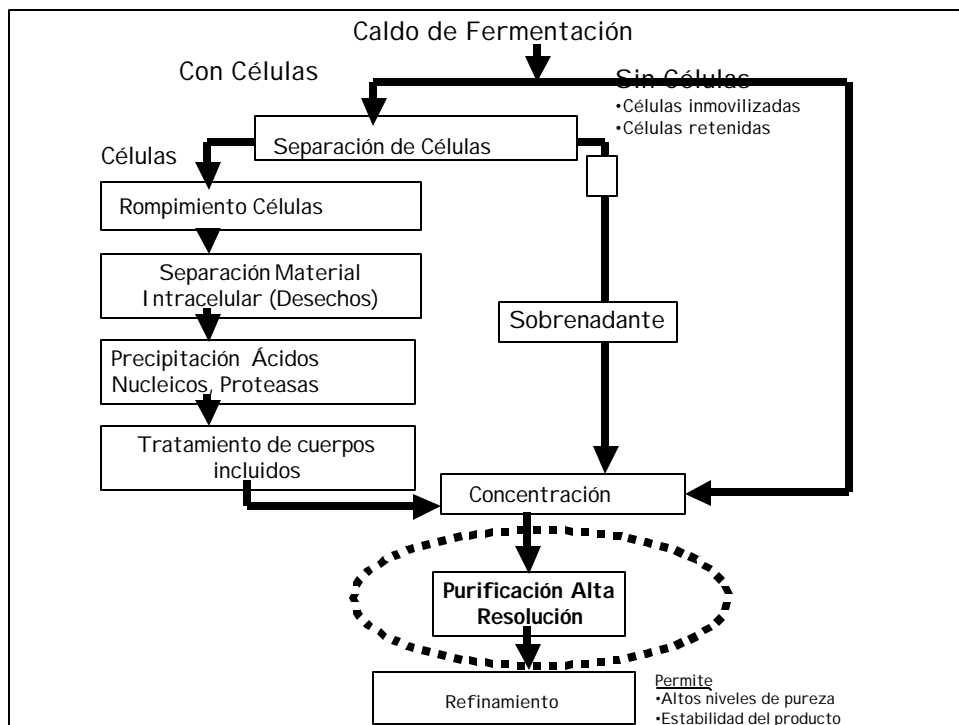


# Purificación

## Separación y Procesos Biotecnológicos



## Purificación de Proteínas

- Cromatografía (Industrial)
  - No Adsorción
  - Adsorción
- Electroforesis (Laboratorio)

### Cromatografía

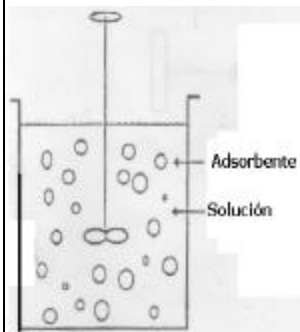
**Adsorción:** Fenómeno de superficie reversible donde un **Soluto (Proteína)** se concentra en la superficie de un **Sólido (Matriz)** por acción de **fuerzas intermoleculares** entre el soluto y el sólido

**Capacidad:** Cantidad de proteína que puede ser purificada en una cromatografía

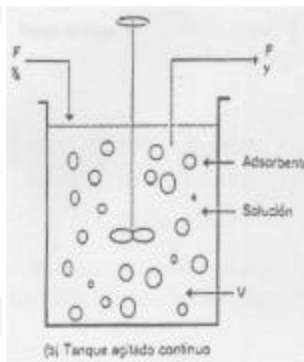
**Velocidad:** indica el **flujo** que puede ser tratado en la cromatografía

Forma de Operación:

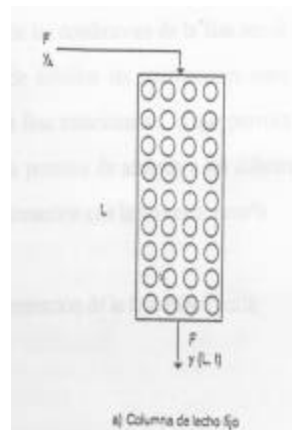
- 1.-Batch
- 2.-Continua
  - Tanque Agitado en forma continua
  - Lecho fijo (Columnas, más común)
  - Lecho Expandido (Nuevo)



