

Concentración

Separación y Procesos Biotecnológicos

Concentración

La última etapa en el proceso de recuperación de proteínas es la concentración del extracto, a esta altura del proceso el extracto contiene una mezcla del producto deseado con otros compuestos celulares solubles. Se debe reducir la masa o volumen al máximo eliminando agua, para ellos se utilizan a operaciones unitarias del tipo:

- Ultrafiltración
- Precipitación.
- Extracción
- Liofilización

PRECIPITACIÓN

Ha sido una de las técnicas más utilizadas para la concentración de proteínas.

Definición

Es una operación que permite la concentración de una solución mediante la adición de un "agente precipitante".

Características

- No producir desnaturalización del soluto de interés
- Tienden a proveer una mayor estabilidad al soluto de interés

Ventajas

- Operación fácil de escalar
- Puede utilizarse en forma continua
- Equipos sencillos
- Se dispone de muchos agentes precipitantes

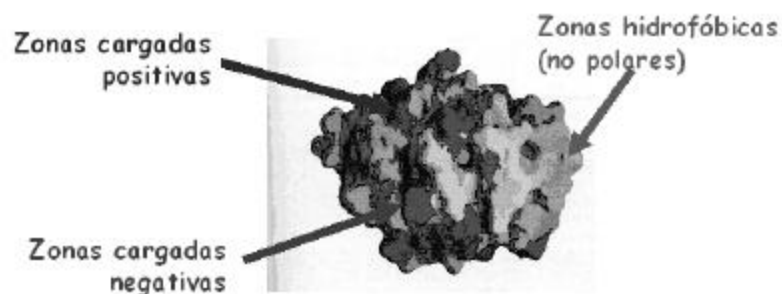
Tipos de precipitación

| Fundamento | Agentes |
|---|--|
| Disminución de la solubilidad Precipitación no selectiva | Sales : Sulfato de amonio , sulfato de sodio. pH : Trabajar en el pI de la proteína Solventes: Etanol, acetona Polímeros no iónicos : PEG |
| Precipitación selectiva por Afinidad | Formación de complejos por interacción de los sitios activos de las proteínas con ligandos específicos |
| Desnaturación selectiva Cambio en la conformación de las proteínas | pH Temperatura Solvente |

Estructura de las proteínas

La solubilidad depende de:

- Interacciones polares
- Interacciones hidrofóbicas entre las proteínas
- Fuerzas de repulsión electroestáticas



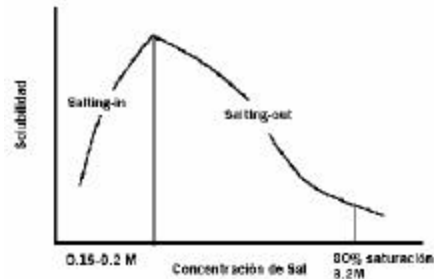
Precipitación No Selectiva

1. Precipitación con Sal

Es uno de las metodologías más utilizadas. Las sales que más se utilizan son el sulfato de amonio y el sulfato de sodio.

Las Curvas de solubilidad presentan dos zonas:

- Zona solubilización o "salting-in"
- Zona de precipitación o "salting-out"

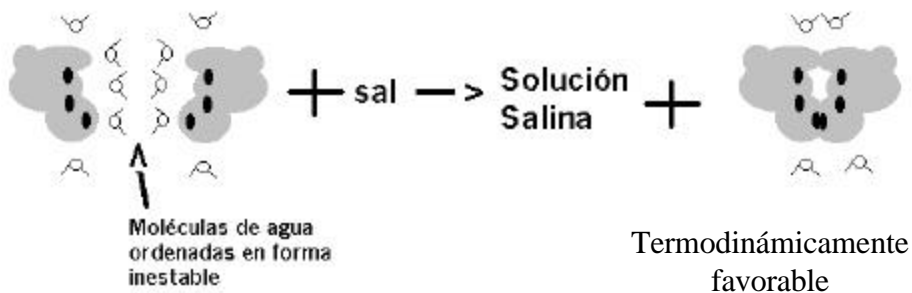


Todos estos procesos se realizan a temperaturas inferiores a 5°C

Mecanismo

La adición de sal elimina el agua que hidrata las proteínas, dejando las regiones hidrofóbicas en libertad de interactuar.

Las zonas hidrofóbicas tienden a interactuar entre sí, lo cual resulta termodinámicamente favorable, dado que produce un aumento de la entropía.



