

PROCESOS DE SEPARACION

Resumen: El procesamiento posterior de productos bioquímicos requiere la recuperación de una mezcla compleja de moléculas, impurezas y contaminantes mediante el uso de operaciones unitarias. Cada operación unitaria provocará un cambio físico que alterará la concentración del producto y/o el grado de pureza. Generalmente, son necesarias varias operaciones unitarias en serie para afectar las especificaciones del producto.

El programa de concentración y purificación posterior es una parte integral del proceso de producción y contribuye de manera muy significativa a los costos generales del proceso. La contribución real del programa de purificación posterior a la complejidad y el costo de todo el proceso depende de la naturaleza del producto y su concentración en el reactor en el momento de la cosecha. Los productos especiales diluidos normalmente incurren en altos costos de purificación que pueden oscilar entre el 50% y el 90% de los costos totales de producción.

Los productos biotecnológicos se dividen en tres grandes sectores:

Sector I: alta concentración al final de la etapa de producción y tienen un precio de mercado bajo: commodities: levadura de panadería, bebidas alcohólicas, alimentos fermentados, queso, yogurt, etc.

Sector II: alto rendimiento y alto costo de purificación (30 al 70 % del costo total) algunos antibióticos, enzimas y anticuerpos monoclonales.

Sector III: Baja concentración en la etapa de producción y muy alto precio de venta: insulina, factores de coagulación y otros. El costo de purificación representa el 20 % del total, ya que llevan un costo de investigación y desarrollo muy alto.

Los productos que se producen en bajas concentraciones, como las vitaminas (por ejemplo, vitamina B12, unos pocos mg/L) requieren el procesamiento de grandes volúmenes por masa de producto, por lo que se necesitan grandes equipos de proceso para la purificación, con costos de capital y operativos concomitantemente altos. Las bajas concentraciones también significan que se necesitan más pasos de recuperación, con las consiguientes pérdidas acumulativas. Además, el procesamiento de productos especiales puede requerir un procesamiento costoso en equipos dedicados, por ejemplo, cromatografía, para alcanzar el nivel de purificación requerido. Muchos de estos productos especiales son lábiles, por lo que la gama de operaciones de purificación es limitada y las opciones menos costosas pueden no ser adecuadas.

Es responsabilidad del ingeniero de bioprocesos instalar y configurar una serie adecuada de operaciones unitarias de separación, recuperación, concentración y purificación para cumplir con las especificaciones del producto. Esto requiere, en primera instancia, una comprensión profunda de los mecanismos que sustentan la función de cada una de las operaciones unitarias. Además, requiere conocimiento de las propiedades químicas y físicas del producto para poder realizar una elección informada de las operaciones unitarias que mejor aprovechan estas propiedades físicas para afectar la concentración y/o la purificación. Finalmente, es necesaria una apreciación de la aplicación del producto final para poder elegir juiciosamente entre diferentes opciones de operación de la unidad. Por ejemplo, una proteína que se va a utilizar como biocatalizador deberá conservar su actividad biológica y operaciones unitarias que requieren temperaturas y valores de pH que desnaturalizarían la enzima e inutilizarían el producto. En general, el ingeniero de bioprocesos necesita diseñar un programa de recuperación que pueda cumplir con las especificaciones del producto en la menor cantidad de pasos posible. Esto no sólo reduce el capital de procesamiento posterior y los costos

operativos, sino que, lo que es más importante, reduce las pérdidas de producto que se acumulan en cada paso.

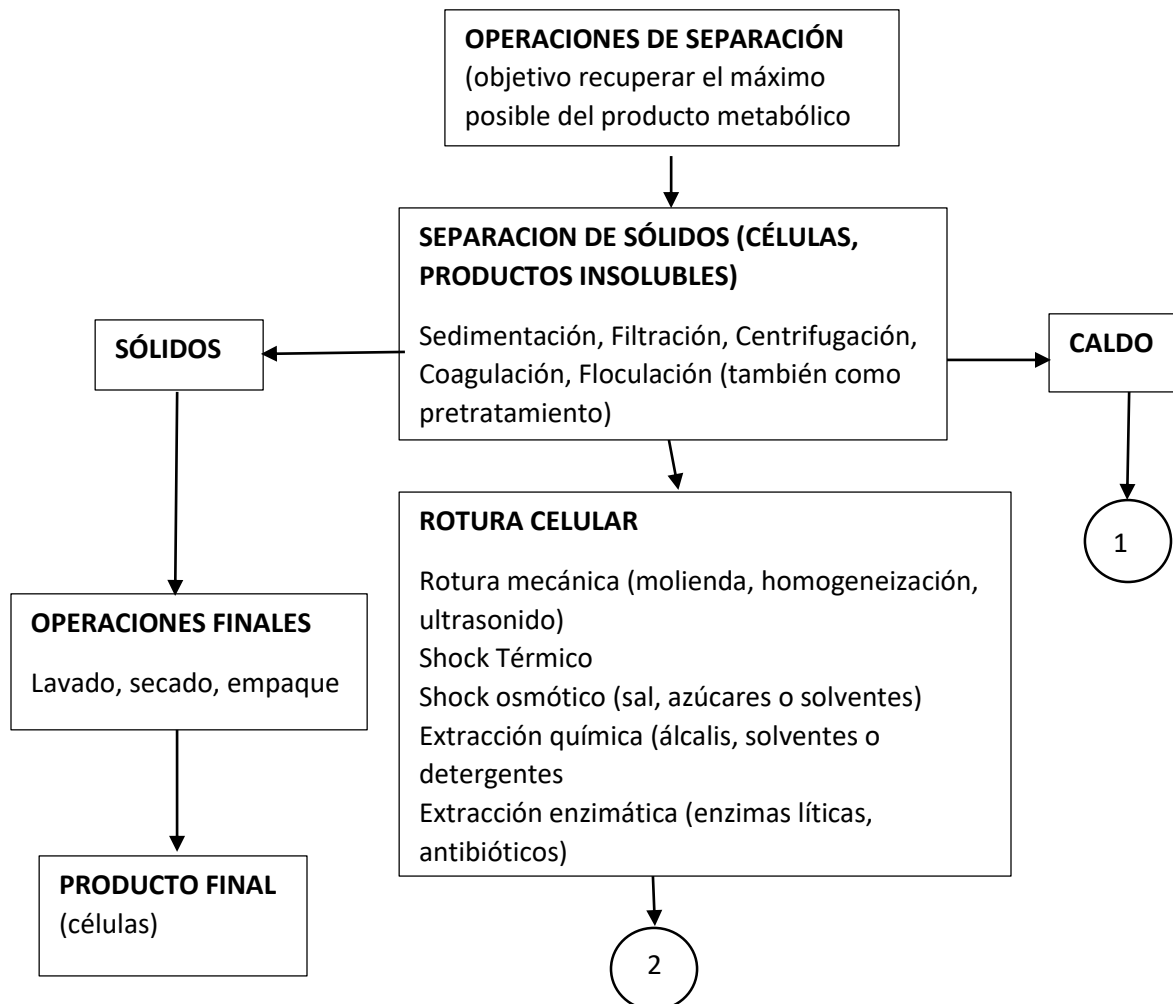
Palabras clave: separación sólido-sólido, desintegración celular, precipitación, separación por membranas, extracción líquida, cromatografía, electroforesis.

