de esta forma se puede realizar un tercer y cuarto paso de purificación, ya sea que se cambie la enzima de una fase a otra o que se mantenga en una misma fase hasta lograr la purificación deseada.

La figura 2.1. describe el proceso general de la purificación de enzimas intracelulares usando únicamente sistemas acuosos de dos fases. Dependiendo de las circunstancias, a este esquema general se le pueden hacer diversas modificaciones como es la floculación y eliminación de restos celulares con polietilenglicol (PEG), la precipitación de proteínas con el mismo polímero, el uso de ligandos unidos a uno de los polímeros (partición por afinidad) ó la integración de técnicas convencionales como ultrafiltración, cromatografía de adsorción, etc., en alguna etapa del proceso.

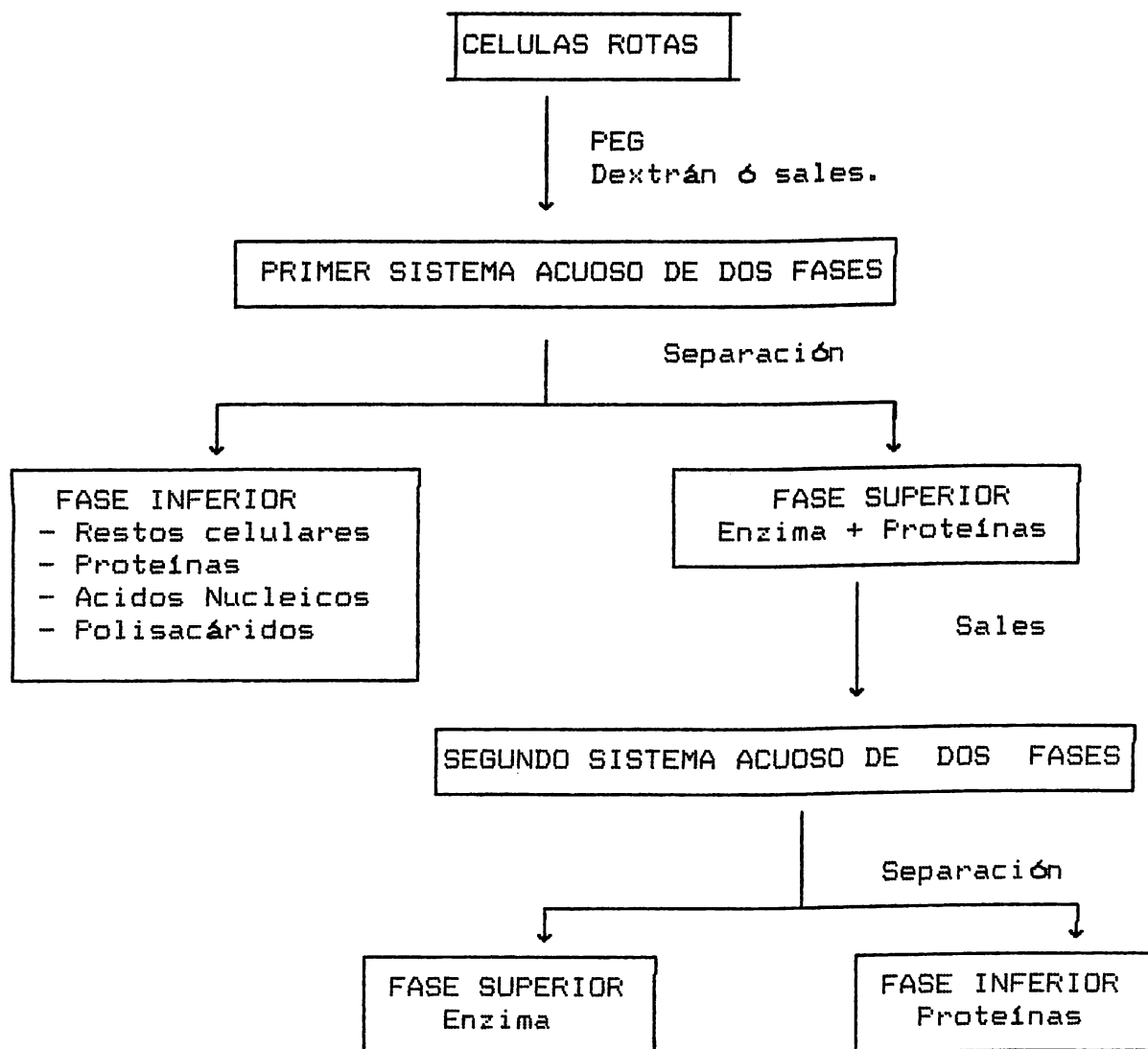


Fig 2.1. Esquema general para la purificación de una enzima intracelular por medio de sistemas acuosos de dos fases.

CARACTERISTICAS FISICO QUIMICAS DE LOS SISTEMAS ACUOSOS DE DOS FASES

La distribución de un producto en un sistema acuoso de dos fases es un fenómeno muy complejo que depende de varios parámetros como PM, tipo y concentración del polímero, tipo y concentración de sales, pH y otros, por lo que en la mayoría de las ocasiones para establecer un proceso de purificación los sistemas deben de ser seleccionados por prueba y error.

Sin embargo, es importante entender las principales características físico-químicas de los sistemas acuosos con el fin de poder diseñar estrategias experimentales y así encontrar más fácilmente el sistema adecuado para la purificación. Por otra

parte, conociendo las características de los sistemas acuosos de dos fases junto con las características del producto que se desea purificar (peso molecular, punto isoeléctrico etc.) será más fácil comprender los fenómenos que gobiernan la separación de un producto de sus contaminantes. A continuación se describen las principales características físico químicas de los sistemas acuosos de dos fases, para después abordar (cap 3) el comportamiento de los mismos pero con el producto que se desea purificar.

COMPONENTES DE LOS SISTEMAS. Los sistemas acuosos de dos fases se forman cuando se mezclan dos polímeros ó un polímero y una sal a determinadas concentraciones. Prácticamente con cualquier combinación de dos polímeros hidrofílicos, ya sean sintéticos o naturales se obtienen los sistemas de dos fases (ver tabla 2.1), sin embargo los más estudiados para la purificación de proteínas son los compuestos por polietilenglicol (PEG) con fosfato de sodio o de potasio y los compuestos por PEG con dextrán.

PRIMER COMPONENTE	SEGUNDO COMPONENTE
POLIPROPILENGLICOL	POLIETILENGLICOL POLIVINIL ALCOHOL HIDROXIPROPILDEXTRAN DEXTRAN
POLIETILENGLICOL	POLIVINIL ALCOHOL DEXTRAN FICOL
POLIVINIL ALCOHOL	METILCELULOSA DEXTRAN HIDROXIPROPILDEXTRAN
METILCELULOSA	HIDROXIPROPILDEXTRAN DEXTRAN
POLIPROPILENGLICOL	FOSFATO DE POTASIO
METOXIPOLIETILENGLICOL	FOSFATO DE POTASIO
POLIETILENGLICOL	FOSFATO DE POTASIO SULFATO DE MAGNESIO SULFATO DE AMONIO SULFATO DE SODIO

Tabla 2.1. Algunos sistemas acuosos de dos fases formados por dos polímeros o por un polímero y una sal.

El fenómeno que gobierna la separación de fases de los polímeros, se le denomina incompatibilidad de polímeros, y es explicado mediante una exclusión estérica, es decir por la incapacidad de los extremos de los polímeros de penetrar entre sí o bien mediante un estado energético más estable (Kula M. R. 1979).

DIAGRAMA DE FASES. Un diagrama de fases es una representación gráfica que muestra la composición de los sistemas ternarios, por lo que es una herramienta muy útil para la preparación de los sistemas, sobre todo cuando se usan reactivos en solución.

Para los sistemas acuosos de dos fases los diagramas más usados son los rectangulares. Estos se construyen graficando la concentración de los componentes de los sistemas (polímeros o polímero y sal) en cada uno de los ejes. La curva que se obtiene en el diagrama de fases (Fig 2.2) es conocida como curva binodial y representa la composición de todas las fases (superior e inferior) de los sistemas acuosos. La curva binodial también indica que concentraciones de los componentes deben de usarse para lograr la separación de fases. La separación solo se logra con concentraciones arriba de la curva, las concentraciones abajo dan sistemas homogéneos.

En un diagrama de fases también encontramos las líneas de unión. La característica de estas líneas es que todos los sistemas que caen en ellas tienen la misma composición en la fase superior y en la fase inferior, la diferencia entre estos sistemas es que el volumen de las fases cambia. Esta característica se cumple siempre y cuando el PM de los polímeros no este muy disperso.

La composición de cada una de las fases de los sistemas que caen en una misma línea de unión esta dada por la intersección de ésta con la curva binodial, así por ejemplo la composición de la fase superior del sistema M esta dada por el punto T mientras que la de la fase inferior esta dada por el punto B. El punto C en el diagrama de fases es un punto hipotético en donde se obtienen dos fases del mismo volumen y de la misma composición.

Del mismo diagrama se puede inferir que la diferencia de composición entre la fase superior e inferior para un sistema determinado, es más drástica en los sistemas situados en líneas de

unión lejanas al punto crítico, que en aquellos sistemas situados en líneas de unión cercanas al punto crítico.

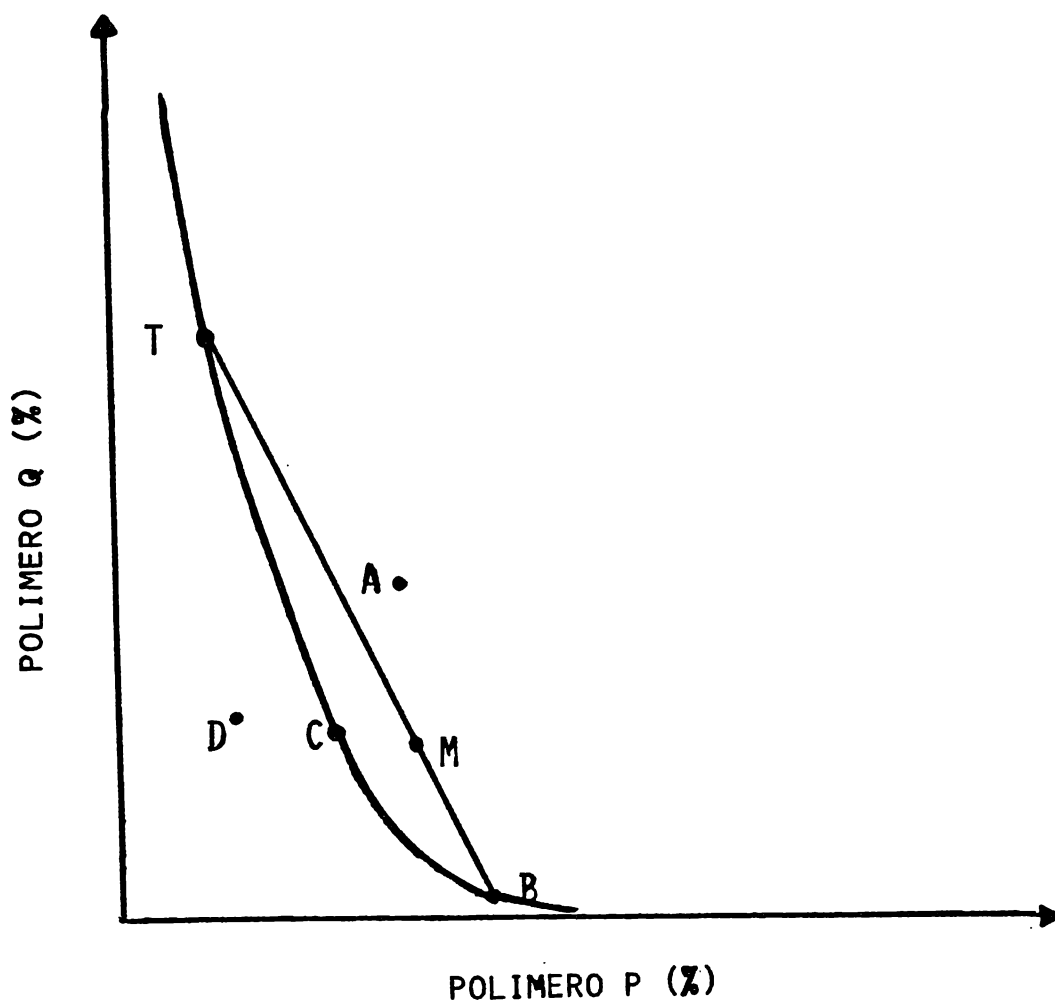


Fig. 2.2. Curva binodial de un sistema acuoso de dos fases
C = Punto crítico
T = Composición de la fase superior.
B = Composición de la fase inferior.
M = Composición del sistema total.
D = Sistema homogéneo.

COMPOSICION DE ALGUNOS SISTEMAS ACUOSOS. Dentro de los estudios que existen en cuanto a la construcción de diagramas de diferentes sistemas, así como de la composición de cada una de las fases están los realizados por Albertsson P.A. 1958 y 1971.

En su primer trabajo Albertsson P. A., reporta los diagramas de fases (en coordenadas triangulares) para diferentes sistemas: PEG/dextrán, PEG/fosfato (Fig 2.3 y 2.4.) y otros. En ellos varía el PM del PEG. También reporta las líneas de unión para dos de los sistemas (Fig 2.3 y 2.5).

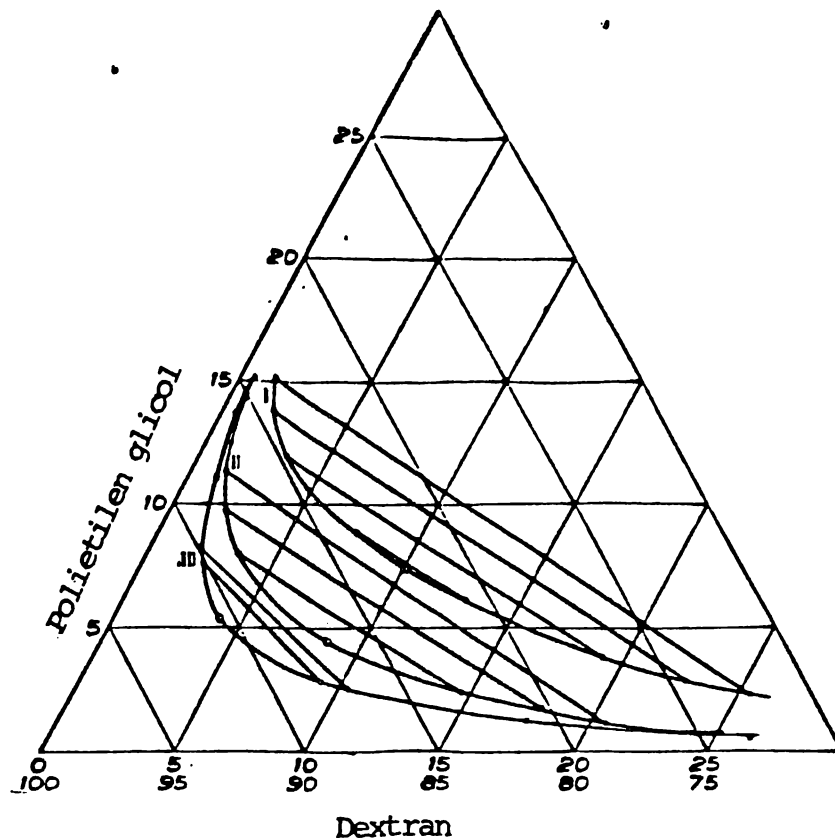


Fig. 2.3. Diagrama de fases con líneas de unión para los sistemas dextran (20000) y PEG de diferente PM. 3000-3700 (I), 6000-7500 (II), 15000-20000 (III). o Punto crítico. Temp. 20°C.