Adsorción Batch

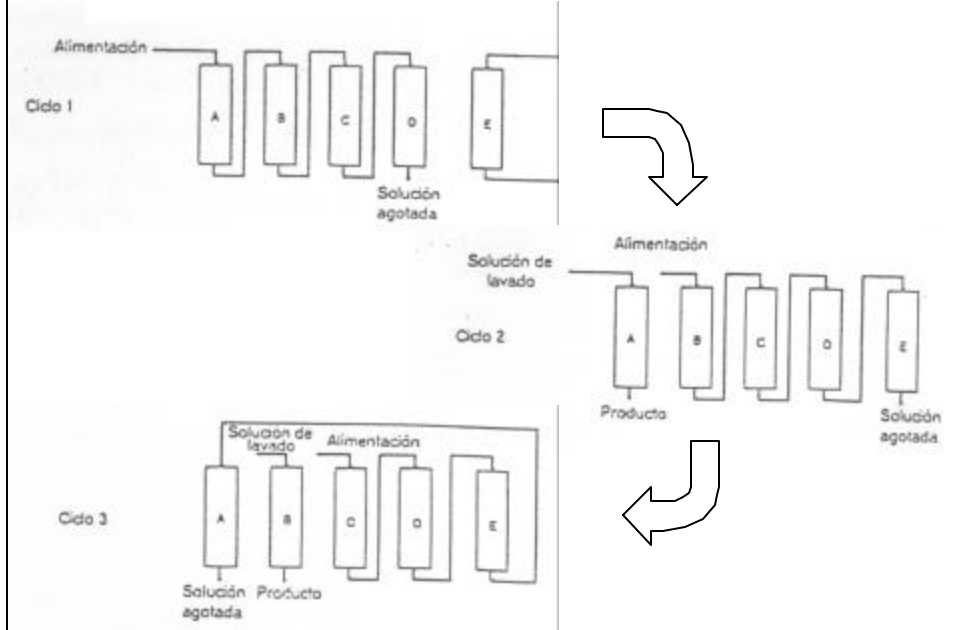


(b) Tanque agitado continuo

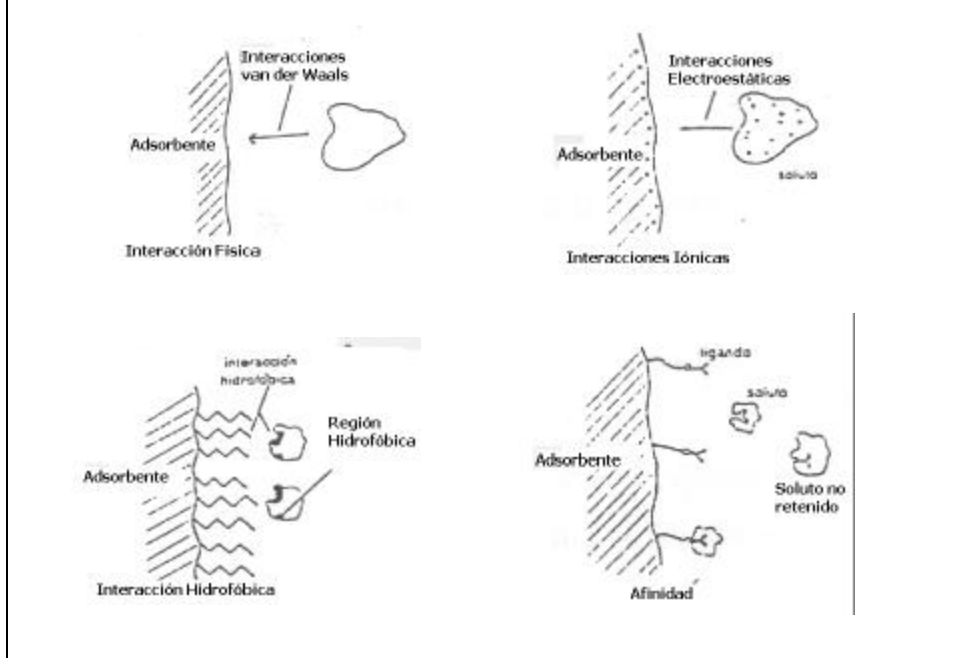


(c) Columna de lecho fijo

## Forma de Operación de las columnas Carrusel



## Tipos de adsorción

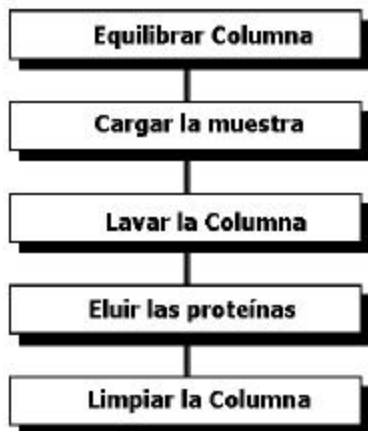


**Tipos de Operaciones Cromatográficas utilizadas en la Purificación de Proteínas**

| <b>Tipo de Cromatografía</b>                            | <b>Propiedad Físicoquímica o Bioquímica</b>      | <b>Características</b>  |
|---|--|---|
| <b>NO ADSORCION</b>                                     |  |   |
| <b>Filtración por Geles (GF) o Exclusión por Tamaño</b> | <b>Peso Molecular</b>                            | <b>Resolución: Moderada<br/>Capacidad: Baja<br/>Velocidad: Baja</b>         |
| <b>ADSORCION</b>  |  |   |
| <b>Afinidad (AC)</b>                                    | <b>Afinidad Biológica</b>                        | <b>Resolución: Excelente<br/>Capacidad: Alta<br/>Velocidad: Alta</b>        |
| <b>Intercambio Iónico (IEC) (Aniónico Catiónico)</b>    | <b>Carga a diferentes pH</b>                     | <b>Resolución: Alta<br/>Capacidad: Alta<br/>Velocidad: Alta</b>             |