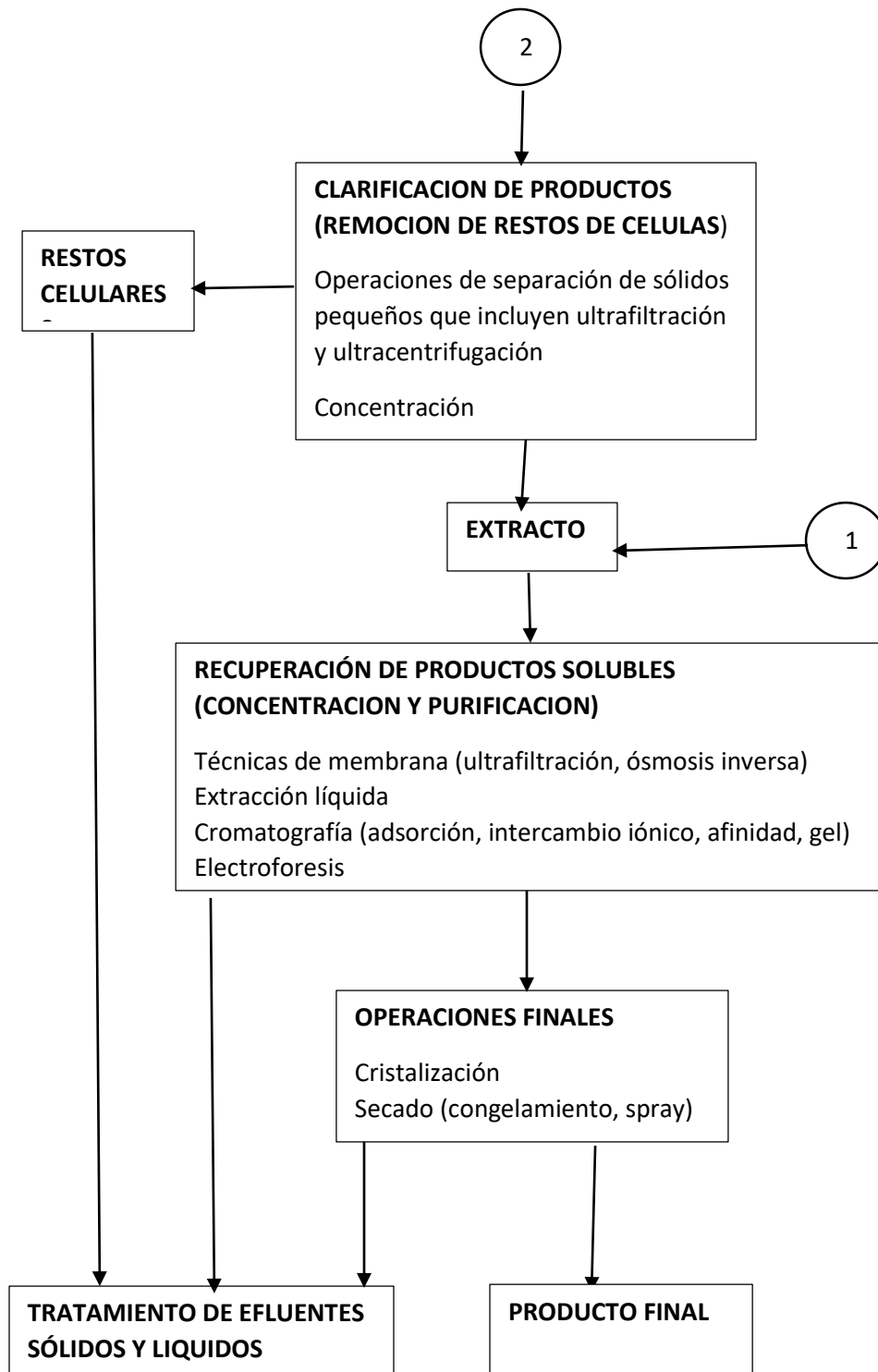
10.1 Descripción general de posibles operaciones de recuperación

Las operaciones unitarias que se utilizan para la recuperación de bioproductos incluyen aquellas que facilitan la desintegración de sólidos, la separación y recuperación de sólidos y líquidos, la recuperación de moléculas solubles y las denominadas operaciones de acabado que incluyen procesos como el secado y la cristalización.

Pero antes que nada se debe realizar la producción con materias primas adecuadas para no generar una serie de operaciones de separación extremadamente complicadas. Por ejemplo en algún tiempo se propuso utilizar residuos de la agroindustria para obtener productos tales como enzimas, tal como pectinasa a partir de orujo de manzana, pero la etapas de separación y purificación resultaban extremadamente costosas y era más económico producir la enzima a partir de azúcares y pectina como iniciador de la producción.

Cada uno de estos se describe y evalúa con referencia a la descripción general de los posibles pasos de recuperación como se describe en la Figura 10.1.





La primera consideración en un programa de recuperación es, sin duda, optimizar el rendimiento del producto en el proceso anterior.

Una alta concentración de producto que ingresa al programa de recuperación reduce el número y el tamaño de las operaciones de procesamiento posteriores y los costos de recuperación asociados.

El primer paso físico en el proceso de recuperación es separar las células y el líquido extracelular (Sección 10.2) para que la corriente relevante pueda procesarse para la recuperación del producto. Los pasos posteriores del programa diferirán dependiendo de si la corriente sólida o líquida ingresa al proceso.