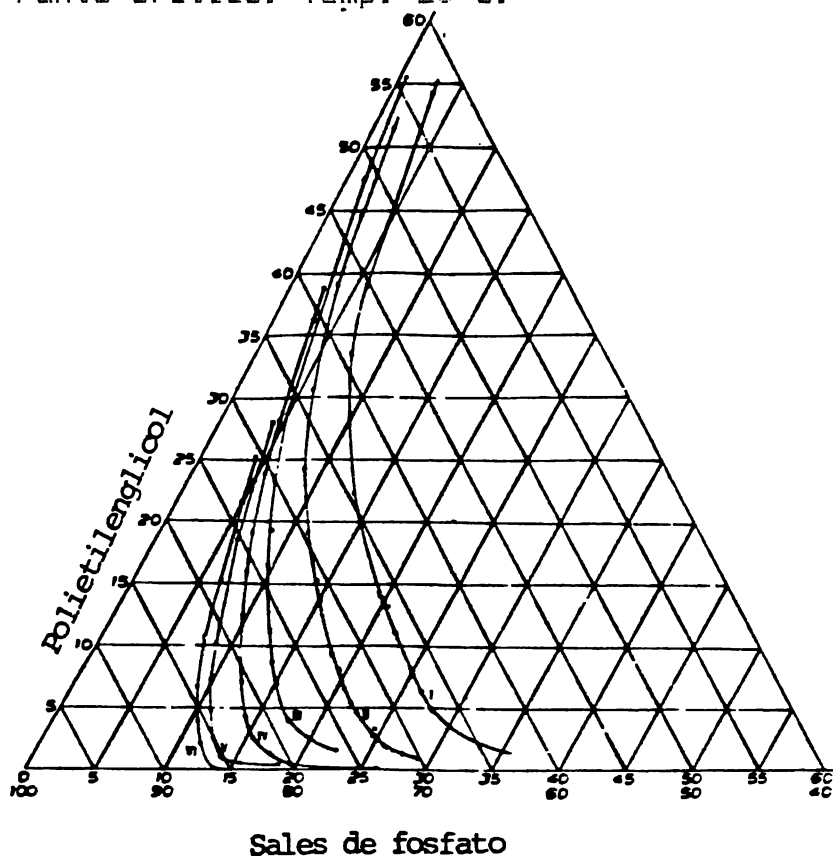


Fig. 2.4. Diagramas de fases para los sistemas de fosfato de potasio (pH 7.1) y PEG de diferente PM. 285-315 (I), 570-630 (II), 1300-1600 (III), 3000-3700 (IV), 6000-7500 (V), 15000-20000 (VI). o Punto crítico. Temp. 20°C.

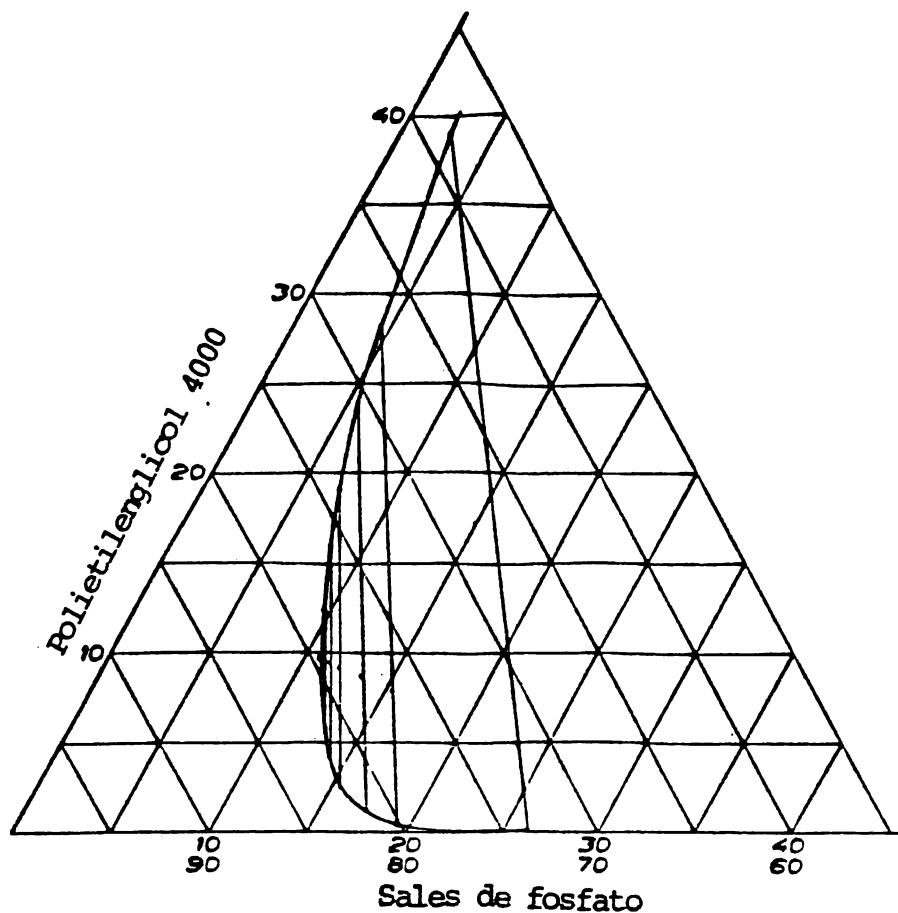


Fig.2.5. Diagramas de fases con líneas de unión para los sistemas de fosfato de potasio (pH 7.1) PEG 4000 (3000-3700). o punto crítico. Temp. 20°C.

En su segundo trabajo reporta los diagramas de fases para sistemas de PEG/dextrán y PEG/fosfato y otros, a diferentes temperaturas así como la composición de cada una de las fases y la composición global de algunos sistemas. Los sistemas que analiza son mostrados en la tabla 2.2. Las principales conclusiones en estos estudios son:

a).- Al incrementar el PM del polímero usado (en este caso PEG), se necesita una menor cantidad de los constituyentes para lograr la separación de fases.

b).- Un cambio en la temperatura, cambia ligeramente la curva binodial y por lo tanto la composición de las fases para un sistema determinado, siendo este cambio más drástico cerca del punto crítico.

c).- Las líneas de unión de la curva binodial son más inclinadas en sistemas compuestos por PEG/sales que en sistemas de

PEG/dextrán.

d). En la fase superior la concentración de PEG va incrementando y la de dextrán disminuyendo a medida que las líneas de unión se alejan del punto crítico. Este cambio es mínimo cuando las líneas se vuelven asintóticas.

e). En la fase inferior, la concentración de dextrán va incrementando y la de PEG disminuyendo en los diferentes sistemas, a medida que las líneas de unión se alejan del punto crítico hasta cuando la línea se vuelve asintótica.

f). Un comportamiento similar sucede (d y e) en sistemas compuestos por PEG y fosfatos.

Dextrán-Polietilenglicol-Agua.

Dextrán-Metilcelulosa-Agua.

Dextrán-Polivinil alcohol-Agua

Dextrán Hidroxipropildextrán-Agua.

Sulfato de sodio y dextrán-Polietilenglicol-Cloruro de sodio-Agua.

Sulfato de sodio y dextrán-Metilcelulosa-Cloruro de sodio-Agua.

Sulfato de sodio y dextrán-Polivinil alcohol-Cloruro de sodio-Agua.

Carboximetildextrán de Na.-Polietilenglicol-Cloruro de sodio-Agua.

Fosfato de potasio-Polietilenglicol-Agua.

Fosfato de potasio-Metoxipolietilenglicol-Agua.

Fosfato de potasio-Polipropilenglicol-Agua.

Sulfato de amonio-Polietilenglicol-Agua.

Sulfato de magnesio-Polietilenglicol-Agua.

Tabla 2.2. Sistemas acuosos que analiza Albertsson P.A.

OTRAS CARACTERISTICAS. Otras características importantes a considerar en los sistemas acuosos de dos fases son: la viscosidad, la diferencia de densidades entre las fases y el volumen de las mismas, ya que estos factores influyen en el tiempo de separación de las fases (Albertsson P. A. 1971).

Albertsson P. A. (1971) reporta que en los sistemas que estan cerca del punto crítico, la diferencia de densidades es pequeña por lo tanto la separación de las fases se lleva a cabo en un tiempo largo, mientras que en los sistemas situados lejos del punto crítico la viscosidad es alta por lo tanto el tiempo de separación de las fases también es grande. El recomienda sistemas de composición intermedia para obtener tiempos de separación cortos.

Para sistemas donde hay una diferencia de densidad entre las fases se recomienda que la fase más viscosa sea más pequeña o igual a la otra fase para que el tiempo de separación sea corto.

CRITERIOS DE EVALUACION PARA LOS SISTEMAS ACUOSOS DE DOS FASES

Los criterios para evaluar la eficiencia de los sistemas acuosos son: el coeficiente de distribución el rendimiento de la fase superior o inferior, el grado de separación y/o el factor de purificación.

COEFICIENTE DE DISTRIBUCION. La purificación de una enzima por medio de dos fases, por ser una extracción líquido-líquido esta gobernada por la ley de la distribución, o ley del equilibrio heterogeneo.

Dicha ley establece que a una temperatura determinada, la relación de las concentraciones en equilibrio (más exactamente de las actividades) de una sustancia distribuida entre dos disolventes no miscibles en contacto es constante.

Esta constante es conocida como constante de distribución, coeficiente de distribución o coeficiente de partición. La expresión matemática que la define es:

$$K = C_2 / C_1$$

donde C_1 y C_2 son las concentraciones del soluto en equilibrio para los disolventes 1 y 2.

Para el caso específico de los sistemas de dos fases el coeficiente de partición de la enzima se determina dividiendo la concentración de enzima (U/ml) de la fase superior entre la concentración de la fase inferior. Para el caso de la proteína se calcula de la misma forma, usando las unidades correspondientes (mg/ml).

Es mediante esta constante de distribución que se evalúan los diferentes sistemas para el proceso, eligiendo aquellos que tengan un K alto para el caso de que se desee recuperar la enzima de interés en la fase superior o eligiendo a aquellos que tengan un K bajo para cuando se desea obtener el producto en la fase inferior. Los coeficientes de partición varían entre .01 y 100 para las enzimas de un PM entre 20 000 y 40 000 (Kula M. R. 1985).

La determinación del coeficiente de distribución para cada

sistema es importante debido a que una vez habiendo encontrado un sistema apropiado para el proceso, la recuperación del producto de interés se puede optimizar en función de la relación de volumen (V_s/V_i) y porque en base a este criterio es que se escala el proceso.

RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN EN LAS FASES. Para el éxito de un proceso a nivel industrial el rendimiento de extracción y el costo proporcional son los factores determinantes para su éxito (Kula M. R. 1979). El rendimiento de la extracción en la fase superior e inferior se calcula mediante:

$$Y \% s = \frac{100}{1 + \left[\frac{V_i}{V_s} \frac{1}{K} \right]} \quad Y \% i = \frac{100}{1 + \left[\frac{V_s}{V_i} K \right]}$$

Donde Y% es el rendimiento

V_s y V_i son los volúmenes de la fase superior e inferior

K es el coeficiente de distribución.

Como se puede observar el rendimiento depende del K y de la tasa de volúmenes.

El rendimiento en procesos de purificación con sistemas acuosos de dos fases son bastantes buenos, generalmente son mayores al 80 % (tabla 2.3).

GRADO DE SEPARACION. Otro criterio que es usado para evaluar los sistemas de extracción es el grado de separación ó tasa de partición. Dicho criterio es determinado por el coeficiente de distribución y la tasa de volumen de las fases de acuerdo a la ecuación:

$$G = K (V_s / V_i)$$

Un alto grado de separación indica un buen paso de extracción.

FACTOR DE PURIFICACION. Un último criterio para seleccionar el sistema acuoso más adecuado es el factor de purificación muy importante no solo para los sistemas acuosos sino también para cualquier metodología de purificación. Este parámetro nos indica que tanto se ha purificado la enzima en relación al total de la proteína, se calcula dividiendo la actividad específica obtenida después de un paso de purificación entre la actividad específica inicial.

Enzima	Microorganismo	Sistema	Rend.	F.P.
α -Glucosidasa	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	PEG/Sal	95	3.2
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa		PEG/Sal	91	1.8
Hexoquinasa		PEG/Sal	92	1.6
Formato deshidrogenasa	<i>Candida boidinii</i>	PEG/Sal	94	1.5
Isopropanol deshidrogenasa		PEG/Sal	98	2.6
Glucosa isomerasa	<i>Streptomyces species</i>	PEG/Sal	86	2.5
Fululanasa	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PEG/Dextrán	91	2
Fosforilasa		PEG/Dextrán	85	1
Fumarasa	<i>Escherichia coli</i>	PEG/Sal	93	3.4
Aspartasa		PEG/Sal	96	6.6
Penicilina acylasa		PEG/Sal	90	8.2
Leucina deshidrogenasa	<i>Bacillus sphaericus</i>	PEG/Dextrán	98	2.4
Leucina deshidrogenasa	<i>Bacillus cereus</i>	PEG/Sal	98	1.3
Glucosa Deshidrogenasa	<i>Bacillus</i>	PEG/Sal	95	2.3
β -glucosidasa	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	PEG/Sal	98	2.4
Lactato deshidrogenasa	<i>Lactobacillus species</i>	PEG/Sal	95	1.5
Fumarasa	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	PEG/Sal	83	7.5

Tabla 2.3. Extracción de enzimas intracelulares.
(Kula M.R. 1983)

Para la elección final del posible sistema adecuado generalmente se tiene que llegar a un compromiso entre el mayor rendimiento posible y el mejor factor de purificación. La elección va a depender de las características finales del producto para su aplicación así como de factores económicos.

TEORIAS.

En relación a la manera de seleccionar un sistema acuoso de dos fases adecuado para obtener un K favorable para la purificación del biomaterial, se han postulado diferentes teorías que tratan de explicar el fenómeno en función de varios parámetros como: PM y concentración del polímero, tipo y concentración de la sal y características de la proteína, entre otras. Estas teorías no son del todo satisfactorias porque en ninguno de ellas se considera todas las posibles interacciones en el sistema, además de que analizan el fenómeno en función de una sola proteína y no de una mezcla de las mismas.

De los modelos que existen para explicar la partición de una proteína en un sistema acuoso de dos fases solamente uno de ellos (el de Bronsted) involucra el tamaño de partícula como principal parámetro que influye en la partición. Los otros modelos (Brooks, King, Kim y Baskir) explican el fenómeno de partición en función de mantener el potencial químico de cada uno de los componentes iguales en ambas fases.

BRONSTED. Uno de los primeros modelos propuestos para explicar la distribución de un biomaterial en un sistema acuoso de dos fases es el propuesto por Bronsted. Dicho modelo establece la distribución de un biomaterial en función del PM de la partícula, en base a la siguiente ecuación:

$$K = \exp (M \lambda / k T)$$

en donde K = coeficiente de distribución.

M = PM del biomaterial.

k = Constante de Boltzman.

T = temperatura absoluta.

λ = Una constante que comprende las características del sistema.

Como se puede observar el modelo es muy sensible al tamaño de partícula, sin embargo el hecho de que las demás variables (características de las fases y del producto) se agrupen en un solo término (λ), lo hace un modelo cualitativo.

BROOKS. El modelo de Brooks, una extensión de la teoría de Flory, establece que K del biomaterial está en función del potencial químico de cada uno de los componentes (agua, polímeros

y biomaterial)), y que este debe ser igual en ambas fases.

Las principales demostraciones cualitativas que se obtienen con este modelo son:

a). El coeficiente de partición (K) para el biomaterial es más desigual a medida que aumenta el tamaño del biomaterial.

b). El mismo fenómeno es observado cuando hay grandes diferencias en la concentración del polímero entre las fases.

c). En el caso de que los demás factores sean iguales, el K del biomaterial esta en favor de la fase que contiene el polímero de más bajo PM.

MODELO VIRIAL DE KING. En este modelo también se asume que un sistema ternario está en equilibrio cuando el potencial químico de los componentes es el mismo en las dos fases. La expresión general de este modelo relaciona el potencial químico de cada componente a las molalidades de otros componentes y también los puede relacionar a medidas cuantitativas como la presión osmótica. Cuando se introduce un biomaterial, el potencial químico de cada uno de los componentes es modificado por las interacciones entre el componente y la proteína.

El modelo de King puede ser modificado para estudiar los efectos de la concentración de sales adicionadas al sistema sobre K del biomaterial, para lo cual se incorpora un término que analiza el efecto de la distribución de potencial.

Las ventajas de este modelo es que da una relación cualitativa entre K y la concentración de polímero. Predice que el coeficiente de partición de la proteína (biomaterial) es más desigual a medida que las diferencias en la concentración de polímero entre las fases incrementa. Con el modelo virial se pueden calcular los diagramas de fases y K para proteínas. Baskir J.N. et. al. 1989 muestra datos experimentales y datos predichos por el modelo, donde se observa una buena correlación.