| <b>Cromatofocusing</b>                                  | <b>Punto Isoeléctrico</b>                        | <b>Resolución: Muy Alta<br/>Capacidad: Muy Alta<br/>Velocidad: Alta</b>     |
| <b>Interacción Hidrofóbica (HIC)</b>                    | <b>Hidrofobicidad Superficial</b>                | <b>Resolución: Alta<br/>Capacidad: Alta<br/>Velocidad: Alta</b>             |
| <b>Fase Reversa (RPC)</b>                               | <b>Interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas</b> | <b>Resolución: Excelente<br/>Capacidad: Intermedia<br/>Velocidad : Alta</b> |

## Procesos de Adsorción

## Pasos de un proceso de Adsorción



**Paso 5** Regeneración de la fase estacionaria.

**Paso 1** Acondicionamiento de la matriz, que se logra ajustando el pH o la fuerza iónica.

**Paso 2** Aplicación y adsorción de la muestra, la cual se adsorbe en la fase estacionaria.

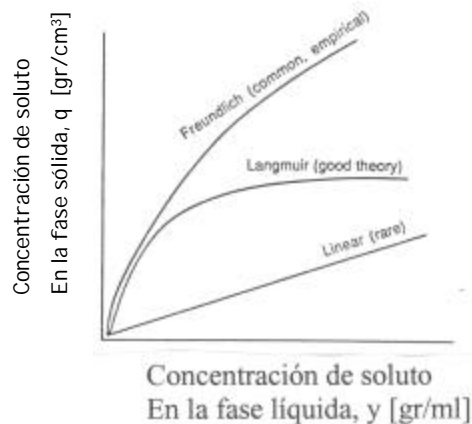
**Paso 3** Lavar la columna para que salgan todas las proteínas que no han sido retenidas.