Si el producto se solubiliza en la corriente líquida, la recuperación de la corriente líquida se lleva a cabo mediante operaciones unitarias diseñadas para concentrar y purificar una molécula soluble (Sección 10.4). Es aconsejable realizar primero aquellas operaciones unitarias que proporcionen cierto grado de concentración para que las etapas de purificación posteriores puedan llevarse a cabo con menos material.

Esto es especialmente importante durante la recuperación de biomoléculas especializadas que requieren equipos costosos (por ejemplo, ciertos tipos de cromatografía) para cumplir con las especificaciones de alta pureza.

Para un producto que está asociado con la corriente sólida, ya sea dentro del citoplasma o adhiriéndose a la superficie celular, se deben realizar operaciones iniciales para extraer el producto antes de que pueda tener lugar la purificación. Esto requiere la desintegración de la célula y la posterior separación del extracto celular de los restos celulares (Sección 10.3). Luego, el extracto celular ingresa a uno o más de los procesos diseñados para concentrar y purificar una molécula soluble (Sección 11.4). Por supuesto, si el producto son las propias células (p. ej. *S. cerevisiae* y *S. carlsbergensis* destinados a la industria de alimentos y bebidas), sólo se requieren operaciones de acabado como secado.

10.2 Separación de células y líquido extracelular.

La separación de las células y el líquido extracelular se puede llevar a cabo mediante una de varias operaciones estándar de separación sólido-líquido, siendo las más comunes la filtración y la centrifugación con sedimentación por gravedad que generalmente se usa solo en el tratamiento de aguas residuales. La elección entre filtración y centrifugación depende de las propiedades de las células y del fluido. Las propiedades de los sólidos que influyen en esta decisión incluyen el diámetro de las partículas, la densidad y la resistencia mecánica, mientras que las propiedades del fluido que ejercen las principales influencias son la viscosidad y la densidad.

La filtración se utiliza ampliamente en la industria de bioprocesos, y tanto la filtración por lotes como la filtración continua encuentran varias aplicaciones. La filtración continua se practica con separación de células a gran escala, como en la producción de *Saccharomyces* spp., generalmente con el filtro de tambor de vacío. Consiste en un tambor que gira en una cubeta de suspensión celular y que, bajo condiciones de presión constante (vacío), atrae las células hacia la superficie del tambor. De esta manera, se forma una torta de células en la superficie del tambor cuando sale del canal. La torta de filtración se retira mediante una cuchilla o una cadena para su posterior procesamiento o descarte, según corresponda.

También se practica la filtración por lotes, pero para operaciones a menor escala, siendo la prensa de cámara la opción habitual para filtrar. Este filtro prensa consta de una serie de cámaras separadas por placas de filtro, unidas entre sí en un marco. La suspensión de células se introduce en las cámaras bajo presión y las células se depositan como una torta de filtración sobre el medio filtrante a medida que el filtrado pasa a través del filtro prensa. La filtración por lotes se puede realizar bajo presión constante (en cuyo caso la tasa de filtración disminuye con el tiempo), tasa de filtración constante (en cuyo caso la presión aumenta con el tiempo) o presión variable y tasa variable.

La eficiencia de filtración de una torta de filtración incompresible depende del área de filtración (A), de la resistencia específica de la torta (r_c), la caída de presión a través del medio filtrante y el filtro torta (ΔP), y la viscosidad del fluido (μ). La tasa de filtración (dV/dt) se puede predecir a partir del Carman-Kozeny ecuación que relaciona esta tasa con la caída de presión a través el medio filtrante y la torta (Ecuación 10.1), donde L es el espesor de la torta equivalente a la resistencia del medio.

$$\frac{1}{A} \frac{dV}{dt} = \frac{\Delta P}{r_c \mu (1 + L)} \quad [10.1]$$

El tiempo necesario para entregar un cierto volumen de filtrado (V) bajo presión constante o condiciones de velocidad constante se obtiene mediante la integración de la Ecuación 10.1. La integración con ΔP constante produce la Ecuación 10.2 (esto se aplica tanto a la operación por lotes como a la continua), mientras que la integración con constante produce la Ecuación 10.3. Estas expresiones permiten para el cálculo de, por ejemplo, el tiempo de filtración para un volumen determinado, para cada modo de funcionamiento.

$$\frac{t}{V} = \frac{r_c \mu V}{2A^2 \Delta P} + \frac{r_c \mu L}{A \Delta P} \quad [10.2]$$

$$\frac{V}{t} = \frac{A \Delta P}{r_c \mu (1 + L)} \quad [10.3]$$

Cuando se opera en condiciones donde la presión varía, la torta de filtración puede comprimirse a medida que aumenta la presión. La compresibilidad es un problema importante que conduce a una disminución de la formación de huecos y un aumento correspondiente en la resistencia específica de la torta, con un aumento concomitante en la caída de presión y una tasa de filtración reducida. Se ha determinado empíricamente que la dependencia de la resistencia específica de la torta sigue una función de potencia (Ecuación 10.4) donde r_0 y s son constantes experimentales.

$$r_c = r_0 (\Delta P)^s \quad [10.4]$$

A pesar del amplio uso de la filtración como medio para separar células en la industria de bioprocesos, sería prudente evitar en gran medida esta operación para la separación de procariotas porque los sólidos con diámetros tan pequeños tienden a dar como resultado la formación de una torta de filtración comprimible. Las células con baja resistencia mecánica también tienden a ser comprimibles y probablemente no sean adecuadas para la separación por filtración por la misma razón.

Además, tampoco se debe considerar la filtración para la separación de células con capas de lodo, lo que reduce la tasa de filtración esencialmente por el bloqueo de los poros, a menos que la recolección pueda llevarse a cabo antes de que se haya formado la capa de lodo. Un ejemplo interesante de esto es la exitosa separación del micelio de *Penicillium* por filtración durante la producción de penicilina; los micelios simplemente se cosechan antes del inicio de la acumulación de limo.

Hasta cierto punto, el efecto de la compresibilidad se puede superar con el uso de un auxiliar de filtración. Los auxiliares de filtración previenen el bloqueo de los poros del medio filtrante y mejoran

la porosidad de la torta, pero contaminan el producto sólido, por lo que no pueden usarse en procesos donde el producto está asociado con las células.