Las principales desventajas que presenta el modelo, entre otras, es que no analiza la entropía del mezclado, por lo tanto K no puede ser explicado en función del PM del polímero, además el modelo es apropiado para soluciones diluidas pero no para los sistemas en donde el polímero esta a una concentración de 5-20%.

MODELO DE KIM. Este es un modelo interesante que analiza la partición del biomaterial en un sistema polímero-sal. En el modelo

se considera que la concentración de polímero en la fase rica en sal es despreciable. En dicha fase lo que determina la distribución de la proteína es la concentración de sal, relacionado a un efecto de salting-out. En cambio en la fase superior tanto la concentración de polímero como de sal influyen en la partición de la proteína. En esta fase el polímero está hidratado, por lo que el agua disponible en que se pueda disolver la sal y la proteína disminuye. En estos sistemas la diferencia entre la concentración de sal en el agua disponible de la fase superior y la concentración de sal en la fase inferior es uno de los principales factores que gobiernan la separación.

El modelo de Kim da una explicación cualitativa de K de las proteínas en un sistema polímero sal, pero no se pueden hacer predicciones porque el número de parámetros y su variabilidad hacen difícil su aplicación sobre un amplio rango de sistemas. Al igual que el modelo de King cada polímero de diferente PM se considera como otro polímero, por lo que hay que calcular nuevos parámetros.

Estudios más profundos sobre modelos de este tipo hacen falta, puesto que los sistemas polímero sal son de interés industrial, por la rápida separación de fases, en comparación con los sistemas polímero-polímero.

MODELO DE BASKIR. El modelo de Baskir está apoyado en el modelo del "cristal" de Scheutjens y Fleer el cual explica las interacciones del polímero sobre una superficie. Para Baskir el centro del cristal es la proteína, y alrededor de ella se encuentran unidas las moléculas de solventes y de polímero de tal manera que la forma del cristal está en función de la forma de la proteína.

Así el modelo da una descripción molecular de las interacciones proteína-polímero y permite calcular el coeficiente de partición en función de la concentración y PM del polímero de la fase, usando un solo valor de la energía de interacción proteína-polímero. La principal desventaja es que no considera los efectos de las sales sobre la partición de proteínas.

Es importante resaltar que si bien estos modelos analizan el fenómeno de partición de un biomaterial en función de varios parámetros, estos presentan limitaciones porque cada modelo considera solamente ciertos parámetros específicos, además de que se considera en los sistemas la partición de un solo biomaterial ó proteína, no tomando en cuenta que en la purificación de estos, la partición de los contaminates. Si bien es cierto que los actuales modelos dan una explicación del fenómeno es difícil predecir el sistema adecuado para la purificación de una proteína, sin embargo los mismos nos pueden dar lineamientos generales para la selección del sistema adecuado.

En el siguiente capítulo se dan algunos lineamientos para la selección de un sistema adecuado en la purificación de una proteína. Estos lineamientos estan basados en los estudios reportados para la purificación de diferentes proteínas e involucran sistemas para la eliminación de restos celulares, así como para mejorar el factor de purificación.

CAPITULO TRES
PURIFICACION DE UNA PROTEINA INTRACELULAR
POR MEDIO DE SISTEMAS ACUOSOS DE DOS FASES.

En el capítulo, anterior se describió la estrategia general de purificación de una enzima intracelular y en ella se observó que un proceso puede estar formado por dos pasos. En el primero de ellos el objetivo es la eliminación de restos celulares y en el segundo es el mejoramiento del factor de purificación (eliminación de otras proteínas y algunos otros materiales).

En el presente capítulo, se sugieren algunos lineamientos generales para lograr el objetivo planteado en cada uno de los pasos, mencionando algunos ejemplos ilustrativos.

I. ELIMINACION DE LOS RESTOS CELULARES.

(Primer paso de purificación)

El primer paso de purificación de una enzima intracelular es la eliminación de restos celulares, este paso generalmente es efectuado mediante la centrifugación o filtración. Sin embargo, debido a que al romper las células, el tamaño de la partícula decrece considerablemente y la viscosidad de la suspensión celular aumenta, la eficiencia del proceso de separación (sólido-líquido) se ve disminuida sobre todo a escala industrial.

Una tecnología alternativa para este paso de purificación es la desarrollada primordialmente por Kula M. R. et. al. 1979. Esta metodología fundamentada en el principio de separación líquido-líquido, usa sistemas acuosos de dos fases. En dichos sistemas la separación se logra cuando el producto de interés se va hacia una de las fases y los restos celulares hacia la otra.

En este paso es recomendable, que los restos celulares queden en la fase inferior y el producto de interés en la fase superior para evitar que la eficiencia del proceso disminuya al momento de escalar (Hustedt H. et. al. 1985).

Para lograr dicho efecto en los sistemas acuosos de dos fases, se pueden variar diferentes parámetros como: el tipo, concentración y peso molecular del polímero(s) usado(s), la clase de las sales adicionadas al sistema, la fuerza iónica, el pH y la temperatura. Debido a que todos los parámetros son interdependientes es difícil predecir el comportamiento que tendrá

un producto en un sistema determinado, así que las condiciones adecuadas para un proceso de purificación, tienen que ser establecidas por prueba y error.

A pesar de la complejidad del fenómeno, los diversos estudios para la purificación de proteínas, proporcionan información básica con la cual se pueden plantear estrategias para el establecimiento de un proceso determinado. Así por ejemplo la literatura recomienda que para lograr la eliminación de los restos celulares, se deberán usar concentraciones de los componentes abajo de la curva binodial, en donde se obtienen sistemas homogéneos. La razón de utilizar estas concentraciones de los componentes en los sistemas, es que al adicionar las células rotas, los polímeros de las mismas, contribuyen a la separación de las fases.

Por otra parte Hustedt H. et. al.(1978) recomienda para sistemas compuestos por PEG 1550 y fosfato de potasio pH 7.4 usar aquellos situados a la izquierda de la curva binodial, es decir usar sistemas compuestos con bajas concentraciones de sal (menores al 12%) y por concentraciones de PEG arriba y abajo de la curva binodial (fig 3.1.).

También existen una serie de estudios, que describen el comportamiento que presentan diferentes enzimas, al aumentar la concentración celular para un sistema determinado (Kula M. R. 1979) (fig 3.2 y 3.3). De estos estudios se puede concluir que la concentración de restos celulares altera la relación de volúmenes pero que el coeficiente de partición de la enzima tiende a mantenerse constante hasta una concentración determinada de restos celulares en donde empieza a decaer.

Este hecho marca un compromiso entre la mayor cantidad de células que se pueda introducir a un sistema y el rendimiento del sistema, ya que al aumentar la mayor cantidad de células no solo disminuye K sino también la relación V_a/V_i . Es decir es más conveniente evaluar los sistemas en términos económicos.

En general los sistemas más usados para este paso de purificación son aquellos compuestos por PEG y fosfato de potasio (tabla 2.3) en ellos se observa un factor de purificación mejor que el obtenido en sistemas de PEG/dextrán (Hustedt H. et. al. 1983).

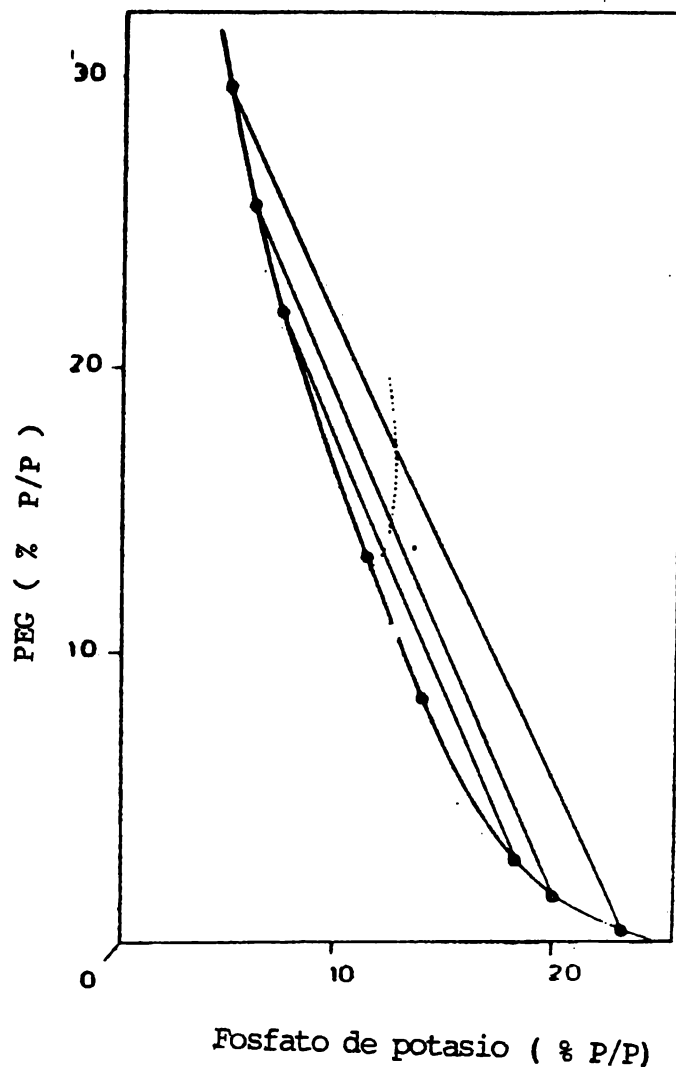


Fig. 3.1. Concentraciones de PEG y fosfatos en donde los restos celulares quedan en la fase inferior (zona dentro de las líneas punteadas). Los sistemas fueron hechos con PEG 1550 y amortiguador de fosfato pH 7.4 (Husted H. et. al. 1978).

En base a estos antecedentes se pueden elegir algunos sistemas para probar la eficiencia de la eliminación de los restos celulares, en un principio probablemente sea una selección a simple vista. Una vez obtenidos algunos sistemas se procedería a evaluarlos en función del rendimiento de la fase superior y en función del factor de purificación.

Para tratar de optimizar la purificación en función de cualquiera de estos criterios (según se juzgue conveniente), se podrían seguir los lineamientos que la literatura recomienda para mejorar la purificación de una enzima (próxima sección). Sin embargo esto hay que tomarlo con mucha reserva debido a que los

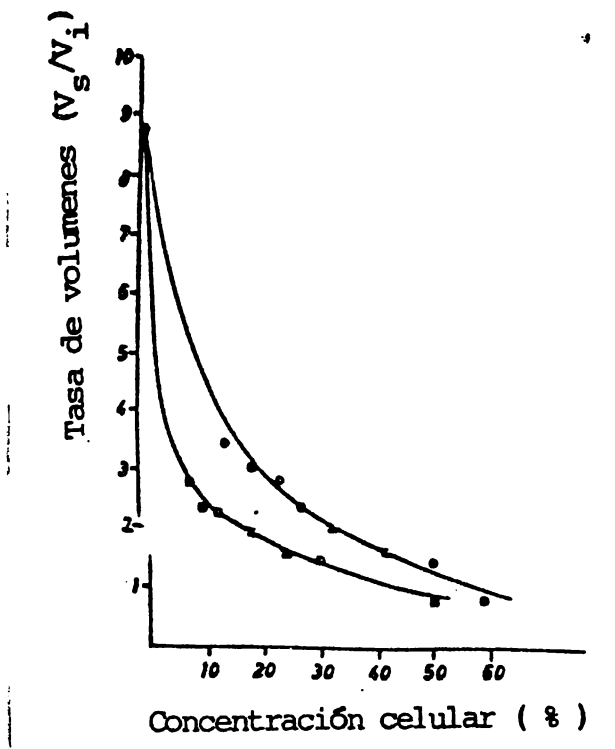


Fig.3.2. Influencia de la concentración celular sobre la tasa de volúmenes (V_s / V_i) de un sistema de dos fases, en un estudio hecho con *K. pneumoniae* (o o) y *S. carlsbergensis* (o o). Notese que al aumentar la concentración celular la tasa de las fases decae rápidamente (Kula M. R. 1979).

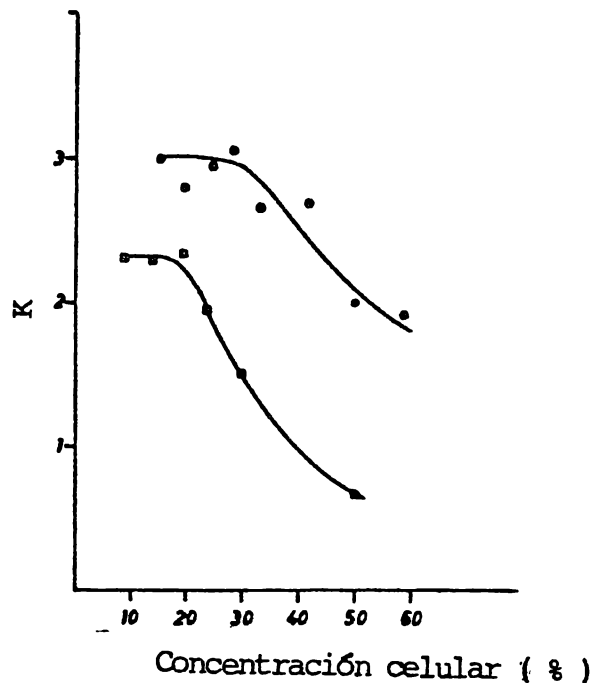


Fig 3.3. Influencia de la concentración celular sobre el coeficiente de partición (K) de la pululanasa de *K. pneumoniae* (o o o o) y α -glucosidasa de *S. carlsbergensis* (o o o o). El comportamiento es similar para ambas enzimas, puesto que K se mantiene constante hasta determinada concentración celular, después de la cual decae considerablemente (Kula M. R. 1979).

restos celulares alteran las características de cualquier sistema, por lo que probablemente el comportamiento de la enzima de interés será diferente al que presentaría sin restos celulares.

El objetivo en un primer paso de purificación, es la eliminación de los restos celulares y la recuperación de la mayor cantidad de enzima en la fase superior. El factor de purificación, se puede mejorar en un segundo ó tercer paso de purificación, cuando ya no se tienen los restos celulares que alteran las características del sistema original.

II. PURIFICACION DE LA ENZIMA.

(Segundo paso de purificación)

Una vez efectuado la eliminación de restos celulares (primer paso de purificación), por medio de sistemas acuosos de dos fases se puede seguir purificando la enzima ó proteína de interés por la misma metodología.

La manera de hacerlo es agregar a la fase superior (la cual contiene el producto de interés), la cantidad adecuada de sales y algunas veces de PEG para la formación de un segundo sistema de purificación.

En este sistema, la enzima puede distribuirse preferentemente hacia la fase superior o bien hacia la inferior dependiendo de los contaminantes que se quieran eliminar.

La distribución de la enzima hacia la fase superior, se recomienda cuando se quieren eliminar ácidos nucleicos y polisacáridos puesto que estos contaminantes por su naturaleza hidrofílica se van hacia la fase inferior. El fenómeno inverso (partición hacia la fase inferior) es recomendable para eliminar contaminantes de naturaleza hidrofóbica como es el caso de subproductos con color (Hustedt H. et. al. 1985).

Si se desea efectuar un tercer paso de purificación las mismas consideraciones deben de tomarse en cuenta. Sin embargo por razones económicas a menudo se recomienda procesos de dos pasos (Kroner K. H. et. al. 1984).

En la última etapa se recomienda que la enzima se vaya hacia la fase rica en sal, para evitar los problemas asociados con la eliminación posterior de PEG.

Los parámetros que influyen para lograr los efectos antes

restos celulares alteran las características de cualquier sistema, por lo que probablemente el comportamiento de la enzima de interés sera diferente al que presentaría sin restos celulares.

El objetivo en un primer paso de purificación, es la eliminación de los restos celulares y la recuperación de la mayor cantidad de enzima en la fase superior. El factor de purificación, se puede mejorar en un segundo ó tercer paso de purificación, cuando ya no se tienen los restos celulares que alteran las características del sistema original.

II. PURIFICACION DE LA ENZIMA.

(Segundo paso de purificación)

Una vez efectuado la eliminación de restos celulares (primer paso de purificación), por medio de sistemas acuosos de dos fases se puede seguir purificando la enzima ó proteína de interés por la misma metodología.