**Paso 4** Modificación de las condiciones de la fase móvil de tal manera de debilitar las interacciones entre la proteína y la fase estacionarias, lo que provoca la elución de la proteína de acuerdo a los diferentes grados de interacción con la fase estacionaria.

## Proceso de Adsorción

### Isotermas de Adsorción

Las isotermas de adsorción muestran las características en el estado de equilibrio entre la concentración de soluto en la fase sólida ( $q$ ) y la fase líquida ( $y$ )



### Diferentes tipos de Isotermas

| Tipo de Isoterma | Concentración de Solutos adsorbido | Comentarios   |
|------------------|------------------------------------|---|
| Lineal           | $q = K_L y$                        | Es la menos común y se aplica a bajas concentraciones de proteína<br>Es la que más se aplica                                |
| Freundlich       | $q = K_F y^n$                      | Si $n < 1$ Se tiene una adsorción favorable<br>Si $n > 1$ se tiene una adsorción desfavorable<br>Tiene fundamentos teóricos |
| Langmuir         | $q = \frac{(q_o - y)}{(K + y)}$    | $q_o$ es la concentración máxima que puede ser adsorbida por el sólido.<br>Es la única que posee fundamentos teóricos.      |

### Isoterma de Langmuir

La isoterma de Langmuir representa el estado de equilibrio del soluto entre la fase líquida y la sólida. Para ello considera una especie de reacción química entre el soluto y los sitios activos del adsorbente.

Absorción →



Desorción ←

Donde

S: sitios activos vacantes en el adsorbente

S-P: sitios activos ocupados en el adsorbente

ST: Sitios activos totales

Y: Solutos en solución

La constante de desorción,  $K'$ , es: 
$$K' = \frac{[Y][S]}{[S-P]}$$

Los sitios totales, ST se pueden expresar como:

$$[ST] = [S] + [S-P]$$

Luego, los sitios vacantes se pueden despejar en función de los sitios totales y los ocupados.

$$[S] = [ST] - [S-P]$$

De allí que se puede re-escribir la constante de desorción:

$$K' = \frac{[Y] \cdot ([ST] - [S - P])}{[S - P]}$$

Despejando los "sitios ocupados":

$$[S - P] = \frac{[ST][Y]}{K' + [Y]}$$

Si se considera que los "sitios ocupados" son proporcionales a la concentración soluto adsorbido:

$$[S-P] = \text{cte} \cdot q$$

Si los "sitios totales", son proporcionales a la concentración de soluto máximo a ser adsorbido,  $q_0$

$$[ST] = \text{cte} \cdot q_0$$

Se tiene la ecuación de la isoterma de Langmuir

$$q = \frac{q_0 \cdot y}{K + y}$$

Donde

y: concentración de soluto en solución

q: Concentración de soluto en la fase sólida

### Problema 1

Una enzima quitinasa puede ser adsorbida en celulosa.

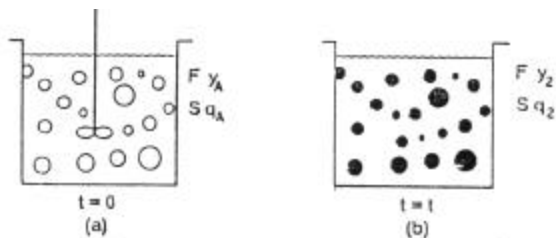
La adsorción sigue una isoterma de Langmuir. La máxima cantidad de enzima que puede ser adsorbida es de  $70 \text{ mg/cm}^3$  de celulosa. Cuando la concentración de quitinasa en solución es de  $50 \text{ mg/l}$  la cantidad de proteína adsorbida en la matriz es la mitad de la cantidad máxima que se puede adsorber

Determine la ecuación de la isoterma que rige este proceso de adsorción.

## Adsorción en Batch

Consiste en dejar que el soluto sea adsorbido en el adsorbente hasta que se llegue al equilibrio.