Para la mayoría de los procariotas y las células que por otras razones tenderían a formar una torta comprimible, la centrifugación sigue siendo la operación de separación preferida siempre que la diferencia de densidad entre el microorganismo y el fluido es suficiente. Esto no quiere decir que la centrifugación sólo se utilice para procariotas. De hecho, se puede utilizar para partículas de 0,1 a 100 µm de diámetro y se utiliza especialmente para levadura, especialmente cuando se desea una crema de levadura concentrada.

Las centrífugas funcionan de forma continua para separar las células del líquido mediante la fuerza centrífuga. En la práctica, las centrífugas comprenden un recipiente tubular o un recipiente con pila de discos en el que las células se granulan hacia el fondo del recipiente y el líquido se retira de la parte superior del recipiente.

La centrifugación también tiene la ventaja de que puede utilizarse si se requiere una separación aséptica, lo que no es posible con la separación por filtración.

La eficiencia de la centrifugación depende de la diferencia de densidad entre el sólido (ρ_s) y el líquido (ρ_l), la viscosidad dinámica (η), el diámetro de la partícula (ϕ_p), la velocidad angular (ω) y el radio (r). La velocidad de sedimentación en un campo centrífugo (v) se describe en la Ecuación 10.5.

$$v = \frac{\phi_p^2(\rho_s - \rho_l)r\omega^2}{18\eta} \quad [10.5]$$

Por otro lado, la separación por gravedad en lugar de por fuerza centrífuga (sedimentación por gravedad) sólo se utiliza en casos especializados, ya que las velocidades de sedimentación terminal de los microorganismos son demasiado bajas para permitir una sedimentación suficiente en un tiempo razonable. El caso más evidente es el del tratamiento biológico de residuos domésticos, donde los microbios forman masas o flóculos microbianos. Aquí, la clarificación del efluente (es decir, la purificación del producto) tiene lugar en sedimentadores por gravedad donde las mayores velocidades de sedimentación terminal de estos flóculos microbianos permiten una sedimentación eficiente por gravedad.

En el caso de organismos no floculantes, la sedimentación por gravedad sólo sería una opción si la velocidad terminal de caída aumentó, por ejemplo, añadiendo coagulantes químicos para formar flóculos microbianos.

Adición de floculantes

Formar agregados sueltos a partir de los flóculos aumentaría aún más la sedimentación durante la sedimentación por gravedad. Asimismo, la coagulación y la floculación se pueden combinar con la filtración y la centrifugación para mejorar el potencial de una separación eficiente. Sin embargo, este enfoque añade potencialmente sustancias no deseadas a las células y normalmente sólo sería factible si el producto residiera en el líquido extracelular.

10.3 Ruptura celular y separación del extracto celular.

Los productos intracelulares se recuperan de la célula mediante un proceso de ruptura celular y separación del extracto de los fragmentos celulares resultantes. La ruptura celular se lleva a cabo mediante uno de tres tipos de procedimientos: ruptura mecánica, ruptura no mecánica o una combinación de ruptura mecánica y no mecánica.

La ruptura mecánica mediante molienda o molienda con perlas cerámicas abrasivas es uno de los métodos de desintegración más comunes y exitosos a gran escala. Un tambor parcialmente lleno con perlas y suspensión de células gira sobre un eje horizontal (típicamente a 6000 rpm) y las células se rompen por abrasión y desgaste cuando entran en contacto con las perlas. Posiblemente el único inconveniente de este proceso sea el calentamiento por fricción de la suspensión celular, que afectaría negativamente a las propiedades de un producto termolábil como las enzimas. Esto se soluciona mediante la incorporación de una camisa alrededor del tambor a través de la cual pasa agua de refrigeración para mantener la suspensión por debajo de lo que dañaría el producto.

La homogeneización a alta presión es otro método muy utilizado de ruptura mecánica de células, que en la mayoría de los casos se puede escalar manteniendo buenas eficiencias. Aquí la suspensión celular se fuerza a través de una válvula estrecha a alta presión (hasta 10^5 kPa) donde las fuerzas de corte rompen las células. El control de la presión de la válvula permite regular el grado de rotura de la celda. Los desafíos prácticos asociados con esta metodología se relacionan principalmente con el enfriamiento de la cabeza de la válvula, y reemplazo del asiento de válvula.

Otros medios de ruptura mecánica están restringidos al uso a escala de laboratorio. Por ejemplo, el ultrasonido, un método rápido y eficaz de ruptura celular utilizado ampliamente en aplicaciones a escala de laboratorio, no es adecuado para operaciones a gran escala. Durante la sonificación, aproximadamente 20 Hz se traducen en oscilaciones de una punta de titanio, creando así microburbujas. La implosión de las microburbujas provoca ondas de choque que provocan cambios de presión que rompen las células. Sin embargo, el aumento concomitante de la temperatura es difícil de controlar, lo que limita el potencial de aumento.

La ruptura no mecánica incorpora metodologías físicas, químicas y biológicas. El método físico más común se basa en inducir un cambio de fase en la suspensión celular. Una suspensión de células congeladas se empuja a través de un orificio, lo que produce cambios de presión y temperatura que inducen un cambio en la fase y, correspondientemente, en la estructura cristalina. Los cambios en la estructura cristalina provocan la ruptura celular. Generalmente este método es adecuado sólo para aplicaciones a pequeña escala. Otros métodos físicos incluyen la ruptura de las paredes celulares mediante choque osmótico utilizando tampones, disolventes o azúcares o choque térmico durante el cual los cristales de hielo rompen las células. El shock osmótico tiene particular aplicabilidad para la liberación de enzimas periplásmicas.

La ruptura celular química y biológica, aunque eficaz, tiene una aplicabilidad limitada. La extracción química, mediada por agentes líticos como álcalis, disolventes y detergentes que disocian o solubilizan las paredes celulares, puede ser demasiado agresiva para la mayoría de los productos. La ruptura biológica por enzimas líticas que hidrolizan los polisacáridos en la pared celular o por antibióticos que interfieren con la síntesis de la pared celular son eficaces, pero se limitan a productos específicos y, a menudo, son costosas. Sin embargo, existe la posibilidad de combinar de forma innovadora diferentes métodos de desintegración celular, como por ejemplo antibióticos y shock osmótico.