La manera de hacerlo es agregar a la fase superior (la cual contiene el producto de interés), la cantidad adecuada de sales y algunas veces de PEG para la formación de un segundo sistema de purificación.

En este sistema, la enzima puede distribuirse preferentemente hacia la fase superior o bien hacia la inferior dependiendo de los contaminates que se quieran eliminar.

La distribución de la enzima hacia la fase superior, se recomienda cuando se quieren eliminar ácidos nucleicos y polisacáridos puesto que estos contaminantes por su naturaleza hidrofílica se van hacia la fase inferior. El fenómeno inverso (partición hacia la fase inferior) es recomendable para eliminar contaminates de naturaleza hidrofóbica como es el caso de subproductos con color (Hustedt H. et. al. 1985).

Si se desea efectuar un tercer paso de purificación las mismas consideraciones deben de tomarse en cuenta. Sin embargo por razones económicas a menudo se recomienda procesos de dos pasos (Kroner K. H. et. al. 1984).

En la última etapa se recomienda que la enzima se vaya hacia la fase rica en sal, para evitar los problemas asociados con la eliminación posterior de PEG.

Los parámetros que influyen para lograr los efectos antes

mencionados son los mismos que influyen en la eliminación de los restos celulares y son: tipo, PM y concentración del polímero, tipo y concentración de sales, pH, temperatura etc., siendo los más eficientes para efectuar este paso el tipo y concentración de sales adicionadas al sistema.

TIPO, CONCENTRACION Y PM DEL POLIMERO. Debido a que los parámetros que intervienen en la partición de un soluto en sistemas de dos fases son múltiples, es difícil establecer una estrategia clara, para la purificación de la proteína, sin embargo quizá uno de los fenómenos más claros sean aquellos que se refieran a la hidrofobicidad. Así una de las maneras en como intervienen la concentración y el PM de los polímeros en la distribución de las proteínas, es mediante las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas que la proteína experimenta en las diferentes fases. Es decir que si una proteína presenta en su estructura cuaternaria muchas zonas hidrofóbicas, se irá hacia la fase más hidrofóbica, en cambio si presenta pocas se irá hacia la fase menos hidrofóbica (hidrofílica).

Así para la selección del polímero a usar se podría elegir a aquel que sea más o menos hidrofóbico según se requiera. Albertsson P. A. 1971 reporta que en una solución acuosa los polímeros tienden a ser más hidrofóbicos en el siguiente orden: polipropilenglicol, polietilenglicol, polivinil alcohol, metilcelulosa, hidroxipropildextrán, dextrán, carboxymetil dextrán y sulfato dextrán.

Sin embargo debido a que no se han caracterizado los sistemas con todos los polímeros mencionados, las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas se pueden explotar mediante la concentración y peso molecular del polímero, por ejemplo dos sistemas con la misma composición presentan diferente hidrofobicidad si están constituidos por polímeros de diferente PM, siendo menos hidrofóbico aquel compuesto por el polímero de bajo PM, debido a que los extremos cargados aumentan.

En sistemas constituidos por el mismo polímero (igual PM) pero diferente concentración, son más hidrofóbicos aquellos que tienen una alta cantidad de polímero.

De los diferentes estudios realizados sobre la influencia del PM, se ha concluido que, para mejorar la recuperación de la

enzima en la fase superior en sistemas de PEG/dextrán (K grande) es aconsejable usar sistemas con PEG de bajo PM, dextrán de alto PM o bién un amortiguador de fosfatos que provoca un aumento aparente del PM de dextrán (fig 3.4 y 3.5).

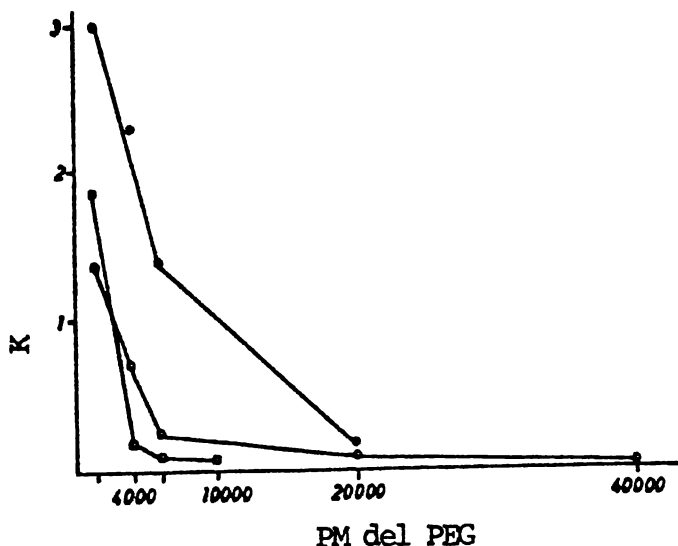


Fig. 3.4. Influencia del PM del PEG sobre la partición de tres enzimas: Pululanasa (o o o) y 1,4 α-glucano fosforilasa (□ □ □) de *K. pneumoniae* y leucil-tRNA sintetasa de *E. coli* (● ● ●) (Kula M.R. 1979).

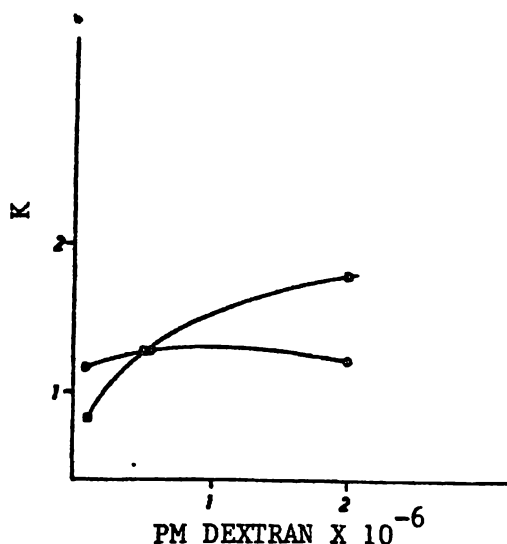


Fig. 3.5. Influencia del PM del dextrán sobre la partición de dos enzimas: α-glucosidasa de *S. carlbergensis* (o o o) e isoleucyl-tRNA sintetasa de *E. coli* (□ □ □).

La manera en que influyen la concentración de los polímeros sobre K es también en sentido inverso. Es decir cuando aumenta la concentración de PEG se observa una disminución de K.

INFLUENCIA DE LOS IONES SOBRE LA PARTICION DE UNA PROTEINA.

La composición iónica en los sistemas de dos fases influye determinantemente en la purificación de una proteína, debido a que cada ión presenta diferente coeficiente de partición, lo cual ocasiona que se establezca una diferencia de potencial entre las fases que a su vez influye en la distribución de moléculas cargadas como proteínas y ácidos nucleicos. Existen también otros mecanismos involucrados en la distribución de diferentes moléculas como alteración de la solvatación de las proteínas, precipitación de las mismas y muchos más que no han sido bien entendidos.

La diferencia de potencial es uno de los mecanismos más explotados para un segundo y tercer paso de purificación en donde es necesario eliminar la mayor cantidad posible de proteínas de la enzima de interés.

Uno de los sistemas más estudiados en relación a este punto es el sistema compuesto de PEG 4000 (7%) y dextrán T 500 (7%). En él se ha observado que al adicionar sales de fosfato (arriba de pH 7.0) la fase inferior presenta una carga negativa, lo que trae como consecuencia que las proteínas cargadas negativamente se vayan a la fase superior, mejorandose el coeficiente de distribución.

Dicho fenómeno no solo es atribuido al potencial interfacial ocasionado por los diferentes coeficientes de partición de los iones, sino que también es atribuido a una exclusión estérica debido a que los grupos hidroxilos forman enlaces a intervalos entre los fosfatos y el poliglucano del dextrán ocasionando que se asocien más las cadenas de dextrán y aumente el volumen de exclusión (Kula M.R. et. al. 1982) Algunas de las enzimas que se han purificado mediante este principio han sido pululanasa y 1,4 α -glucano fosforilasa de *K. pneumoniae*, formato deshidrogenasa y formaldehído deshidrogenasa de *C. boydini*.

Lo que se observó es que al incrementar la concentración de fosfato en el sistema de purificación el coeficiente de la enzima incremento, siendo este incremento más notorio en la purificación de pululanasa (fig 3.6.).

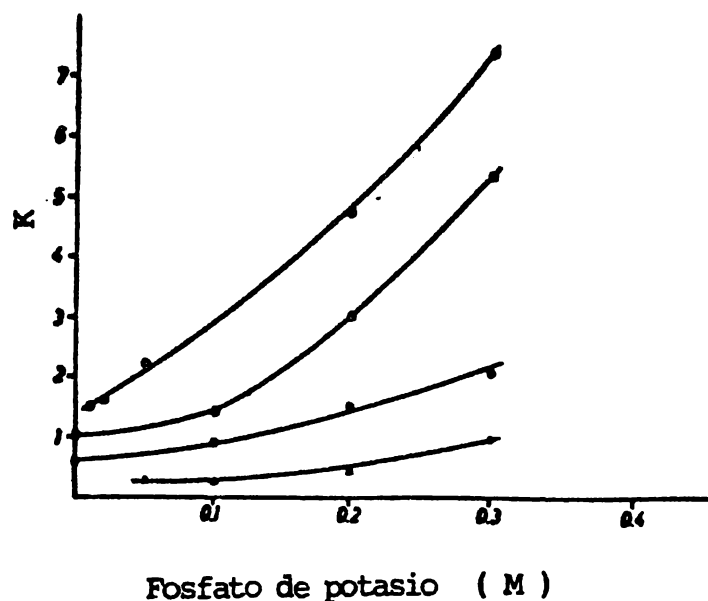


Fig 3.6 Influencia de la concentración de fosfato de potasio sobre la partición de varias enzimas en sistemas de PEG 4000/dextrán T 500. Pululanasa (○ ○ ○) y 1,4 α-glucano fosforilasa (▲ ▲ ▲ ▲ ▲) de *K pneumoniae* y formato deshidrogenasa (□ □ □) y formaldéhid deshidrogenasa (● ● ●) de *C. boidinii* (Kula M. R. 1979).

En los sistemas acuosos de dos fases compuestos de PEG y fosfato las sales juegan un papel importante en la purificación de una enzima. Sin embargo los fenómenos que más influyen en la partición de las diferentes moléculas están más relacionados a la solvatación y precipitación de las proteínas que a una diferencia de potencial o a una exclusión estérica. Kula M. R. (1985) reporta la influencia de NaCl sobre la composición de cada una de las fases con sistemas de PEG 1540 (14%) y fosfato de potasio (12%) a pH 7.0. De estos estudios (fig 3.7.) se concluye que en la fase superior la concentración de PEG va incrementando, siendo este incremento más pronunciado cuando utiliza una concentración de NaCl de 2 mol/Kg (aproximadamente), mientras que la concentración de PEG en la fase inferior presenta un comportamiento similar pero en sentido inverso.

La concentración de sales (fosfato) en la fase superior va disminuyendo al ir incrementando la concentración de NaCl adicionado, en cambio la concentración de esta en la fase inferior primero experimenta un incremento, pero cuando ha sido adicionado NaCl a una concentración mayor a 1 mol, la concentración de fosfato empieza a decaer.

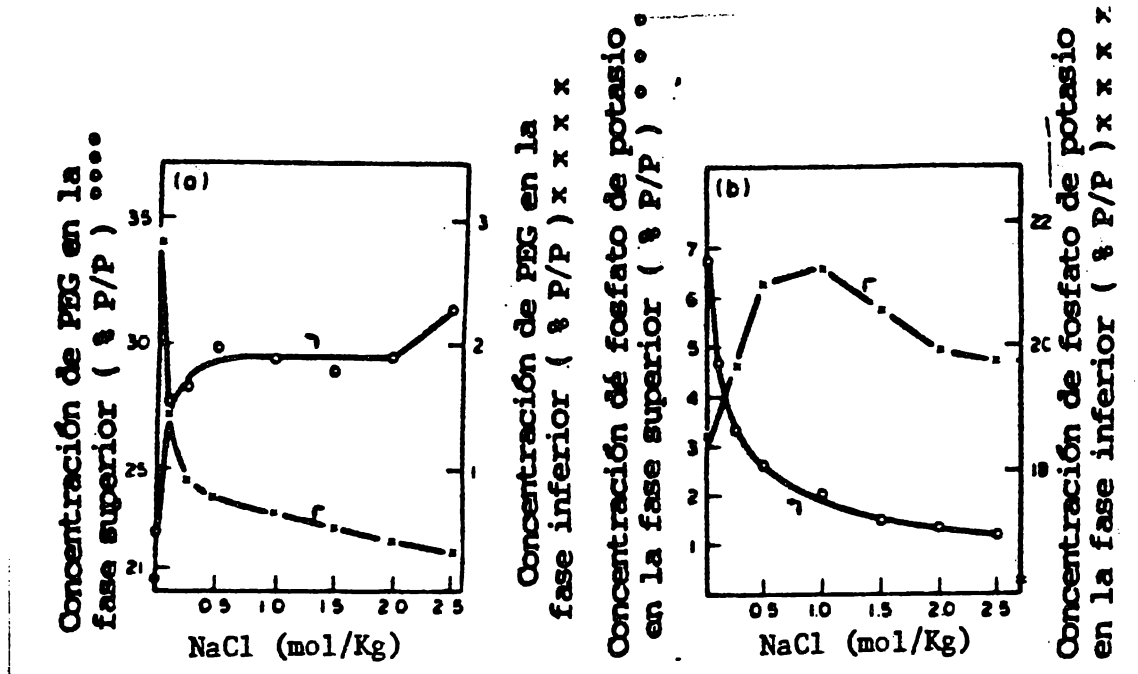


Fig 3.7. Perturbación del sistema PEG 1540 (14%) y fosfato de potasio pH 7 (12%) por la adición de NaCl.

Este trabajo nos da una idea de las alteraciones que puede experimentar un sistema con la adición de pequeñas cantidades de sal y es la respuesta individual de las proteínas a estos cambios lo que cambia la distribución de las proteínas.

También se han hecho estudios sobre la influencia de las sales que forman al sistema en relación al coeficiente de partición. Uno de estos estudios describe el comportamiento del coeficiente de partición de pululanasa de *K. pneumoniae* al incrementar la concentración de sulfato de amonio en sistemas compuestos por dicha sal y PEG 4000 (Kula M. R. 1982).

Los resultados son mostrados en la fig. 3.8. en ella se observa que el coeficiente de partición incrementa siendo el efecto más pronunciado cuando se incrementa la concentración de PEG (18%) y la concentración de sulfato de amonio (12%) por lo tanto se recomienda usar el sistema que tiene la más alta cantidad de sales y de PEG.

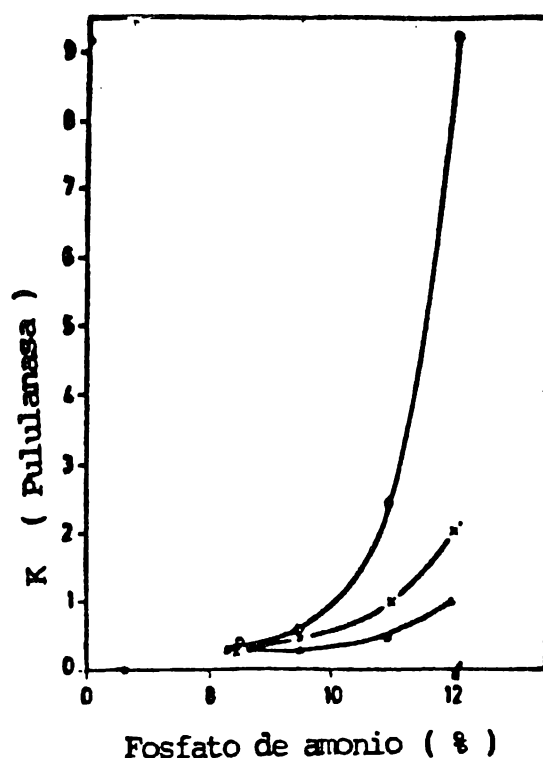


Fig. 3.8. Influencia de la concentración total de sulfato de amonio sobre el coeficiente de partición de la pulunasa, en un sistema de PEG 4000/sulfato de amonio (o) PEG 18% (x) PEG 16% y (▲) PEG 14%. (Kula M.R. 1982).