Al interactuar las proteínas están forman grandes estructuras las que sedimentan.

Las proteínas que presentan mayor hidrofobicidad son las que precipitan con menos sal.

Ecuación de diseño

Ecuación de Cohn

$$\log Sp = A - m [sal]$$

donde

Sp : Concentración de Proteína en Solución

[sal] : Concentración de Sal

A: Constante que depende del pH, T, pI

m: Constante que depende del tipo de sal y de la proteína

Ejemplo

100 litros de una solución que contiene 10 g/lit de BSA y 5 gr/lit de una proteína X se intentan separar por precipitación con sulfato de amonio.

El objetivo es recuperar el 90% de la BSA en el precipitado. Para ello se han determinado, con anterioridad, las solubilidades de cada una de estas proteínas en presencia de sulfato de amonio.

BSA $\ln S_{BSA} = 21.6 - 7.65 [\text{Sulfato de Amonio}]$

Proteína X $\ln S_x = 20.0 - 7.00 [\text{Sulfato de Amonio}]$

Donde

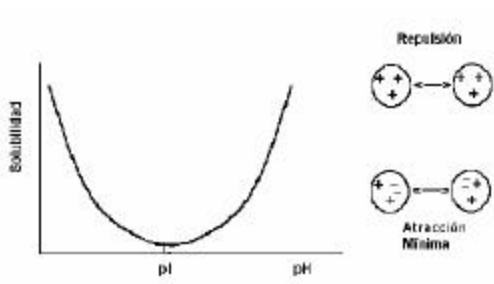
S (Solubilidad) se expresa en g/lit y [Sulfato de Amonio] en M

Asumiendo que la solubilidad es independiente de la presencia de otra proteína, determine la pureza con respecto al BSA en el precipitado .

Precipitación Isoeléctrica

Mecanismo

Las proteínas con carga se repelen, si se trabaja cerca del pI de las proteínas éstas presentan una carga mínima y no hay repulsión y tienden a una atracción mínima.



Los ácidos más utilizados son:

- Fosfórico
- Clorhídrico
- Sulfúrico

Precipitación por solventes a baja temperatura (-5°C)

Mecanismo

Similar al efecto de la sal, se desplaza el agua por los solventes.

Ecuación de diseño

Modelo empírico esta dado por la expresión:

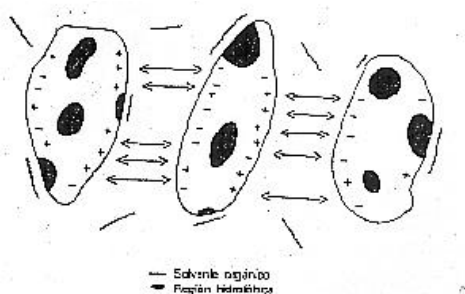
$$\log S = \log S_o + K/D_s^2$$

D_s : Constante Dieléctrica

S_o : Solubilidad en agua.

Selección del solvente

- Debe ser Seguro
- Miscible en agua
- No reaccionar con las proteínas



Precipitación por Polímero no iónico

Mecanismo

Modelo de Ogston (en base a la termodinámica)

Los polímeros reducen la cantidad efectiva de agua disponible para la solvatación de las proteínas.

Ecuación de diseño

La solubilidad se puede expresar:

$$\log S = X - a C$$

C: Concentración de polímero

a: Constante

Precipitación Selectiva

Precipitación Selectiva por Afinidad

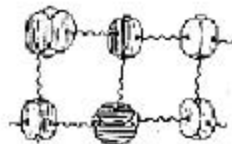
Precipitación selectiva de la proteína de interés, basándose en la capacidad que tiene la proteína para unirse a sitios activos

Afinidad a :

- Sustrato
- Inhibidores
- Anticuerpos
- Pseudoafinidad
 - Colorantes
 - Metales



a) Agregados en forma de cadenas constituido por un anticuerpo policlonal y una proteína monomérica



b) Agregado en forma de red producido por anticuerpo policlonales y una proteína tetramérica

Selección del polímero

- Polímero neutro
- Soluble en agua
- Cuidar que no produzca aumentos en la viscosidad, viscosidad moderada
- Concentración
 - Baja para proteínas de alto peso molecular
 - Alta para proteínas de bajo peso molecular

Ventajas

- Estabiliza las proteínas (Interacción proteína-polímero)
- Se puede trabajar a temperatura ambiente.
- El polímero se puede separar por intercambio iónico
(¿ Por qué?)