Una vez que las células se destruyen, los restos celulares aún deben eliminarse del extracto celular. Se emplean operaciones de separación sólido-líquido (Sección 10.2), particularmente aquellas que pueden separar los desechos celulares fragmentados con tamaños de partículas de menos de una micra. Por tanto, en términos de operaciones de separación convencionales, se prefiere la centrifugación a la filtración. Sin embargo, la ultrafiltración y ultracentrifugación con fuerzas g de hasta 10^6 suelen ser opciones ideales.

10.4 Concentración y purificación de productos solubles.

La recuperación del producto soluble, ya sea obtenido directamente del líquido extracelular o de un extracto del contenido celular, se puede lograr mediante una variedad de operaciones unitarias. Cada una de estas operaciones explota una característica específica del producto que facilita su separación de los componentes no deseados. Más comúnmente, estas características son el tamaño molecular, la solubilidad y la carga iónica.

La recuperación de productos normalmente requiere una combinación de operaciones unitarias. Dado que las pérdidas de producto ocurren con cada operación, el programa de recuperación posterior debe diseñarse para minimizar el número de operaciones unitarias necesarias para cumplir con las especificaciones del producto. Esto implica no sólo la elección correcta de las operaciones para optimizar la eficiencia de recuperación del producto en cada operación, sino también la más eficiente organización de las operaciones individuales en el programa de recuperación. Por ejemplo, las operaciones unitarias que permitan cierto grado de concentración deberían introducirse preferentemente como una etapa temprana y no tardía del programa. Esto reduce el volumen de procesamiento y, por tanto, el tamaño del equipo, con la consiguiente reducción tanto de los costos de capital como de operación.

Las operaciones unitarias empleadas con mayor frecuencia para recuperar bioproductos solubles incluyen precipitación, separación por membrana, extracción líquida y cromatografía.

La precipitación y la extracción líquida aprovechan la diferencia de solubilidad entre el producto y los componentes no deseados, mientras que la separación por membrana aprovecha la diferencia de tamaño molecular. Las características específicas explotadas en las técnicas cromatográficas dependen de la cromatografía particular involucrada. La cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo, aprovecha la diferencia en la carga iónica, la cromatografía en gel aprovecha la diferencia en el tamaño molecular y la cromatografía de afinidad explota la diferencia en la afinidad por una molécula particular (por ejemplo, antígeno o cosustrato). Una técnica adicional, la electroforesis, exclusiva para la recuperación de bioproductos,

Generalmente la mayoría de los procesos de recuperación tendrán cierto grado de concentración y purificación incluso si las especificaciones de purificación no son necesariamente altas; Estos programas de recuperación pueden incluir uno o más de los siguientes: precipitación, separación por membrana y extracción líquida. Una especificación de pureza más alta puede necesitar técnicas de fraccionamiento más selectivas, como la cromatografía de afinidad. En última instancia, el grado de pureza especificado debe coincidir con su uso comercial para optimizar el costo de recuperación del producto. A modo de ejemplo, la complejidad y el coste de recuperación de la enzima glucosa oxidasa vendrán dictados por su uso final: una herramienta de diagnóstico en la industria farmacéutica para

el análisis de glucosa en sangre, o una enzima agregada a los alimentos para retrasar la rancidez al eliminar el oxígeno en los envases.

10.4.1. Precipitación

La precipitación se utiliza principalmente para la concentración y separación de una mezcla de proteínas de otros productos o para la separación de diferentes proteínas, en cuyo caso se denomina precipitación fraccionada.

Sin embargo, en el contexto del procesamiento biológico, la precipitación no se utiliza en el sentido convencional como en la precipitación de estructuras cristalinas. Más bien, se refiere a la precipitación de una masa amorfa que tiene una solubilidad reducida en relación con los otros componentes en solución.

La solubilidad de una proteína se rige por las condiciones ambientales (pH, temperatura, concentración de sal, etc.) y las propiedades de la proteína (forma, carga, hidrofobicidad, etc.). Esto significa que los parámetros ambientales se pueden ajustar para disminuir la solubilidad de la proteína y efectuar su precipitación.

La precipitación fraccionada, la separación de proteínas individuales de una mezcla de proteínas, es posible gracias al hecho de que diferentes proteínas tienen diferentes propiedades y, por tanto, diferentes solubilidades en un entorno específico.

La precipitación se puede inducir de varias maneras. Si la actividad biológica de la proteína no es un factor, la precipitación se puede inducir mediante la desnaturalización de la proteína mediante un aumento de la temperatura o un cambio de pH. Las temperaturas superiores a 60 °C desnaturalizan la mayoría de las proteínas, por lo que un aumento de la temperatura por encima de este valor provocará la precipitación de proteínas mediante desnaturalización. Este es un método útil para eliminar proteínas no deseadas.

Un cambio en el pH cambia el número de grupos ionizados asociados con la superficie de la proteína, alterando así las fuerzas electrostáticas. En su pH isoelectrico, la proteína tiene su carga neta más baja y las fuerzas repulsivas están ausentes.

Esto conduce a interacción hidrófoba, agregación y precipitación. Diferentes proteínas tienen diferentes grupos ácidos y básicos y, por tanto, diferentes valores de pH isoelectrico. Este concepto se puede aprovechar para el fraccionamiento de proteínas dentro de una mezcla de proteínas.

Si se debe mantener la actividad biológica, la precipitación se puede llevar a cabo mediante la adición de una sal o, menos frecuentemente, mediante la adición de polímeros no iónicos, polielectrolitos, disolventes miscibles en agua o iones metálicos. La precipitación de la sal, tradicionalmente denominada técnica de "salado", se lleva a cabo más comúnmente mediante la adición de sulfato de amonio debido al amplio rango de solubilidad y al bajo coste de esta sal, aunque también se utilizan en menor medida fosfato de potasio y sodio.

Se prefieren las sales con mayor fuerza iónica porque la solubilidad disminuye logarítmicamente con una mayor fuerza iónica (verificado empíricamente). Esta relación, conocida como ecuación de "salación", se define en términos de una constante de "salación", K_s , que es función del pH,

temperatura, fracción salina y tipo de proteína, y una constante empírica, B (Ecuación 10.6).

$$\log \text{ solubility} = B - K_s [\text{ionic strength}] \quad 10.6$$

Sin embargo, se debe tener precaución con esta relación empírica, ya que no se aplica a todas las sales. Por ejemplo, se ha demostrado que el cloruro de sodio aumenta la solubilidad al aumentar la fuerza iónica en bajas concentraciones de sal. El mecanismo que sustenta este fenómeno no se comprende muy bien, pero puede estar relacionado con la eliminación del agua de hidratación de la superficie de la proteína por parte de los iones.