PARTICION POR AFINIDAD. Otra de las formas de lograr un alto grado de purificación es mediante la partición por afinidad. Esta técnica se fundamenta en el mismo principio que la adsorción por afinidad, es decir que explota la afinidad que presenta la enzima de interés hacia otra molécula (ligando) como el sustrato, producto, inhibidor o un anticuerpo para separarla del resto de la proteína. La diferencia es que la cromatografía se realiza mediante un soporte sólido, en cambio la distribución por afinidad se efectúa mediante el recuperamiento de un polímero en solución (previamente modificado), por lo que resulta ser un proceso más difícil.

La estrategia seguida es usar un ligando que tenga preferencia hacia una fase (generalmente hacia la fase superior) y que forme un complejo con la enzima de tal forma que al enriquecerse hacia una de las fases se enriquezca a su vez la enzima.

Aunque este proceso no es sencillo, presenta ciertas características que lo hacen ventajoso. Como por ejemplo el equilibrio de la interacción entre ligando y enzima se alcanza más rápido en solución que en un sólido; y la capacidad de enlace por unidad de volumen es mayor. Además la partición por afinidad puede ser efectuada en continuo, lo que no ocurre en la adsorción por afinidad, (que es un proceso esencialmente intermitente), siendo esta característica muy importante cuando se desea escalar (Kula M. R. 1982).

La elección del ligando a usar va a depender de las características de la enzima que se este purificando. Algunos de los más usados son el NADP, usado para la purificación de deshidrogenasas y las tintas triazina, pero existen muchos más que se pueden usar.

Cuando se utilizan colorantes de la triazina como ligandos, los factores que determinan el coeficiente de distribución son: la concentración de ligando-polímero en relación a la enzima que puede unirse al ligante, la concentración de dextrán y de PEG, la concentración de sales, el pH, el PM del polímero y la temperatura (Johansson G. 1971).

Para establecer las condiciones óptimas para la purificación por afinidad, cada uno de los parámetros podría ser variado sistemáticamente y analizado en función de la partición de la enzima y de la demás proteína.

PRECIPITACION CON PEG. La precipitación es una metodología frecuentemente usada en la purificación de proteínas sobre todo cuando se desea enriquecer el producto. En la mayoría de los casos se emplea el sulfato de amonio como agente precipitante sin embargo el fenómeno también se puede efectuar usando otros reactivos como solventes orgánicos (acetona o alcohol), polímeros hidrofílicos no ionicos (PEG) y polielectrolitos.

En el establecimiento de un proceso de purificación de una enzima o cualquier proteína mediante sistemas acuosos de dos fases, la precipitación de proteínas con PEG puede ser evaluada como un paso en el proceso.

Las ventajas que ofrece la incorporación de este paso es que al estar trabajando con sistemas constituidos con PEG y otro polímero ó sal, unicamente es necesario agregar más PEG para

lograr el fenómeno de precipitación, o bien después de un paso de precipitación con PEG, se podría pasar a un paso de purificación por medio de un sistema constituido por PEG y otro polímero o sal.

La precipitación con PEG, puede ser comparada a la precipitación con solventes orgánicos (etanol, acetona) mas que a la precipitación con sulfato de amonio. En ella la precipitación de las proteínas se debe principalmente a la reducción de la actividad del agua, es decir, que la capacidad de la solvatación del agua hacia una molécula cargada, hidrofílica es reducida.

En la precipitación intervienen diversos factores como el peso molecular y la concentración del polímero, la concentración de la proteína en la solución, el pH, la fuerza iónica, la temperatura etc., por lo que resulta ser un fenómeno complejo.

Honing W. & Kula M. R. (1976) han estudiado la influencia del peso molecular y concentración del polímero en la precipitación de proteínas, específicamente para la precipitación de la α -glucosidasa de *S. Carlsbergensis*. De su trabajo se concluye que cuando se usa PEG de alto PM (6000) las proteínas precipitan a bajas concentraciones de polímero (10-20%), en cambio cuando se usa PEG de bajo PM (400) es necesario aumentar la concentración de polímero (40-50%) para lograr el mismo efecto. Además de que precipita una menor cantidad de proteína (fig 3.9.).

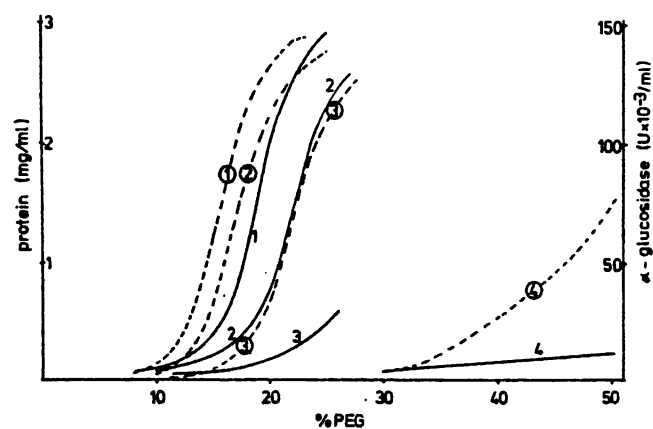


Fig 3.9. Precipitación con PEG de la α -glucosidasa de *S. Carlsbergensis* - - - enzima y — proteína. PEG 6000 (1), PEG 4000 (2), PEG 1500 (3) y PEG 400 (4) (Honig W. y Kula M. R. 1976).

En base a estos antecedentes y por razones económicas se recomienda usar PEG de alto PM. Sin embargo el usar PEG de bajo PM presenta la ventaja de que la actividad específica incrementa en el precipitado, por lo que además de enriquecer el producto se mejora el factor de purificación.

Otro aspecto importante a considerar en la precipitación es el compromiso que hay que establecer entre el rendimiento y el factor de purificación. Los mismos autores reportan que la actividad específica de la α -glucosidasa obtenida en la precipitación con PEG de diferentes PM es mayor cuando se recupera el 50% de la enzima, si se desea recuperar más (fig 3.10.) producto, es necesario "sacrificar" la actividad específica.

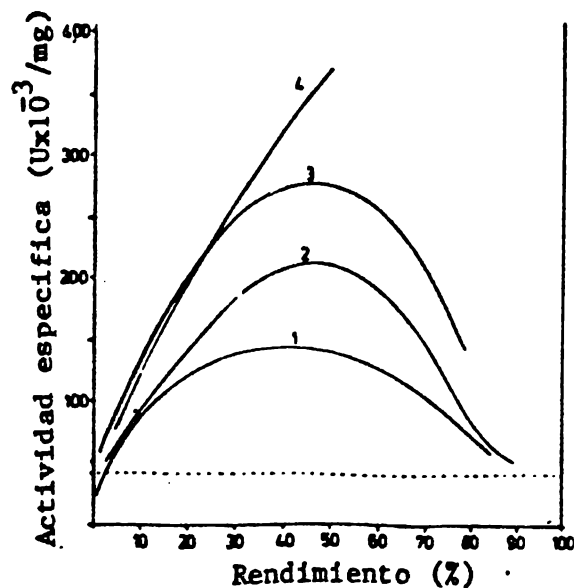


Fig. 3.10. Precipitación de la α -glucosidasa de *S. Carsbergensis*. En la gráfica se muestra la actividad específica contra rendimiento (Honig W. y Kula M. R. 1976)

En la precipitación también juega un papel importante el PM de la proteína que se está purificando. Honing W. & Kula M. R. (1976) establecen que un mejor factor de purificación puede ser obtenido cuando la proteína de interés tiene un PM más alto que el resto de la demás proteína.

La influencia del pH, fuerza iónica y concentración de la proteína en la solución sobre la precipitación con PEG 6000 han sido estudiadas en detalle por Foster P. R. et. al. 1973. Ellos estudiaron el comportamiento de tres enzimas de *S. cerevisiae*: fumarasa, alcohol deshidrogenasa e invertasa, usando un extracto celular y observaron que al incrementar el pH la solubilidad de

la proteína incrementa, lo que indica que es recomendable trabajar a pHs bajos para lograr que la mayoría de la proteína precipita a bajas concentraciones de polímero.

La forma en que la fuerza iónica influye en la precipitación es cambiando las características de los sistemas. Con una fuerza iónica menor de 2.5 en los sistemas se forma una fase sólida (proteína precipitada) y una fase líquida; a mayores fuerzas iónicas se observa una fase sólida y un sistema de dos fases; y con una fuerza iónica mayor a 3.5 se observa únicamente el sistema de dos fases.

A diferencia de lo que ocurre en la precipitación con sulfato de amonio, en la precipitación con PEG es aconsejable usar bajas concentraciones de proteína (menor a 10 mg/ml) para lograr una separación fraccional, de lo contrario esta metodología es adecuada únicamente para concentrar pero no para purificar.

ELIMINACION DE POLIMEROS.

Una etapa muy importante dentro del proceso de purificación de una enzima por medio de los sistemas acuosos de dos fases, es la eliminación de los polímeros PEG ó dextrán.

Para el caso de sistemas constituidos por PEG y sales, la eliminación de PEG se puede efectuar formando un sistema en donde la enzima de la fase superior se vaya hacia la fase inferior (rica en sales). Las sales a su vez son eliminadas por un paso de diálisis o ultrafiltración (Kula M. R. 1982).

Otra alternativa es introducir un paso con cromatografía por adsorción o intercambio iónico, en donde el producto se adsorba al soporte y el PEG no. Posteriormente cambiando el eluyente se provoca la disociación del producto.

Para sistemas compuestos por PEG/dextrán es recomendable diluir la fase inferior para después eliminar el polímero por diafiltración ó ultrafiltración. Debido a que generalmente el PM del PEG es pequeño y el del dextrán es grande en comparación al de la enzima purificada, la eliminación de los polímeros por esta técnica resulta adecuada (Kula M. R. 1979).

Otras posibilidades es la centrifugación para moléculas ó partículas muy grandes (Albertsson P. A. 1971) o la precipitación con sales (Kula M. R. 1979).

III. ASPECTOS TECNICOS

Los dos principales aspectos técnicos que se deben de considerar para llevar a cabo el proceso a escala industrial son el mezclado de los componentes para alcanzar el equilibrio de distribución y la separación de fases.

MEZCLADO. Al parecer el mezclado de los componentes no es un problema grave puesto que la baja tensión superficial que presentan los sistemas $0.1 - 2 \text{ mN/m}$ para sistemas PEG/sal y $.001 - .1 \text{ mN/m}$ para sistemas PEG dextrán (Hustedt H. et. al. 1985) propicia la formación de pequeñas gotas y por lo tanto de una gran interfase, favoreciendo que el equilibrio se alcance rápidamente.

Para procesos en lote, el mezclado puede hacerse en vasos levemente agitados por 10 minutos o más, este procedimiento puede ser utilizado incluso cuando se desea eliminar los restos celulares en donde la fase del fondo alcanza viscosidades de 150 a 2000 mPa.s.

SEPARACION DE FASES. La separación de fases puede efectuarse de diversas maneras: por sedimentación gravitacional y por centrifugas en lote o en continuo, dependiendo del paso de purificación se hace la elección.

Para la eliminación de restos celulares las centrifugas son necesarias, por la viscosidad relativamente alta de la fase del fondo. Hustedt H. et. al. 1985 reporta las especificaciones técnicas para los equipos que ellos usarán (tabla 3.1.) en la eliminación de los restos celulares. Como se observa existe equipo adecuado para la eliminación de restos celulares por medio de sistemas acuosos. El equipo es pequeño y puede ser manejado a un flujo de hasta 150 l/h.

Con el separador Wesfalia se pueden procesar 200 Kg de células en 8 hrs, para una suspensión celular al 25 %, obteniéndose una pureza de las fases de 95 a 100 %. Para el caso de que la fase inferior sea altamente viscosa, el separador de α -Laval es recomendado (separación sólido-líquido) (Hustedt H. et. al. 1985).

Separador	Máxima		Volumen del Rotor l	Flujo l/h
	g	m ²		
Gyrotester B ^a	8500	700	.41	25
SADH-205 ^b	8100	1400	.25	100
YEB-1344 ^{a, c}	6860	1200	.82	150

^a Alfa laval, Tumba, Sveden; ^b Wesfalia Separador AG., Oelde FRG;
^c Nozzle separador; ^d para quitar restos celulares.

Tabla 3.1. Características de algunos separadores usados en la extracción enzimática. (Hustedt H. et. al.1985).

Para un segundo paso ó tercer paso de purificación, en donde no hay sólidos, la separación de fases puede llevarse a cabo por sedimentación en unas horas o por toda la noche. Sin embargo algunas ocasiones es necesario pasar el volumen cercano a la interfase por un centrífuga para una separación completa (Hustedt H. et. al. 1985).

Las otras alternativas para la separación de fases, son usar centrífugas por lote o en continuo, la ventaja que presenta un proceso en continuo es la eficiencia en términos del tiempo y el espacio, con lo cual bajan los costos de mano de obra. El principal inconveniente es la cantidad de material biológico que se necesita para efectuar los experimentos.

CAPITULO CUATRO

ASPECTOS ECONOMICOS

La extracción y purificación de proteínas por medio de sistemas acuosos de dos fases, presenta varias características como gran capacidad de procesamiento, altos rendimientos, un potencial alto para un proceso continuo y un fácil y preciso escalamiento. Estas características le dan ventajas técnicas sobre otras metodologías para su desarrollo a nivel de producción (Kroner K. H. et. al. 1984).

Sin embargo debido a que el desarrollo de nuevos procesos, no solamente depende del potencial técnico, sino también de la economía del proceso, es lógico preguntarse si un proceso por esta metodología es factible económicamente. La importancia de analizar dicha metodología en estos términos, se debe básicamente al alto precio de los constituyentes de los sistemas, que a priori indican una contribución considerable al costo del producto.

En relación a este punto existen en la literatura tres estudios que analizan aspectos económicos de la extracción y purificación de proteínas por medio de sistemas acuosos de dos fases. Dos de ellos (Kroner K. H. et. al. 1984 y Datar R. 1988) analizan aspectos económicos únicamente en relación a la eliminación de restos celulares, comparando esta metodología con la centrifugación y filtración. El otro estudio (Kroner K. H. et. al. 1982) evalúa un proceso completo de purificación de la Formato deshidrogenasa de *C. boidinii* por medio de sistemas acuosos de dos fases de PEG/fosfato de K y lo compara con un método tradicional de purificación el cual involucra un paso de precipitación con estreptomycin y dos cromatografías de intercambio iónico y con un método mixto el cual involucra el uso de sistemas acuosos (PEG/dextrán y PEG/fosfato) junto con una ultrafiltración y una cromatografía de intercambio iónico.

A continuación se presenta un análisis comparativo de los dos primeros estudios (Kroner K.H. et. al. 1984 y Datar R. 1986), para la eliminación de restos celulares, con el objeto de evaluar que parámetros influyen determinadamente en el costo del producto.

Rendimiento. Un aspecto importante en la evaluación económica de diferentes metodologías es el rendimiento. Dependiendo de la cantidad de producto que se recupere, el costo

de producción disminuirá ó se incrementará.

En relación a este punto Kroner establece el mayor rendimiento para los sistemas acuosos (90%), siendo el rendimiento para la filtración y centrifugación 5 % mas baja (tabla 4.1).

En su estudio Datar R. (1986) considera diferentes rendimientos en la eliminación de restos celulares (tabla 4.2). Para la β -galactosidasa el mayor rendimiento se obtiene en la centrifugación, en cambio con la hormona de crecimiento es en la filtración de flujo tangencial en donde se obtiene el mayor rendimiento. Como se puede observar el rendimiento en las diferentes metodologías va depender de las características del producto que se desea purificar.