La cantidad de soluto adsorbido dependerá de la cantidad de adsorbente, la cantidad de solución y la concentración inicial de soluto en la solución y en el adsorbente.



Donde

$y_A, y_2$  Concentración de soluto en la solución al inicio y al final de la adsorción

$q_A, q_2$  Concentración de soluto en la fase sólida al inicio y al final de la adsorción

$F$ : Volumen de solución

$S$ : Volumen de adsorbente



### Diseño de un proceso de Adsorción

Depende del tipo de equilibrio  
(Suponiendo un tipo Freundlich)

#### Línea de Equilibrio

$$q = K y^n$$

#### Balance de Masa de Solute

Masa Inicial = Masa Final

$$F y_A + q_A S = y_2 F + q_2 S$$

#### Línea de Operación

$$q_2 = q_A + (F / S) * (y_A - y_2)$$

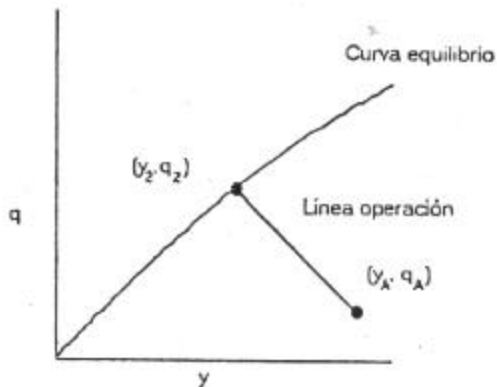
Donde

$y_A, y_2$  Concentración de soluto en la solución al inicio y al final de la adsorción

$q_A, q_2$  Concentración de soluto en la fase sólida al inicio y al final de la adsorción

F: Volumen de solución

S: Volumen de adsorbente



### Problema 1

Una enzima quitinasa puede ser adsorbida en celulosa.

La adsorción sigue una isoterma de Langmuir. La máxima cantidad de enzima que puede ser adsorbida es de 70 mg/ cm<sup>3</sup> de celulosa. Cuando la concentración de quitinasa en solución es de 50 mg/lit la cantidad de proteína adsorbida en la matriz es la mitad de la cantidad máxima que se puede adsorber.

Si se tiene 1.5 litros de solución con una concentración de 220 mg/l de proteína y se requiere adsorber el 90% de ella, determine la masa de celulosa que se necesita.

¿Se podría adsorber el 100% de la proteína?

### Problema 2

Se tiene que la adsorción de una gentamicina en carbón activado está descrita por una isoterma:

$$q = 35.1 y^{0.41}$$

donde

q en [mg/cm<sup>3</sup>], y [mg/ml]

Se planea adicionar 10 cm<sup>3</sup> de carbón no utilizado a 3.0 litros de un caldo de fermentación que tiene una concentración de antibiótico de 46 [mg/litro]

¿Qué porcentaje se puede esperar que se adsorba?

## Adsorción en lecho fijo

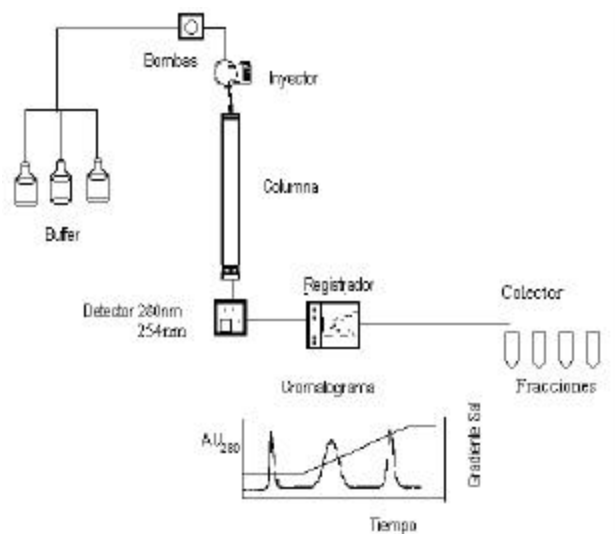
### Cromatografía de Lecho Fijo

Es la técnica más utilizada a escala industrial para la purificación de proteínas, debido principalmente a presentar la mayor área de adsorción por unidad de volumen.