Los grupos hidrofóbicos de la proteína quedan así expuestos e interactúan con grupos hidrofóbicos de otras moléculas, lo que lleva a la agregación.

La precipitación mediante la adición de polímeros no iónicos de alto peso molecular (por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o dextrano) es particularmente útil para productos lábiles. La disminución en la solubilidad con una concentración creciente de polímero sigue una ecuación análoga a la ecuación de "salación" (Ecuación 10.7). Se dice que el mecanismo en este caso está relacionado con los polímeros que hacen que las proteínas se acerquen entre sí y se agreguen.

$$\log \text{ solubilidad} = B' - K_s [\text{concentración de polímero}] \quad [10.7]$$

Los polímeros iónicos (polielectrolitos) también provocarán la precipitación de proteínas si el polielectrolito y la proteína tienen cargas opuestas. La interacción electrostática entre cargas opuestas neutraliza la carga y así permite que se produzca agregación y precipitación.

La disminución de la solubilidad al aumentar la concentración de disolventes orgánicos miscibles en agua (p. ej., etanol, acetona) sigue también una relación empírica análoga a la ecuación de "salación", donde D_m es la constante dieléctrica de la mezcla (Ecuación 10.8). Los disolventes orgánicos disminuyen la constante dieléctrica, es decir, aumentan la fuerza de atracción electrostática, disminuyendo así la solubilidad al permitir que las proteínas reaccionen más fácilmente entre sí que con el agua. Sin embargo, la tendencia del disolvente a desnaturalizar la proteína es un desafío constante con este método. Por lo general, esto se soluciona disminuyendo la temperatura a menos de -5°C antes de añadir el disolvente.

$$\log \text{ solubility} = B'' - \frac{K_s}{D_m^2} \quad [10.8]$$

Finalmente, se pueden añadir iones metálicos como agentes complejantes, provocando así la formación de complejos insolubles, por ejemplo sales cálcicas de estreptomycin y penicilina. Este método tiene un alto grado de especificidad pero también tiene el potencial de desnaturalizar el producto.

La precipitación se utiliza a menudo como un paso inicial, ya que concentra y proporciona una purificación hasta veinte veces mayor.

Sin embargo, normalmente es relativamente inespecífico para un paso y el precipitado puede contener varias proteínas en la mezcla. No siempre es posible un fraccionamiento preciso, incluso en varios pasos, especialmente cuando las proteínas tienen solubilidades similares.

Además, es inevitable cierta contaminación de la mezcla. La sal, el PEG u otros aditivos deben eliminarse en un paso posterior (frecuentemente ultrafiltración detallada en la Sección 10.4.2). Se pueden experimentar algunos problemas de aumento de escala en grandes volúmenes en los que las variaciones de temperatura y mezcla pueden precipitar diferentes proteínas en diferentes ubicaciones del tanque.

10.4.2 Separación de membranas

Las técnicas de membrana, específicamente la ultrafiltración, se usan ampliamente para separar proteínas de alto peso molecular de constituyentes más pequeños no deseados en función del tamaño molecular. La separación se ve facilitada por la permeación de moléculas más pequeñas a través de la membrana bajo presión aplicada (500 a 700 kPa), mientras que la membrana retiene las moléculas más grandes. Este método de separación tiene una amplia aplicabilidad, ya que se puede utilizar para separar moléculas grandes en una amplia gama de tamaños moleculares, desde 2000 hasta 500.000 Daltons. Es especialmente apropiado para bioproductos lábiles, como enzimas y vacunas, cuya recuperación requiere condiciones moderadas. Un uso importante de la ultrafiltración es la eliminación de las sales añadidas durante una operación de precipitación de proteínas.

Además de las membranas de ultrafiltración utilizadas para la retención de moléculas grandes, se utilizan membranas con cortes de peso molecular considerablemente más pequeños para retener todas las moléculas distintas de las de agua, incluidas las moléculas tan pequeños como sales monovalentes. En estas condiciones, se aplica alta presión (3000 kPa a 4000 kPa) para facilitar la permeación de las moléculas de agua a través de la membrana contra la presión osmótica; este proceso se conoce como ósmosis inversa. En el contexto de la recuperación de productos, la ósmosis inversa es únicamente una operación de concentración, a diferencia de la ultrafiltración que facilita tanto la concentración como la purificación. La ósmosis inversa se utiliza casi exclusivamente para la purificación del agua.

Las membranas de ultrafiltración y ósmosis inversa son muy diferentes a los filtros convencionales utilizados para las operaciones de separación sólido-líquido. Los filtros para separación de sólidos comprenden poros simétricos o isotrópicos que son capaces de separar partículas de 10 micras o más con operaciones de filtración convencionales y partículas entre el rango de 1000 angströms a 10 micras con operaciones de microfiltración. Las membranas de ultrafiltración y ósmosis inversa, por el contrario, tienen poros asimétricos o anisotrópicos que funcionan como un tamiz molecular selectivo para separar moléculas de aproximadamente 30 a 1000 angstroms (ultrafiltración) o de aproximadamente 2 a 50 angstroms (ósmosis inversa). La separación en estas membranas se cuantifica en términos de un límite de peso molecular, definido como el peso molecular del soluto que es retenido en un 90% por la membrana.

Dado que las membranas tienen una distribución de tamaños de poros, el corte del peso molecular no es absolutamente preciso. Esto limita el uso de membranas de ultrafiltración para el fraccionamiento de proteínas.

La facilidad de separación depende de la nitidez del corte del peso molecular. Esto se mide mediante un coeficiente de rechazo donde el coeficiente de rechazo es la fracción de soluto presente en la parte superior que es rechazada por la membrana. Teóricamente el coeficiente puede variar entre cero y la unidad, pero en la práctica debería estar alrededor de 0,95 para una separación eficiente.

El desarrollo de la tecnología para producir estas membranas abarca 150 años y culmina con el avance de las membranas de acetato de celulosa que comprenden una capa activa o piel de 0,2 a 0,5 micrones de espesor que actúa como tamiz molecular.