Metodo	Celulas Kg	Volumen l	Capacidad Kg/l	Flujo l/h	Kg/l.h	Rendimiento %	Factor de purificación	Tiempo h	Energía Kwh	Inver. \$
Sistema Acuoso	100	330	0.3	120	0.11	90	3-5	2.75	3	7.800
16 % PEG 1550										
10 % KP										
Centrifuga de disco										
f : 1400 m ²										
Centrifugación Intermitente	100	1000	0.1	100	0.01	85	1	10	32	30.000
Centrifuga de disco										
f : 7000 m ²										
Filtración en columna	100	500	0.2	60	0.02	85	1	8.3	42	46.000
A : 1.5 m ²										
Filtración Flujo transversal.	100	2000 ^{a)}	0.05	200	0.005	85	1	10	50	25.000
Fibra bucca	100	4000 ^{b)}	0.03	400	0.003	85	1	10	80	40.000
A: 10 m ² a) / 22 m ² b)										

a) Retención de la enzima R= 0

b) Retención de la enzima R= 0.7

Tabla 4.1. Eliminación de restos celulares por diferentes metodologías (Kroner K.H et. al. 1984)

En su estudio Datar R. (1986) considera diferentes rendimientos en la eliminación de restos celulares (tabla 4.2). Para la β -galactosidasa el mayor rendimiento se obtiene en la centrifugación, en cambio con la hormona de crecimiento es en la filtración de flujo tangencial en donde se obtiene el mayor rendimiento. Como se puede observar el rendimiento en las diferentes metodologías va depender de las características del producto que se desea purificar.

Metodo	Volumen del producto. m ³ /año	β-GALACTOSIDASA			HORMONA DE CRECIMIENTO (Por ADN recombinante)			INTERFERON (Por ADN recombinante)		
		Rend. %	Conc. Kg/m ³	CPT US \$/Kg	Rend. %	Conc. Kg/m ³	CPT US \$/Kg	Rend. %	Conc. Kg/m ³	CPT. US \$/Kg
Filtración de flujo tangencial.	765	30	1.1	146	85	3.1	52	34	1.2	130
Centrifugación a alta velocidad.	783	87	3.1	90	70	2.5	112	60	2.2	130
Extracción con sistemas acuosos.	360	84	6.5	153	68	5.3	190	100	7.8	130

Tabla 4.2. Perfil de costos para la eliminación de restos celulares en la purificación de la β -galactosidasa, del interferón y de la hormona de crecimiento (CPT Costo total de producción) (Datar R. 1986).

De acuerdo a los resultados de Datar R. (1986) un rendimiento bajo incrementa considerablemente el costo del producto. Así por ejemplo la β -galactosidasa en la filtración de flujo transversal presenta un rendimiento del 30% y es 2.8 veces más cara que la hormona de crecimiento, la cual tiene un rendimiento del 85%.

Factor de Purificación. En relación al factor de purificación Kroner K.H. (1984) reporta que en los sistemas acuosos generalmente se logran factores de purificación de 3-5 en la eliminación de restos celulares, lo cual no sucede en la filtración y centrifugación (tabla 4.1). Cuando se obtienen estos factores de purificación los sistemas acuosos presentan ventajas sobre las otras metodologías por que puede ser comparada a la

eliminación de restos celulares por centrifugación y filtración mas una precipitación con sulfato de amonio (Kroner K. H. et. al. 1984).

Volumen de trabajo y condiciones de operación del equipo.

Otros factores técnicos que influyen el aspecto económico son el volumen de trabajo y las condiciones de operación del equipo.

El volumen de trabajo influye en el sentido que a mayor volumen se incrementa el tiempo del proceso, lo que trae como consecuencia un incremento en gastos de labor y energía.

También al incrementar el volumen de trabajo se incrementan los gastos de sales por el gran volumen de amortiguador usado (para el caso de la centrifugación y filtración).

Los resultados de Kroner K.H. et.al. (1984) muestran que cuando se usa la centrifugación ó la filtración para la eliminación de restos celulares el volumen de trabajo puede ser hasta 12 veces mayor (filtración en fibra hueca) que el volumen de trabajo de los sistemas acuosos. Con los datos de Datar R. se puede concluir lo mismo, puesto que el volumen de producto/año es el doble cuando se usa la centrifugación y la filtración (783 y 765 m³) que cuando se usan los sistemas acuosos (360 m³).

La capacidad y las condiciones en las que se puede operar el equipo son determinantes en el costo y estos van a estar determinados por las características del material procesado y de la metodología usada. Con los sistemas acuosos (Kroner K.H. et.al. 1984) el flujo que se puede usar en la separación de restos celulares es mayor que el que se usa en la centrifugación y filtración. Debido a este hecho y a que que el volumen de trabajo es pequeño (comparado al volumen de trabajo de la centrifugación y filtración) es que el proceso se puede realizar en menos tiempo (2.75 hrs)

Materia Prima. La contribución de la materia prima en el costo total del producto es fundamental para la eliminación de restos celulares cuando se usan sistemas acuosos de dos fases. La razón es el alto precio de los componentes de los sistemas (polímeros y sal).

Para la filtración el mayor gasto lo representan el remplazo de membranas y las sales del amortiguador en donde es resuspendido el material biológico. Para la centrifugación, este rubro también

esta función del costo del amortiguador debido al gran volumen de trabajo.

En el estudio de Kroner K.H. et. al. 1984, (tabla 4.3) se observa que la materia prima representa el 53 y 71 % del costo total cuando se eliminan los restos celulares por medio del sistema acuoso de dos fases.

Metodo	Costo ferm.	materia prima	Labor	Energia	Inver.	Rend.	Costo de prod
	\$/Kg	\$/Kg	\$/Kg	\$/Kg	\$/Kg	(%)	\$/Kg
Sistemas acuosos	0.58	1.56	0.32	0.01	0.30	90	2.94
Centrifugación	0.58	0.68	1.15	0.02	2.4	85	4.82
Filtración	0.58	0.85	0.96	0.02	3.68	85	4.66
Flujo transversal (R = 0)	0.58	0.78	1.15	0.03	2.0	85	4.90
Flujo transversal (R = 0.7)	0.58	0.98	1.15	0.04	3.2	85	5.36
Centrifugación + Precipitación	0.58	0.88	1.53	0.05	3.20	80	6.80
Sistemas acuosos	5.8	6.80	0.32	0.01	0.30	90	9.52
Centrifugación	5.8	5.90	1.15	0.02	2.40	85	11.78
Filtración	5.8	6.07	0.96	0.02	3.68	85	11.60
Flujo transversal (R = 0)	5.8	6.00	1.15	0.03	2.0	85	11.84
Flujo transversal (R = 0.7)	5.8	6.20	1.15	0.04	3.2	85	12.30
Centrifugación + Precipitación.	5.8	6.10	1.53	0.05	3.2	80	14.18

Tabla 4.3. Eliminación de restos celulares por diferentes métodos factores de costos y costo total. Datos para levadura y bacterias, primero y segundo cuadro respectivamente

esta función del costo del amortiguador debido al gran volumen de trabajo.

En el estudio de Kroner K.H. et. al. 1984, (tabla 4.3) se observa que la materia prima representa el 53 y 71 % del costo total cuando se eliminan los restos celulares por medio del sistema acuoso de dos fases.

Metodo	Costo ferm.	materia prima	Labor	Energia	Inver.	Rend.	Costo de prod
	\$/Kg	\$/Kg	\$/Kg	\$/Kg	\$/Kg	(%)	\$/Kg
Sistemas acuosos	0.58	1.56	0.32	0.01	0.30	90	2.94
Centrifugación	0.58	0.68	1.15	0.02	2.4	85	4.82
Filtración	0.58	0.85	0.96	0.02	3.68	85	4.66
Flujo transversal (R = 0)	0.58	0.78	1.15	0.03	2.0	85	4.90
Flujo transversal (R = 0.7)	0.58	0.98	1.15	0.04	3.2	85	5.36
Centrifugación + Precipitación	0.58	0.88	1.53	0.05	3.20	80	6.80
Sistemas acuosos	5.8	6.80	0.32	0.01	0.30	90	9.52
Centrifugación	5.8	5.90	1.15	0.02	2.40	85	11.78
Filtración	5.8	6.07	0.96	0.02	3.68	85	11.60
Flujo transversal (R = 0)	5.8	6.00	1.15	0.03	2.0	85	11.84
Flujo transversal (R = 0.7)	5.8	6.20	1.15	0.04	3.2	85	12.30
Centrifugación + Precipitación.	5.8	6.10	1.53	0.05	3.2	80	14.18

Tabla 4.3. Eliminación de restos celulares por diferentes métodos factores de costos y costo total. Datos para levadura y bacterias, primero y segundo cuadro respectivamente

Para las otras metodologías (filtración y centrifugación), la contribución de la materia prima en el costo total es menor, siendo el 16 % para cuando se eliminan restos celulares de levadura y 50 % en el caso de bacteria.

Los resultados de Datar R. 1986 (Tabla 4.4) concuerda con los Kroner en el sentido que cuando se usan sistemas acuosos la contribución de la materia prima en el costo total es del 60 %, un porcentaje bastante alto. Sin embargo para la filtración y centrifugación los resultados no concuerdan. En la filtración Datar R. obtiene que la materia prima contribuye el 20 %, un porcentaje inferior al que reporta Kroner y en la centrifugación no incluye este rubro. La posible causa de estas diferencias es que Kroner K.H considera el costo de las sales para la elaboración de los amortiguadores y Datar R. no hace esa consideración. El hecho de que el costo de sales influya determinantemente en el costo total, se debe a los grandes volúmenes de trabajo que se manejan en estas operaciones unitarias.

Metodo	materia prima	Labor	Energia	Inver.	Costo de prod
	\$/Kg	\$/Kg	\$/Kg	\$/Kg	\$/Kg
Sistemas acuosos	107.1	4.9	1.7	55.2	168.9
Centrifugación	—	4.9	10.6	257.6	273.1
Filtración	12.2	9.9	5.2	38.6	65.9

Tabla 4.4. Comparación de costos (US/Kg de cel. P.H.) para la eliminación de restos celulares. Datos calculados a partir de los reportados por Datar R.1986, previa conversión.

Labor, energía e inversión. Kula M.R. et. al. (1982), establece que en los sistemas acuosos de dos fases por las características que presenta la metodología los costos de labor energía e inversión son bajos. El estudio económico realizado por Kroner K. H. et. al. 1984, confirma lo anterior puesto que el costo de los tres rubros es menor para los sistemas acuosos que los obtenidos en la centrifugación y filtración tanto para levaduras como para bacterias. Por lo que la alternativa más viable es el uso de sistemas acuosos de dos fases.

Sin embargo los resultados de Datar R. (1986) no confirman lo mismo. Los resultados que obtuvo, muestran que unicamente en la energía, los sistemas acuosos son mas económicos. En los gastos de labor presentan el mismo costo que el de la centrifugación y en la inversión la metodología mas económica es la filtración. Esto da como resultado que la metodología más viable sea la filtración.

La diferencia de resultados entre los estudios de Kroner K.H. y Datar R. se puede deber a dos causas basicamente. Una es la escala del proceso y la otra la metodología que usan para el cálculo de cada uno de los rubros.

Kroner K. H. establece que los sistemas acuosos de dos fases son viables económicamente cuando se procesan 700 y 1000 Kg de células/lote para levaduras y bacterias respectivamente. Dicha metodología puede ser viable a escalas mayores (2000 Kg de células /lote) si se compara la eliminación de restos celulares por sistemas acuosos con la centrifugación o filtración y una precipitación con sal.

Los estudios realizados por Kroner K. H. y Datar R. difieren en la escala del proceso, así Kroner hace el estudio para procesar 100 Kg de cel.P.H/lote y Datar R. lo hace para procesar 75000 Kg de cel. P.S/año lo cual equivale a 2.5×10^6 Kg de cel.P.H/año (considerando que una pasta celular contiene el 70% de humedad).

En relación a la metodología para el cálculo de cada uno de los rubros Kroner K. H. para el costo de energía y labor considera el precio de Kw/h y de labor/h junto con el tiempo para realizar el proceso. Para la inversión el considera una depreciación del 13% al año, por un período de 10 años con 250 días/año.

Datar R. (1986), en cambio para la estimación del costo de labor considera rubros como gastos de operación mantenimiento y overhead y para la energía, las utilidades.

De estos estudios se puede concluir que para la eliminación de restos celulares una metodología adecuada pueden ser los sistemas acuosos de dos fases. Esto se ve apoyado por las siguientes ventajas técnicas: tiempos cortos para realizar el proceso, equipo de menor capacidad y la posibilidad de tener una planta multipropósito. El principal inconveniente de esta metodología es el alto costo de los constituyentes del sistema

como son los polímeros y sales.

La eliminación de restos celulares por medio de sistemas acuosos de dos fases puede ser una alternativa viable a una escala no mayor de 2000 Kg de células siempre y cuando se obtenga un buen rendimiento así como cierto grado de purificación. De tal forma que se puede comparar la eliminación de restos celulares por dicha metodología con la eliminación de restos celulares por centrifugación o filtración y una precipitación con sulfato de amonio.

La evaluación de un proceso de purificación usando varios sistemas de dos fases no puede ser realizado por la falta de datos. Sin embargo a priori se puede decir que el costo de los constituyentes del sistema va a ser determinante en el costo total del producto. Una alternativa a este aspecto, puede ser la reutilización de los polímeros.

CONCLUSIONES

Para la obtención de enzimas puras, existen diferentes operaciones unitarias y metodologías a escala de producción con las cuales se puede obtener el producto deseado.

La elección de las metodologías para un proceso de purificación va a depender de diversos factores como: características del producto que se desea purificar, escala de producción así como de la economía del proceso.

En la eliminación de restos celulares de microorganismos se pueden usar la centrifugación, filtración o los sistemas acuosos.

Las primeras dos operaciones unitarias están basadas en un principio de operación sólido-líquido por lo que el tamaño de la partícula es determinante en la eficiencia de separación.

Para la centrifugación además del tamaño de partícula es importante la diferencia de densidades y la viscosidad.

Aunque existe equipo disponible para efectuar ambas operaciones a escala piloto y de producción, la eliminación de restos celulares en dicho equipo no es tan eficiente o presenta diversos problemas como consecuencia de las características del extracto celular.

La centrifugación es recomendada cuando se procesan grandes volúmenes, porque se puede establecer un proceso continuo y el proceso es relativamente económico. La principal desventaja es que se recupera el 90% de los sólidos.

La filtración de flujo transversal en cambio se recomienda cuando el volumen de trabajo es pequeño porque se recupera el 100% de sólidos. Sin embargo debido a los costos de reemplazamiento de membranas y de bombeo ésta no es económicamente viable a gran escala.

El empleo de los sistemas acuosos para la eliminación de restos celulares es una metodología prometedora porque éstos se pueden eliminar eficientemente a bajas gravedades y los sistemas son reproducibles independientemente de la escala.

Técnicamente la eliminación de restos celulares por medio de sistemas acuosos puede ser comparada con la eliminación de restos celulares por centrifugación o filtración y un paso de precipitación.

El principal inconveniente de esta metodología es el alto costo de los componentes del sistema (polímeros).

Después de la eliminación de restos celulares las metodologías usadas en un proceso de purificación son la precipitación, con la cual se logra concentrar y purificar parcialmente el producto, y la cromatografía (en cualquiera de sus modalidades) con las que se purifica más específicamente el producto.

Tanto la precipitación como la cromatografía son metodologías efectuadas a nivel industrial, sin embargo ambas presentan problemas técnicos al momento de escalar.

Con los sistemas acuosos también se puede realizar una purificación específica del producto de interés en base a una diferencia de potencial o por afinidad.

El establecimiento de un sistema acuoso para la purificación de una proteína no es una tarea sencilla porque no existen lineamientos generales que se puedan aplicar por lo que en la mayoría de las ocasiones el proceso se establece por prueba y error.

La razón es que en los sistemas acuosos el fenómeno es muy complejo, en él intervienen las características de las fases así como las características del producto que se desea purificar.

El hecho de que sea un sistema multicomponente (polímeros, sales, agua, diferentes proteínas, ácidos nucleicos restos celulares etc) hacen difícil la predicción del coeficiente de partición.

Los sistemas acuosos más estudiados para la purificación de proteínas son los compuestos por PEG/dextran y con PEG /sales, principalmente fosfato de potasio.

Para el establecimiento de un sistema acuoso que purifique una proteína es importante conocer tanto las características de las fases, así como las características del producto que se desea purificar con el objeto de comprender los fenómenos que intervienen en la partición.

En relación a las características de los sistemas acuosos se han reportado varias curvas binodiales para sistemas con PEG de diferente PM y dextrán así como PEG (diferente PM) y sales de fosfato.

Los criterios para la selección de un sistema acuoso son rendimiento (Y%), factor de purificación (F.P.), coeficiente de distribución (K) y grado de separación (G).