Consiste en una columna o tubo vertical relleno con partículas de adsorbente.



### Esquema de una Cromatografía en Lecho Fijo



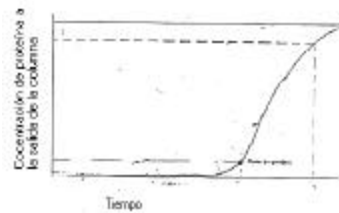
Las cromatografías en Lecho Fijo son procesos no estacionarios.

El líquido que contiene el soluto se hace pasar a través del lecho y la carga o cantidad de producto retenido va aumentando en el tiempo.

Se pueden llevar a cabo de dos formas:

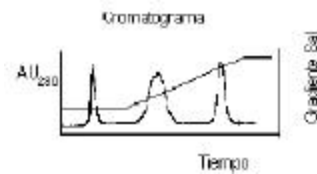
#### Análisis Frontal:

Se alimenta constantemente la columna hasta que se satura, se utiliza para caracterizar la capacidad de la columna.



#### Cromatografía de Elución

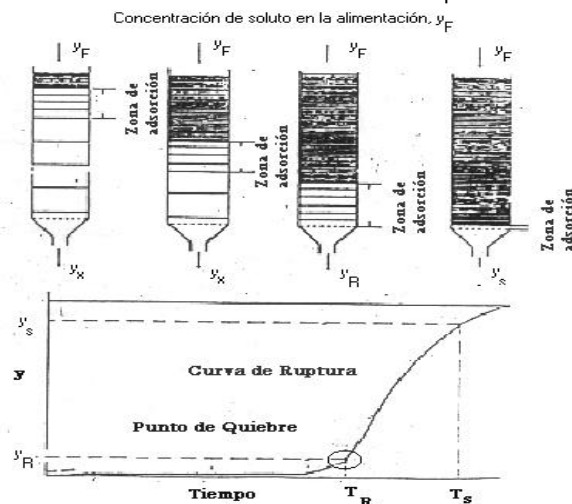
Se inyecta una muestra y luego se aplican condiciones que las proteínas eluyan en forma diferencial.



#### Análisis Frontal

##### Curva de Ruptura ( Breakthrough curve)

Se alimenta constantemente la columna hasta que se satura.

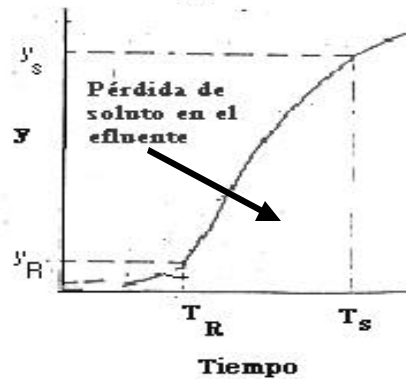


$t_R$  : Tiempo de quiebre donde se empieza a saturar la columna

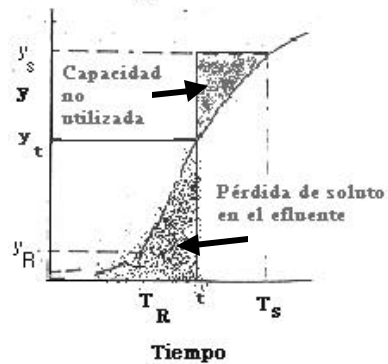
$t_S$  : Tiempo cuando la columna está completamente saturada y es completamente ineficiente.

Se utiliza para caracterizar la capacidad de la columna. Dado que la forma de la curva influye fuertemente el diseño y operación de la columna.

El área bajo la curva es la cantidad de soluto que se ha perdido en el efluente, luego se hace necesario detener el proceso antes que el lecho quede completamente saturado.



Esto produce el inconvenientes que se desaprovecha una parte de la capacidad del lecho.