La capa activa está unida a una subestructura porosa de 125 a 250 micrones de espesor que sirve únicamente como soporte mecánico. Sin embargo, el rango de operación del acetato de celulosa está limitado por la temperatura (se ablanda a temperaturas superiores a 40°C) y el pH (se hidroliza a pH alto) y esta membrana pronto fue reemplazada por membranas no celulósicas, como las polisulfonas, que pueden tolerar temperaturas de hasta a 75°C y valores de pH entre 1 y 13. Más recientemente, las membranas cerámicas se han desarrollado y preferido en determinadas situaciones por su alta resistencia y durabilidad.

Las membranas de ultrafiltración y ósmosis inversa funcionan bajo una caída de presión transmembrana, donde el flujo inicialmente aumenta linealmente con el aumento de la caída de presión. A medida que aumenta la presión, el flujo de soluto hacia la superficie de la membrana eventualmente excede el flujo de soluto a través de la membrana. Luego, el soluto rechazado se devuelve a la solución en masa mediante retrodifusión y se produce una acumulación de soluto entre la solución en masa y la superficie de la membrana. Esto se llama polarización de concentración y es el principal inconveniente de las membranas de ultrafiltración y ósmosis inversa. La polarización de concentración aumenta la resistencia a la transferencia y se ralentiza el aumento del flujo con una mayor caída de presión transmembrana. En condiciones extremas, la polarización por concentración puede provocar una capa de limo o gel en la superficie de la membrana. En este punto, la resistencia es tan grande que un aumento de la caída de presión transmembrana ya no tiene ningún efecto sobre el flujo. En el llamado régimen de gel, el transporte a través de la capa de gel limita el flujo máximo alcanzable. Esto es particularmente grave a altas concentraciones de soluto donde el régimen de gel se alcanza antes y con un flujo más bajo. El aumento de la caída de presión transmembrana en el régimen de gel puede provocar la deformación de la membrana. En la práctica, estas unidades funcionan con caídas de presión transmembrana cerca del final del rango donde el flujo y la caída de presión disfrutan de una relación lineal. A esto se le suele denominar flujo crítico.

Los esfuerzos para reducir o eliminar la acumulación de solutos en la superficie de la membrana se han centrado en aumentar la turbulencia en la superficie. Esto se lleva a cabo mediante agitación mecánica o, más frecuentemente, mediante filtración de flujo cruzado. En la filtración de flujo cruzado, se utiliza el flujo tangencial para que el flujo se mueva paralelo a la superficie de la membrana mientras pasa a través de los poros. El flujo tangencial está mediado a través de una de varias configuraciones de membrana. El cartucho de fibra hueca, omnipresente en la purificación de agua por ósmosis inversa pero también con muchas otras aplicaciones, comprende varias membranas de fibra hueca a través de las cuales fluye la solución a lo largo de la superficie de la membrana. Esta configuración tiene la ventaja de una alta relación superficie-volumen pero es susceptible de obstruirse. La disposición de placa y marco tiene una relación de superficie a volumen más baja pero es menos susceptible a obstruirse que el dispositivo de fibra hueca. Los cartuchos en espiral también tienen un tipo de disposición de placa y marco, pero están enrollados en espiral, lo que aumenta la

relación superficie-volumen. En general, el propósito final dictará la mejor disposición específica de las membranas.

10.4.3 Extracción de líquidos

La extracción con solventes es la operación de extracción líquida mejor establecida; esto depende de la solubilidad preferencial del producto en una fase orgánica añadida, inmisible con la fase acuosa. La eficiencia de la extracción con solventes, medido en términos de un coeficiente de distribución que relaciona las concentraciones del soluto en las diferentes fases, depende en gran medida de la idoneidad del disolvente. Un coeficiente de distribución alto indica una solubilidad preferencial en el disolvente y, por tanto, una buena separación.

La extracción con solvente con acetato de amilo como solvente se ha utilizado con éxito para recuperar penicilina. La recuperación eficiente es posible porque la penicilina existe como una sal a pH alto y un ácido a pH bajo. La sal es preferentemente soluble en la fase acuosa y el ácido preferentemente soluble en la fase orgánica (acetato de amilo), lo que facilita la transferencia de penicilina entre las fases acuosa y orgánica simplemente alterando el pH. Durante el proceso de recuperación de penicilina, inicialmente se agrega ácido a la corriente acuosa cruda entrante para promover la extracción en acetato de amilo al contacto. Dado que el contacto prolongado con acetato de amilo es perjudicial para el producto de penicilina, luego se agrega álcali al extracto de acetato de amilo y la sal de penicilina se extrae en agua. La degradación de la penicilina se minimiza durante este proceso mediante el uso de extractores centrífugos que minimizan el tiempo de contacto entre la penicilina y el acetato de amilo. Todo el proceso de extracción con disolvente, desde el inicio hasta el reingreso de la penicilina a la fase acuosa final, puede durar menos de dos minutos.

Sin embargo, la extracción con disolventes no es adecuada para muchos bioproductos lábiles, especialmente enzimas destinadas a ser utilizadas como biocatalizadores. En este caso, el bioproducto se protege del daño del disolvente sustituyendo la fase de disolvente inmisible por una segunda fase acuosa inmisible. Las dos fases acuosas son inmiscibles debido a pequeñas cantidades de polímeros agregados a una o ambas fases, pero todavía se las conoce como acuosas porque comprenden principalmente agua (75 a 95%). Dos aditivos poliméricos comunes son el dextrano y el PEG, cada uno de los cuales se agrega en una fase separada. Otras aplicaciones utilizan un polímero en una fase con sal agregada en la otra, como PEG en una fase y fosfato de potasio en la otra.

Esta forma de extracción líquida se conoce como extracción acuosa en dos fases y, en todos los aspectos, excepto la naturaleza de las fases, se rige por los mismos principios que la extracción con disolventes. La distribución del disolvente se describe mediante un coeficiente de reparto. El coeficiente de partición depende de varias variables, a saber, la naturaleza del soluto, la naturaleza de las fases, el pH, la fuerza iónica, la concentración del polímero y el número de polímeros. Por ejemplo, el coeficiente de partición para la separación de proteínas hidrófobas e iónicas podría mejorarse usando un polímero en una fase y una sal en la otra, de modo que el primero se solubilizaría preferentemente en la fase acuosa que contiene el polímero, mientras que la segunda se solubilizaría preferentemente en la fase acuosa que contiene el polímero. en la fase acuosa que contiene la sal. La gran cantidad de variables significa que, aunque puede ser necesaria una amplia experimentación para optimizar el proceso, es probable que la extracción acuosa sea aplicable a una amplia gama de solutos.