3.- Precipitación por Desnaturación selectiva

Principio

Se desnaturalan los contaminantes por condiciones extremas de pH, T^a o solventes orgánicos.

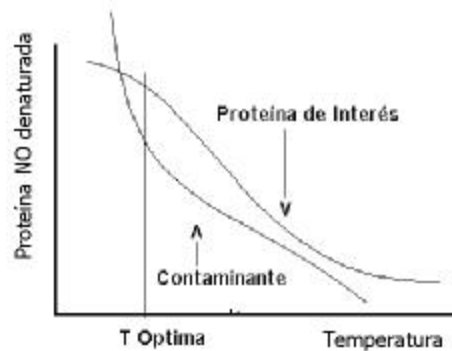
Las proteína contaminantes

- 1.- Se despliega, quedando mucha zonas expuestas
- 2.- Dichas zonas interactúan
- 3.- Luego las proteínas contaminantes precipitan, mientras que la proteína de interés se mantiene en solución.

Desnaturación por Temperatura

Teoría

Hay proteínas que son estables a altas temperaturas, mientras que otras no.



La cinética de desnaturalización tiene la forma:

$$\frac{d[P]}{dt} = -k[P] = -k_0 e^{\left(\frac{-\Delta E}{RT}\right)} [P]$$

donde [P]: Conc. de proteína disuelta

k : Constante, f(temperatura)

Procedimiento

- Calentamiento y luego enfriamiento

En presencia de sulfato de amonio para estabilizar las proteínas e inhibir las proteasas

Ejemplo

Cinética de desnaturalización.

La desnaturación de una proteína tiene una energía de activación de 400.000 J/mol. Cuando esta proteína se mantiene a 50°C por un lapso de 10 minutos se desnatura en un 50%.

- a) Calcule la constante de la velocidad específica de desnaturalización.
- b) Calcule la temperatura a la cual la proteína sólo se desnatura el 10% en 10 min.

Desnaturación por pH extremo

Causas

- Formación de regiones con igual carga que se repelen.
- Rompimiento de las fuerzas de atracción que dan la conformación a las proteínas.

Desnaturación por solvente

Agentes orgánicos alteran las características superficiales de las proteínas, lo cual produce su desnaturalización y posterior interacción entre las zonas expuestas.

Se pueden utilizar solventes como

- Etanol
- Acetona
- Cloroformo

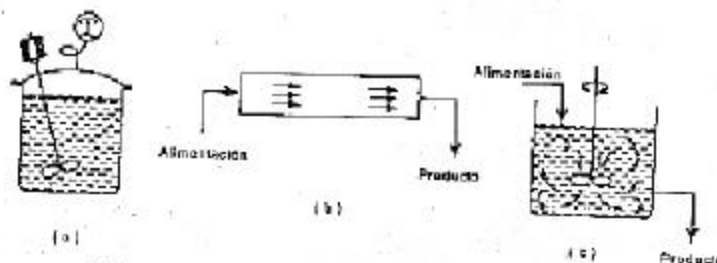
Condiciones

- Temperaturas entre 20-30°C, acelera el proceso y permite el ahorro de solvente
- Se debe estudiar el efecto de
 - pH
 - Otros agentes .

EQUIPOS DE PRECIPITACION

Se trata esencialmente de reactores, que pueden operar en forma:

- a) Batch
- b) Continua Flujo Pistón
- c) Continua Perfectamente Agitada



Etapas principales en un proceso de precipitación

Cualquiera de ellas puede ser la limitante.

1. Mezclado Inicial: La solución proteica se mezcla con el agente precipitante para eliminar las barreras de transferencia de masa.
2. Nucleación: Al disminuir la solubilidad de la proteína se inicia la precipitación al formarse en el seno de la solución pequeñas partículas o núcleos.
3. Crecimiento Pericinético o Crecimiento Limitado por difusión: En esta fase los núcleos van creciendo conforme la proteína difunde desde el seno de la solución hasta los núcleos. La frecuencia de las colisiones está limitada por la velocidad de difusión de las moléculas y no por el mezclado. Se forman partículas primarias de 0.1 – 10 μm .

-

4.- Crecimiento Ortocinético (Influenciado por el flujo): El mezclado favorece el crecimiento del agregado formándose partículas en el rango entre 1-100 μm .

5.- Flocculación: Los agregados forman los grandes floculos.

Parámetros fundamentales a considerar:

- Velocidad de agitación
- Fuerza iónica