La predicción de la curva, permite diseñar columnas para:

- Alcanzar cierto grado de recuperación
- Estimar pérdidas
- Dimensionar la columna, así se determina la cantidad de resina y el tiempo requerido para la adsorción de una cantidad determinada de soluto.

Se pueden plantear un modelo de adsorción para predecir la "curva de ruptura" o "breakthrough curve" basado en :

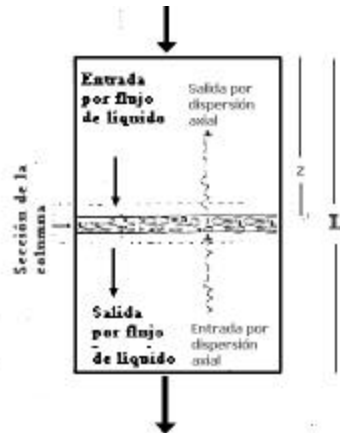
### Balances de masa del soluto en una sección

#### En estado no estacionario

i) Términos de acumulación tanto en el adsorbente como en los intersticios

ii) Flujos de entrada y salida por Dispersión Axial

iii) Flujo de entrada y salida por Convección



$$\{ \text{Masa que entra} \} - \{ \text{Masa que sale} \} + \{ \text{Masa generada} \} - \{ \text{Masa Consumida} \} = \{ \text{Masa Acumulada} \}$$

Simplificaciones

No hay ni generación, ni consumo de soluto.

$$\{ \text{Masa que entra} \} - \{ \text{Masa que sale} \} = \{ \text{Masa Acumulada} \}$$

El Balance se expresa como

$$D_{AZ} \frac{\partial^2 y}{\partial z^2} + u \frac{\partial y}{\partial z} = \frac{\partial y}{\partial t} + \left( \frac{1-e}{e} \right) \frac{\partial q}{\partial t}$$

**Dispersión axial + Flujo = Acumulación intersticios+ Acumulación por adsorción**

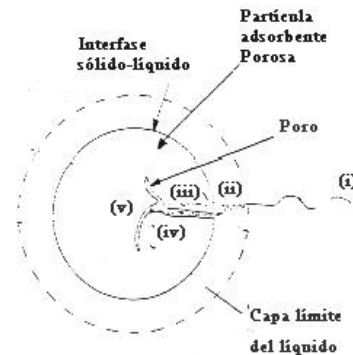
donde  $D_{AZ}$ : Coeficiente efectivo de dispersión axial  
 $u$  : Velocidad superficial del fluido ( $u = Q/Ac \cdot e$ )  
 $e$ : Fracción de huecos ( $e = (Vt - Vs) / Vt$ )  
 $Vt$ : Volumen Total de la columna  
 $Vs$ : Volumen de resina  
 $Ac$ : Area transversal de la columna

### Condiciones de equilibrio (tipo de isoterma)

|             |                         |
|-------------|-------------------------|
| •Linear     | $q = K_L y$             |
| •Langmuir   | $q = K_F y^n$           |
| •Freundlich | $q = (q_0 y) / (K + y)$ |

### Cinética de adsorción, la cual puede estar controlada por:

- (i) Transferencia desde el seno del líquido hasta la capa límite que rodea a la partícula.
- (ii) Difusión en el film que rodea la partícula.
- (iii) Transferencia a través del líquido que existe en los poros de la partícula hacia las superficies internas.
- (iv) Proceso de adsorción
- (v) Difusión a lo largo de la superficie de los poros internos.



Si la controlante es la Difusión en el film

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \frac{K_L a}{(1 - e)} (y - y^*)$$

Donde  $K_L$ : Coeficiente de transferencia de masa

$a$ : Área de adsorbente por unidad de volumen de lecho

$y^*$  Concentración hipotética de soluto en el líquido en equilibrio con la concentración de soluto en el adsorbente.

La etapa Controlante puede variar según la escala del proceso

**Sistema de ecuaciones resulta difícil de resolver, se suelen utilizar métodos numéricos.**