Desafortunadamente, la necesidad de recuperar polímeros, a menudo costosos, aumenta la complejidad y el coste de esta operación de recuperación.

10.4.4 Cromatografía

La cromatografía se lleva a cabo en una columna que contiene un adsorbente sólido como fase estacionaria y un disolvente que contiene el soluto que se mueve a través de la columna como fase móvil. Los solutos se distribuyen entre las fases móvil y estacionaria según sus características de equilibrio específicas. Estos se describen mediante isothermas de adsorción que relacionan la concentración de soluto en la fase móvil con la concentración de soluto en la superficie del adsorbente.

La separación mediante técnicas cromatográficas se basa en un mecanismo similar, independientemente del tipo de cromatografía, en el sentido de que la separación o resolución de solutos en una mezcla resulta de diferentes velocidades de migración de cada soluto en la columna, cada uno con su propia isoterma de adsorción. Los solutos se resuelven en bandas distintas a medida que migran a través de la columna, de modo que se produce la separación de diferentes solutos a lo largo de la columna. Es decir, el disolvente transportará el soluto menos adsorbido hasta el extremo más alejado de la columna, mientras que el soluto más adsorbido será retenido al inicio de la columna.

La separación cromatográfica se realiza en varios pasos. Inicialmente, el adsorbente de la columna se carga con solutos de la fase móvil. Cuando aparece el primer soluto en el eluyente, se detiene la carga y el o los solutos adsorbidos se eluyen con el eluyente apropiado. Podría ser, por ejemplo, un disolvente o un tampón con un pH diferente. Serán necesarios varios pasos de elución diferentes si los solutos se van a eluir por separado. Luego, la columna se regenera antes de que pueda tener lugar la siguiente carga.

Se encuentran disponibles varios tipos de separación cromatográfica. Estos dependen del tipo de adsorción entre el soluto y las fases estacionarias. En el más simple de ellos, la cromatografía de adsorción, la adsorción del soluto se produce mediante fuerzas débiles de Van der Waals. La no especificidad de los enlaces de Van der Waals limita la aplicabilidad de este método principalmente a procesos de tipo biorremediación donde el objetivo final es la eliminación de todos los componentes de la corriente (por ejemplo, uso de carbón activado en el tratamiento del agua).

Las otras técnicas cromatográficas (intercambio iónico, gel y afinidad) se utilizan para la purificación de productos, principalmente cuando se requiere un alto grado de pureza. La más común de estas separaciones cromatográficas es la cromatografía de intercambio iónico, en la que los solutos cargados se adsorben en resinas aniónicas o catiónicas por fuerzas electrostáticas, dependiendo de la carga del soluto. Las resinas aniónicas tienen iones negativos unidos, mientras que las resinas catiónicas tienen iones positivos unidos. Se encuentra disponible una gran cantidad de resinas e iones diferentes y el intercambio iónico tiene una amplia aplicabilidad para productos de peso molecular alto y bajo (incluidos, entre otros, aminoácidos, antibióticos (por ejemplo, estreptomicina) y vitaminas), y se usa ampliamente para el fraccionamiento de proteínas. y se amplía con éxito. Se debe tener cuidado de no introducir resinas débiles o condiciones de elución fuertes, ya que ambas pueden provocar la pérdida de producto.

La cromatografía de afinidad es una técnica altamente especializada que se utiliza cuando se requiere una pureza superior para productos de alto costo. Se puede lograr una purificación cien veces mayor en un solo paso y se usa ampliamente para la recuperación de enzimas.

En esta técnica cromatográfica, la columna se rellena con ligandos unidos covalentemente sobre un soporte sólido como poliacrilamida, agarosa o celulosa, donde los ligandos tienen una afinidad muy específica por el soluto de modo que, al unirse con el ligando, el soluto quedará retenido en la columna. Por ejemplo, una enzima podría retenerse uniéndose a su coenzima o su inhibidor, o un anticuerpo podría retenerse uniéndose a su antígeno. El soluto se carga en condiciones de pH, temperatura, fuerza iónica, etc., que favorecerán el enlace.

La cromatografía en gel, también llamada filtración en gel, separa los solutos según la exclusión por tamaño. Las perlas de gel porosas con tamaños de poro controlados, hechas de polisacáridos como el dextrano o las poliacrilamidas, permiten que moléculas más pequeñas penetren en los poros de las perlas. Los solutos más grandes son los que menos penetran en los poros y, por tanto, son transportados hasta el extremo más alejado de la columna. Los solutos más pequeños que penetran más profundamente en los poros se retienen por más tiempo. Esto da como resultado un gradiente de tamaños a través de la columna. Cada gel se distingue por su límite de exclusión y distribución del tamaño de los poros. Una distribución de tamaño de poro más amplia fracciona una gama más amplia de tamaños, mientras que una distribución de tamaño de poro más estrecha aumenta la resolución de moléculas de tamaños similares.

10.4.5 Electroforesis

Finalmente, la electroforesis se puede utilizar para separar moléculas de diferentes cargas pero se utiliza exclusivamente para separar diferentes proteínas a pequeña escala. Básicamente, se aplica una carga eléctrica a los extremos de una columna que contiene macromoléculas cargadas (por ejemplo, proteínas) en un fluido o gel (por ejemplo, agar o poliacrilamida). Como las proteínas tienen cargas netas estas se moverán dentro del gel hasta el final de la carga opuesta a una velocidad proporcional a la magnitud de su carga. De esta forma, las proteínas se acumularán en diferentes posiciones del gel. Este método ofrece una resolución muy alta de fraccionamiento de proteínas y es un método líder para resolver mezclas de macromoléculas cargadas a pequeña escala. Desafortunadamente, la alta corriente requerida para producir la migración y la alta resistencia eléctrica del buffer conducen a un calentamiento óhmico del buffer. Esto provoca corrientes de convección que disminuyen la eficiencia de la separación, además de provocar la desnaturalización de las proteínas. Hasta la fecha, el calentamiento óhmico ha impedido la ampliación efectiva de esta tecnología.