Los dos primeros son los comúnmente evaluados en cualquier metodología de purificación mientras que los últimos son específicos para los sistemas acuosos.

El objetivo en cualquier proceso de purificación es tener el mayor rendimiento y un buen factor de purificación.

En los sistemas acuosos para obtener un buen rendimiento en la fase superior es deseable tener un coeficiente de distribución mayor a uno, en cambio si el producto se desea recuperar en la fase inferior el coeficiente de distribución debe ser menor a 1.

Para obtener un buen factor de purificación es aconsejable que los coeficientes de distribución del producto y de los contaminantes sean lo más diferente posible, de tal forma que el producto se recupere en una fase y los contaminantes en la otra.

En un intento para comprender el fenómeno de partición se han postulado varias teorías: Bronsted, Brooks, King, Kim y Baskir. La primera de ellas (Bronsted) establece el tamaño de la partícula como principal parámetro en la partición. Los demás modelos explican la partición en función de mantener el potencial químico de cada uno de los componentes iguales en las fases.

El principal inconveniente de esos modelos es que ninguno de ellos considera todas las posibles interacciones en cada sistema, además de que analizan el fenómeno en función de una sola proteína y no de una mezcla de las mismas.

Para el establecimiento de un proceso de purificación de una proteína intracelular por medio de sistemas acuosos se recomienda usar dos o tres pasos por cuestiones económicas.

En el primer paso se recomienda que los restos celulares queden en la fase inferior y el producto de interés en la fase superior. En el segundo y tercer paso del proceso donde el objetivo es mejorar el factor de purificación, la proteína de interés puede permanecer en la fase superior o migrar hacia la fase inferior y los contaminantes migrar a la fase opuesta.

Para lograr que los restos celulares queden en la fase inferior se recomienda:

a). usar concentraciones de los componentes de los sistemas abajo de la curva binodial.

b). Para sistemas con PEG 1550 y fosfato de potasio pH 7.4 se recomienda usar sistemas con bajas concentraciones de sal (total) y con concentraciones de PEG arriba y abajo de la curva binodial.

La influencia que tienen los restos celulares en el comportamiento de los sistemas acuosos se observa cuando:

a). Se usan concentraciones de los componentes abajo de la curva binodial (sistemas homogéneos) y se adicionan células rotas, éstas contribuyen a la separación de las fases por los polímeros que contienen.

b). Al aumentar la concentración celular en un sistema determinado la tasa de volumen (V_{sup}/V_{inf}) disminuye.

c). Al incrementar la concentración celular, el coeficiente de partición de una proteína decrece.

Los parámetros que influyen en la partición de una proteína son: PM y concentración de polímeros, tipo y concentración de sales pH y temperatura.

La forma en que intervienen el PM y la concentración de polímero en la partición de una proteína depende fundamentalmente de las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas que se pueden establecer entre una de las fases y la proteína de interés, de tal forma que una proteína hidrofóbica va a tener mayor afinidad hacia una fase hidrofóbica que hacia una hidrofílica.

Se ha observado que al incrementar el PM del polímero decae el coeficiente de partición. La concentración de los polímeros tiene una influencia sobre K, también en sentido inverso, es decir cuando se incrementa la concentración de estos, decae K.

Las sales influyen en la partición de una proteína porque presentan diferentes coeficiente partición, lo que ocasiona una diferencia de potencial entre las fases. Dicho potencial a su vez influye en la distribución de proteínas cargadas y de ácidos nucleicos.

Otra de las formas de mejorar la purificación de una proteína mediante un sistema acuoso de dos fases es usando ligandos que presenten afinidad hacia la proteína de interés y

que por estar unido a un polímero del sistema, migran hacia una fase.

En la partición por afinidad la capacidad de enlace por unidad de volumen es mayor y se alcanza el equilibrio rápidamente por ser una reacción en líquido. Estas características le dan ventaja sobre la adsorción por afinidad, además de que en una extracción líquido-líquido se puede establecer un proceso continuo.

Con los sistemas acuosos se han purificado diferentes enzimas no solo a nivel de laboratorio, sino que incluso algunos procesos se han escalado como es el caso para la Formato deshidrogenasa, D-glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, Pululanasa y 1,4 α -glucano fosforilasa entre otras.

Los sistemas acuosos presentan ventajas técnicas como:

- a). La metodología es reproducible al momento de escalar.
- b). Debido a que la extracción líquido-líquido es una operación frecuentemente usada en la industria química, existe equipo disponible comercialmente para efectuar las operaciones unitarias que involucra como son: mezclado y separación de fases.
- c). Los procesos se realizan en tiempos cortos, lo que trae como consecuencia un ahorro en gastos de mano de obra y energía.

Los estudios económicos realizados para la evaluación de los sistemas acuosos, como una metodología para la purificación de proteínas intracelulares han sido realizados únicamente para la eliminación de restos celulares por la falta de datos para la evaluación de un proceso completo.

La evaluación económica de la eliminación de restos celulares por medio de sistemas acuosos comparados con filtración y centrifugación muestra que la viabilidad económica va a estar en función de la escala del proceso.

Para procesos a pequeña escala es recomendable usar sistemas acuosos porque el tiempo corto del proceso trae como consecuencia un ahorro en mano de obra y energía. A escalas mayores el precio de los polímeros sobrepone los beneficios que traen ventajas por lo que la metodología no resulta adecuada.

Kroner K. H. 1984 concluye que la eliminación de restos celulares por medio de sistemas acuosos de dos fases es una alternativa viable cuando se procesan 700 y 1000 Kg de células de levadura y bacteria respectivamente. A escalas mayores la metodología no es económicamente viable.

El hecho de que la eliminación de restos celulares por medio de sistemas acuosos pueda ser comparada a la eliminación de restos celulares por centrifugación o filtración y una precipitación con sulfato de amonio, le da ventajas económicas sobre otras metodologías. Kroner establece que si se hace esta comparación los sistemas acuosos son viables económicamente hasta una escala de 2000 Kg de células por lote.

Los sistemas acuosos de dos fases son una metodología que puede ser usada para la purificación de proteínas intracelulares, porque con ella se eliminan eficientemente los restos celulares a bajas gravedades y en este paso generalmente se logra una purificación parcial. Dicha metodología es viable económicamente a pequeña escala (1000 Kg de células por lote). Por lo tanto se recomienda para una primera etapa del proceso de purificación de una proteína.

Para una etapa de purificación más específica, también se puede usar los sistemas acuosos de dos fases. Sin embargo la elección de la metodología más adecuada para realizar esta etapa va a estar en función de diversos parámetros como pureza obtenida, facilidad de escalar el proceso y la viabilidad económica.

APENDICE

ALGUNOS PROCESOS DE PURIFICACION ESTABLECIDOS PARA PURIFICACION DE ENZIMAS USANDO SISTEMAS ACUOSOS DE 2 FASES

Con el objeto de ilustrar algunas de las posibles aplicaciones de los sistemas acuosos de dos fases en la purificación de enzimas, se presentan algunos esquemas de procesos de purificación que han sido reportados en la literatura. Como podrá observarse el esquema de purificación depende de la proteína en cuestión y de su aplicación.

FORMATO DESHIDROGENASA

El presente esquema (fig.1) ejemplifica el proceso desarrollado por Kroner K.H. et. al. (1982) para el escalamiento de formato deshidrogenasa de *C. bondinii*. La obtención de la enzima se realiza usando solamente sistemas acuosos de dos fases (4 sistemas en total). El objetivo de este proceso es eliminar restos celulares y contaminantes mayores, para la obtención de una enzima grado técnico. En este proceso el rendimiento es mayor al 75% y la actividad específica es de 2.5 U/mg de proteína, con lo cual se purifica 3.7 veces y se obtiene una enzima grado técnico.

D-GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

Johansson G. y Joelsson M. (1985) reportan la purificación de la D-glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de levaduras (*S. cerevisiae*) en un proceso de tres etapas, combinando la extracción líquido-líquido con precipitación fraccional y cromatografía de adsorción (fig 2.a y b), con el objeto de obtener una enzima altamente purificada (factor de purificación de 260 a 330 y con una actividad específica de 43-45 U/mg de prot.).

En la primera etapa realizan una doble precipitación con PEG de 6000-7500. En la primera precipitación (PEG 6.5%) logran la eliminación de algunas proteínas junto con las células, membranas y parte de ácidos nucleicos y en la segunda (PEG 12.5%) separan la mayoría de las proteínas incluyendo la enzima (precipitado) de sales y otras sustancias de bajo P.M. (sobrenadante). Al final de esta etapa donde recuperan el 70% de la enzima, la actividad específica ha incrementado al doble.

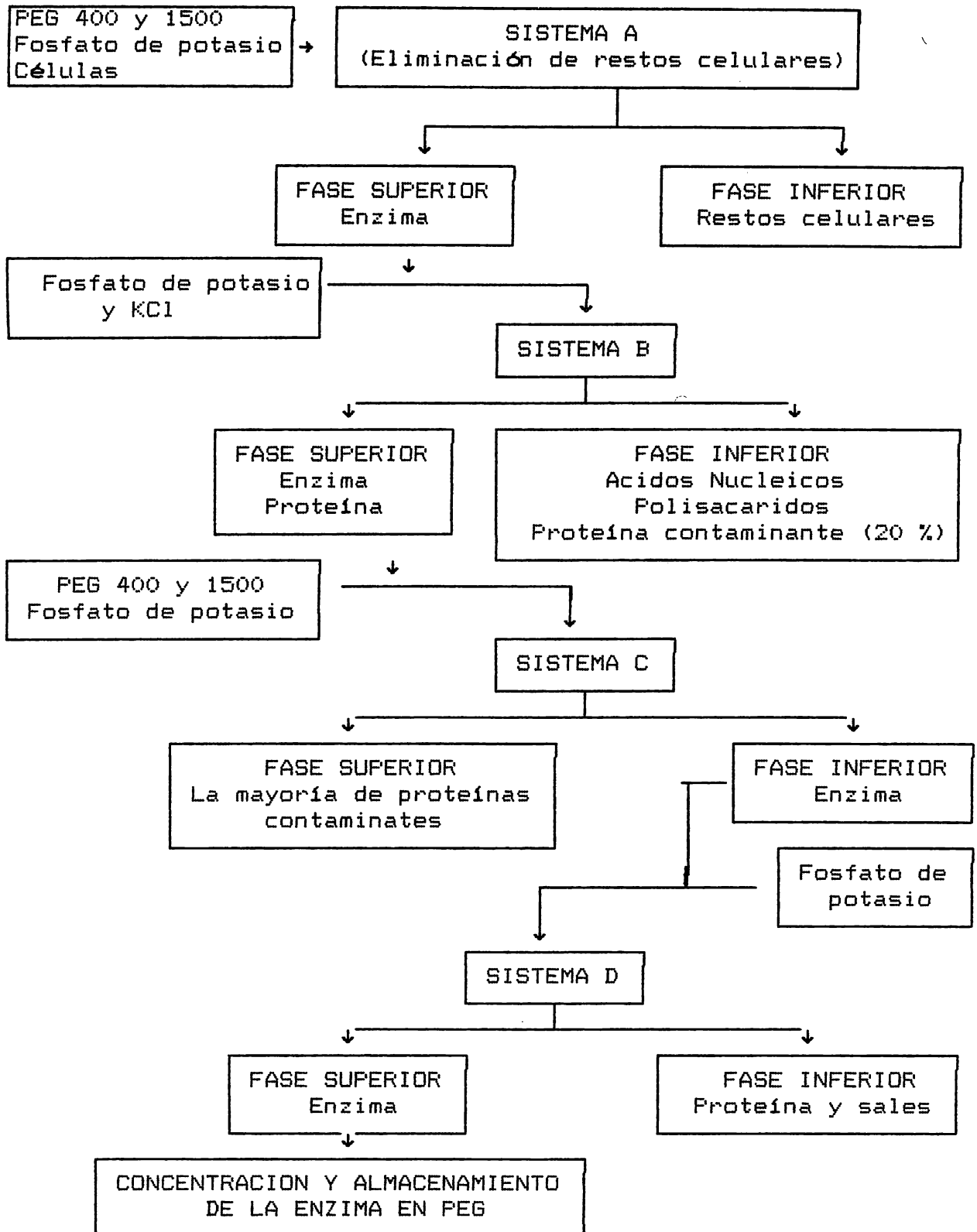


Fig.1. Escalamiento de la formato deshidrogenasa por medio de sistemas acuosos de dos fases.

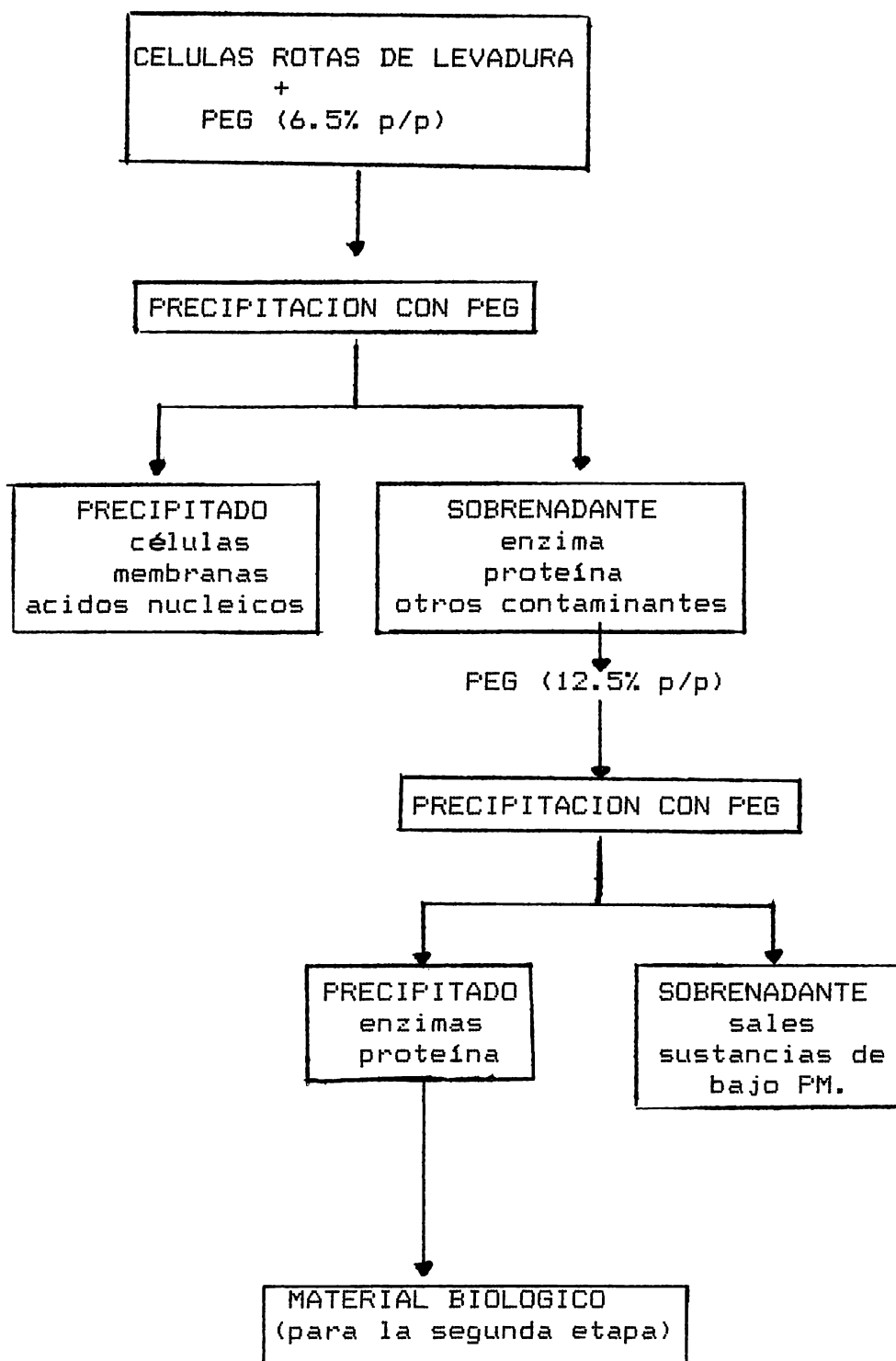


Fig. 2.a. Esquema de la purificación de D-glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de levaduras por afinidad de partición (Primera etapa).

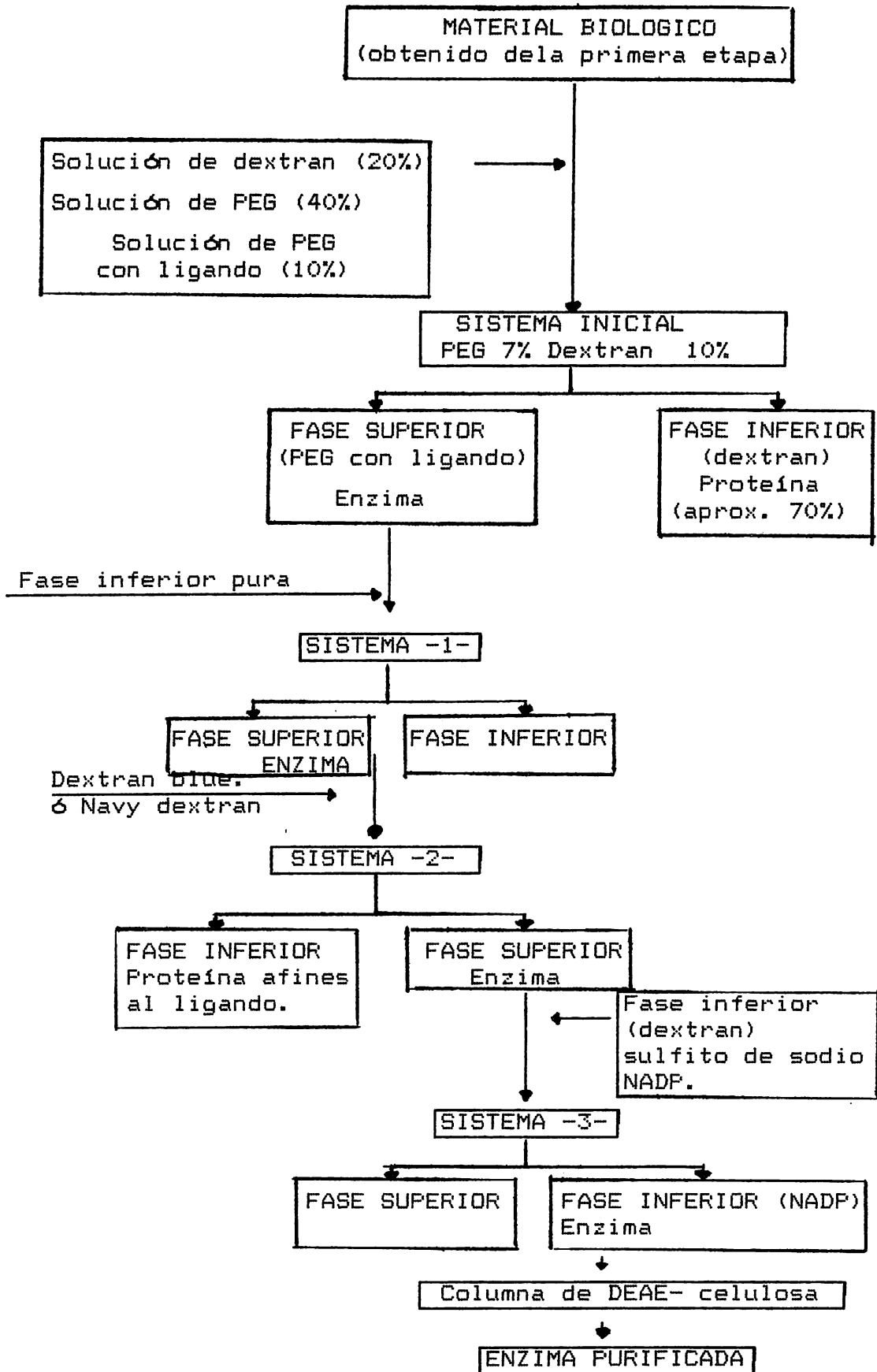


Fig.2.b Esquema de la purificación de D-glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de levaduras por afinidad de partición (segunda y tercera etapa).

En la segunda etapa de purificación utilizan la partición por afinidad para mejorar el factor de purificación. Aquí utilizan cuatro sistemas acuosos diferentes constituidos por PEG, dextran y diferentes ligantes. En los dos primeros sistemas usan PEG con ligantes afines a la enzima (olive o yellow) por lo que esta migra hacia la fase superior y la mayoría de la proteína queda en la fase inferior. En el tercer sistema la enzima permanece en la fase superior pero la proteína contaminante migra hacia la fase inferior por la afinidad que presenta hacia el ligando de esta fase. En el último sistema la D-glucosa 6-fosfato deshidrogenasa es pasada hacia la fase inferior, con la ayuda del NADP.

En la tercera y última etapa de purificación usan la cromatografía de adsorción con DEAE-celulosa, para separar la enzima del ligando, el cual está fuertemente ligado a la resina.

Todo el proceso se efectúa en 5 horas, se inicia con 1 Kg de células y se recupera del 43 al 48 % de la actividad total inicial. La actividad específica obtenida es de 43-45 U/mg de proteína, la cual es comparable a la actividad específica máxima reportada para la misma enzima purificada por otras metodologías.

PULULANASA Y 1.4 α - GLUCANO FOSFORILASA.

Un proceso de purificación interesante que involucra la extracción líquido-líquido es el reportado por Hustedt H. et. al. 1978, en donde se purifican simultáneamente a gran escala dos enzimas: la pululanasa y la 1,4 α -glucano-fosforilasa de *K. pneumoniae*. La primera enzima se logra purificar 4.2 veces y se recupera el 70% de la misma. Mientras que para la 1,4 α -glucano fosforilasa el rendimiento final es del 55% y el factor de purificación de 40.8. El esquema general es mostrado en la figura 3. Es importante resaltar que para la purificación de estas enzimas se usan tanto sistemas acuosos de dos fases (PEG/dextrán y PEG/sales) así como metodologías tradicionales, como la precipitación, la ultrafiltración y la adsorción.

Existen otra gran variedad de procesos de purificación que usan sistemas acuosos de dos fases reportados en la literatura, sin embargo estos son representativos ya que dan un panorama de las diferentes estrategias que se pueden seguir para lograr el objetivo de purificar una proteína.

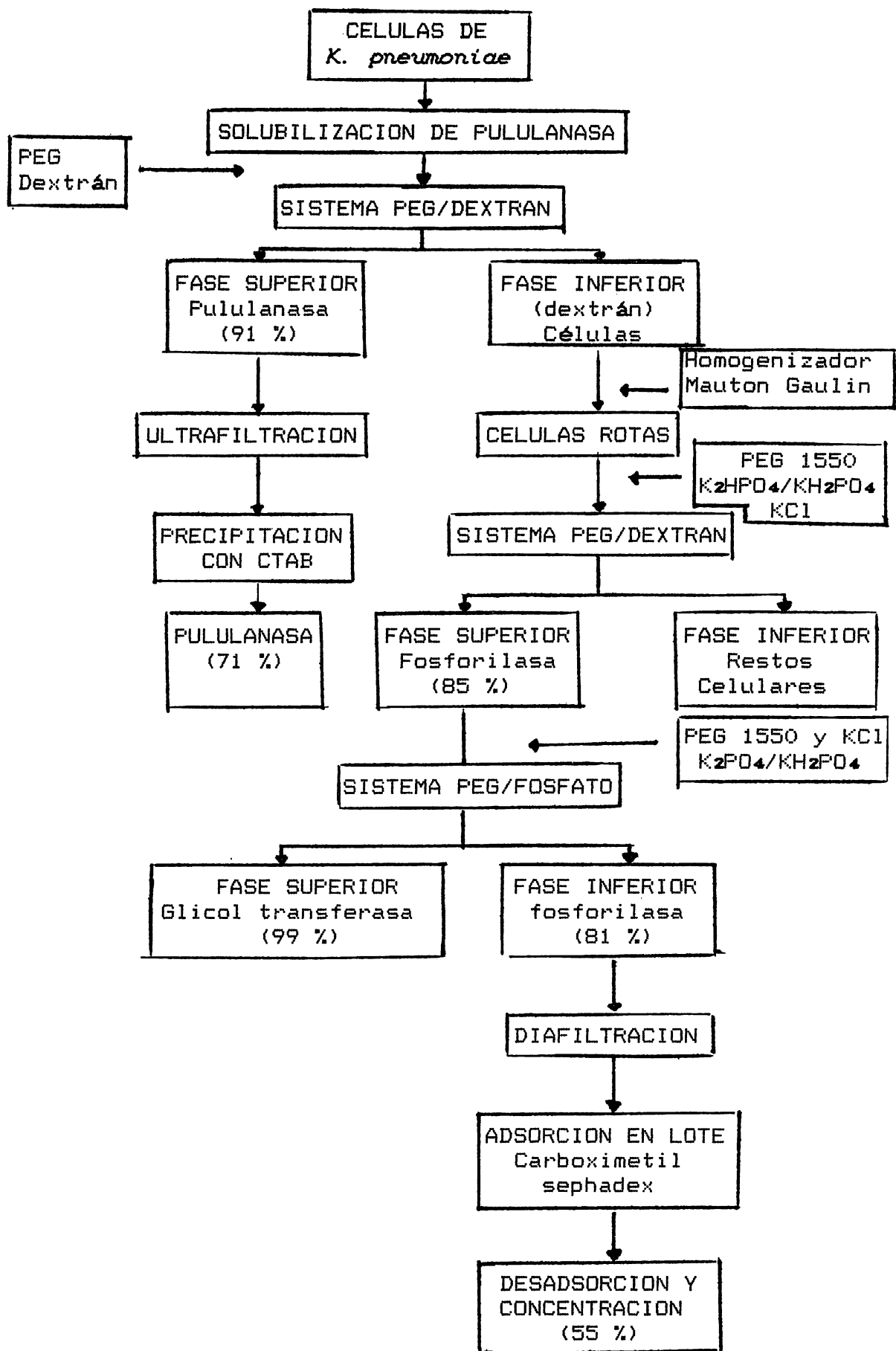


Fig.3 Aislamiento simultaneo a gran escala de pululanasa y 1,4 α -glucano fosforilasa de *K. pneumoniae* a empleando sistemas de dos fases.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Albertsson P.A. 1958. Particle fraction in liquid two phase systems. The composition of some phase systems and the behaviour of some model particles in them application to the isolation of cell walls from microorganisms. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol 27. 378-395.
- 2.- Albertsson P. A. 1971. Partition of cell particles and macromolecules. Willey. New York.
- 3.- Baskir J.N., Hatton T. A. & Suter U. W. 1989. Protein Partitioning in two-phase Aqueous Polymer Systems. *Biotechnology and Bioengineering* Vol 34. 541-558.
- 4.- Bell D. J., Hoare M. & Dunnill P. 1983. The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 26. Ed. A. Fiechter.
- 5.- Bettler P. A., E. L. Cussler et. W. S. Hu. 1988. *Bioseparations, downstream processing for Biotechnology* Wiley.
- 6.- Bonnerjea J., Oh S., Hoare M. & Dunnill P. 1986. Protein purification: the right step at the right time. *Biotechnology*. Vol 4. 954-958.
- 7.- Datar R. 1986. Economics of primary separation steps in relation to fermentation and genetic engineering. *Process biochemistry* Vol 21 (1) 19-25.
- 8.- Dunnill P. 1972. The recovery of intracellular Products. *Proc IV IFS: Ferment Technol Today* 187-194.
- 9.- Fauquex P., Hustedt H. & Kula M. R. 1985. Phase equilibration in agitated vessels during extractive enzymes recovery. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 35B 51-59.
- 10.- Flanagan S. D. & Barones S. H. 1975. Affinity Partitioning. A method for purification of proteins using specific polymer-ligands in aqueous polymers two-phase systems. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 250 No.4. 1484-1489.
- 11.- Foster P.R., Duniill P. & Lilly M.D. 1973. The precipitation of enzymes from cell extracts of *Saccharomyces cerevisiae* by polyethyleneglycol. *Biochimica et Biophysica Acta*. 317 505-516.
- 12.- Hammond P. M. & Scawen M. D. 1989. High-resolution fractionation of proteins in downstream processing. *J. of Biotechnology* Vol 11. 119-134.

- 13.- Hönig W. & Kula M. R. 1976. Selectivity of protein precipitation with polyethylene glycol fractions of various molecular weights. *Analytical Biochemistry*. 72 502-512.
- 14.- Hustedt. H., Kroner K. H., Menge U. & Kula M. R. 1985. Protein recovery using two-phase systems. *Trends in biotechnology* Vol 3. No.6. 139-144.
- 15.- Hustedt H, Kroner K. H, Shutte H and Kula M. R 1983. Extractive purification of enzymes In: *Enzyme technology. III Rotenburg fermentation symposium 1982: Kassel Germany*, R. M. Lafferty ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York Tokyo.
- 16.- Hustedt H., Kroner K. H., Stach W. & Kula M. R. 1978. Procedure for the simultaneous large-scale isolation of Pullulanase and 1,4- α -glucan phosphorylase from *Klebsiella pneumoniae* involving liquid-liquid separations. *Biotechnology and Bioengineering* XX 1989-2005.
- 17.- Janson J.C. 1984. Large scale affinity purification-state of the art and future prospects. *Trens in biotechnology* Vol 2 Num 2. 31-38.
- 18.- Johansson G. 1971. Affinity Partitioning. *Methods in enzymology* Vol 104. 356-365.
- 19.- Johansson G. & Joelsson M. 1985. Partial purification of D-glucose 6-phosphate dehydrogenase from bakers'yeast by affinity partitioning using polymer-bound triazine dyes. *Enzyme Microb Technol.* Vol 7 629-634.
- 20.- Kroner K. H., Hustedst H., Granda S. & Kula M. R. 1978. Technical aspects of separation using aqueous two-phase systems in enzyme isolation processes. *Biotechnology and Bioengineering* Vol XX. 1967-1988.
- 21.- Kroner K.H. Hustedt H. & Kula M. R. 1984. Extractive enzyme recovery: economic considerations. *Process Biochemistry* 1985 170-179.
- 22.- Kroner K. H., Schütte H., Stach W. & Kula M. R. 1982. Scale-up of formate dehydrogenase by partition. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 32 130-137.
- 23.- Kula M. R. 1979. Extraction and purification of enzymes using aqueous two-phase systems. *Applied Biochemistry and Bioengineering* Vol 2. 71-95.

24.- Kula M. R. 1985. Liquid-liquid extraction of biopolymers. In:Comprehensive Biotechnology Vol II Cap. 28 451-472.

25.- Kula M. R., Kroner K. H. & Hustedt H. 1982. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. Advances in biochemical engineering. Ed. A. Firchter. Springer Vol 24. 73-118.

26.- Kula M.R., Kroner K. H.,Hustedt H. and Schutte H. 1982. Scale-up of protein purification by liquid-liquid extraction. Enzyme engineering. Ed. Chibota I., Fukui S. & Wingard L.B. Plenum Press Vol.6 69-74.

27.- Mackay D. & Salusburry T. 1988. Choosing between centrifugation and crossflow microfiltration. The chemical engineer Vol 447. 45-50.

28.- Mattiasson B. 1983. Applications of aqueous two-phase systems in biotechnology. Trends in Biotechnology Vol.1. No.1. 16-20.

29.- Mattiasson B. & Kaul R. 1986. Use of aqueous two-phase systems for recovery and purification in biotechnology. In: Separation, recover and purification in biotechnology. Recent advances and mathematical modeling. Edited by Asenjo J. A. and Hong J. American Chemical Society. Cap 7. 78-92.

30.- Quintero R.R. 1981. Procesos de separación y purificación. En Ingeniería bioquímica. Cap 8. 133-151.

31.- Scawen M. D. & Hammond P. M. 1989. Fractionation Techniques in Process Biotechnology. J. Chem. Tech. Biotechnology. vol 46 85-103.

32.- Shwu-Maan Lee. 1989. The primary stages of protein recovery. J. of Biotechnology. Vol 11. 103-118.

33.- Scopes R. K. 1978. Techniques for protein purification. In: Techniques in protein and enzyme biochemistry, B101 1-42.

34.- Thomson H. R. 1984. Recent developments in protein recovery and purification. J. Chem. Tech. Biotechnol 34B 190-198.