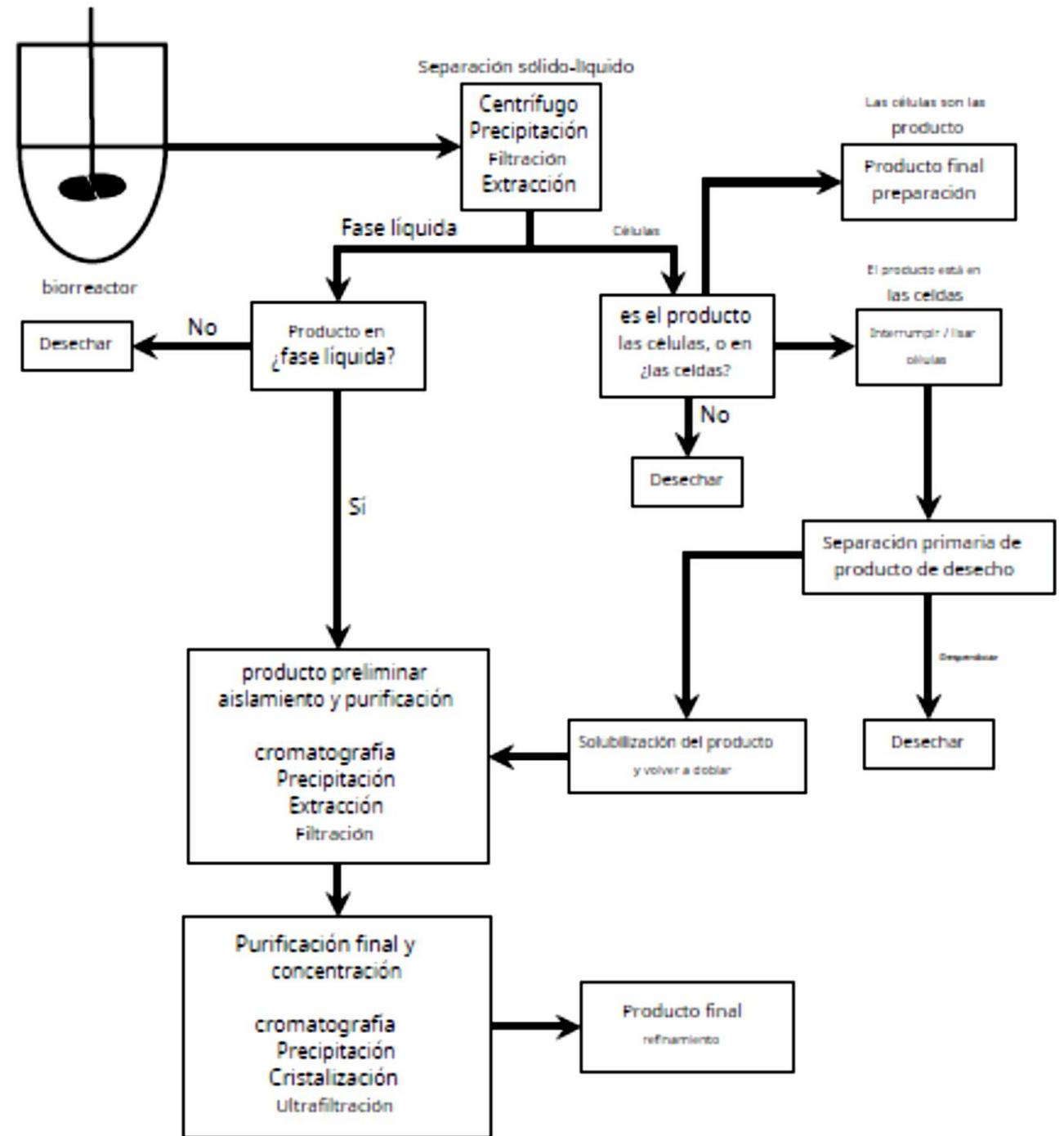
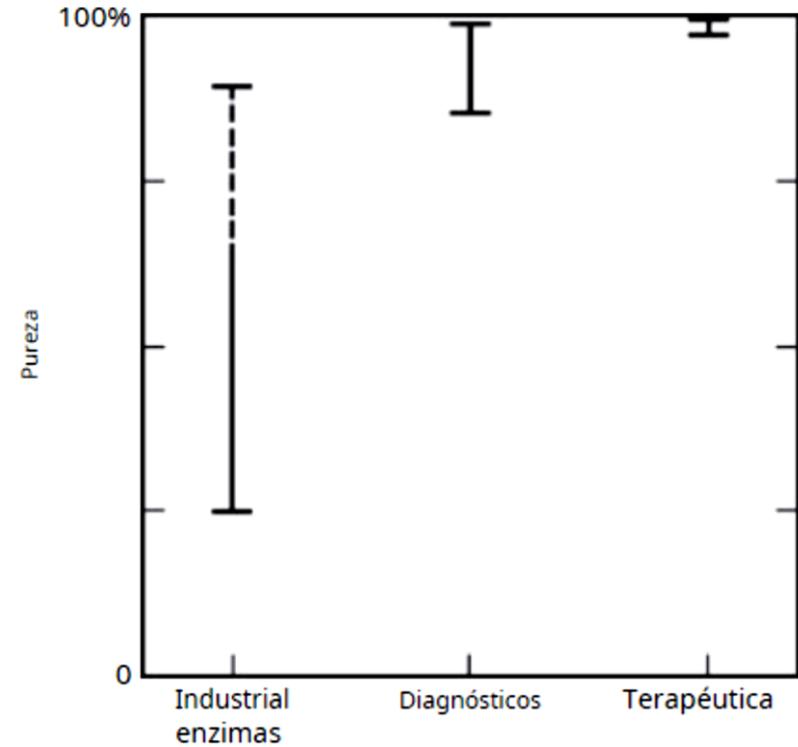
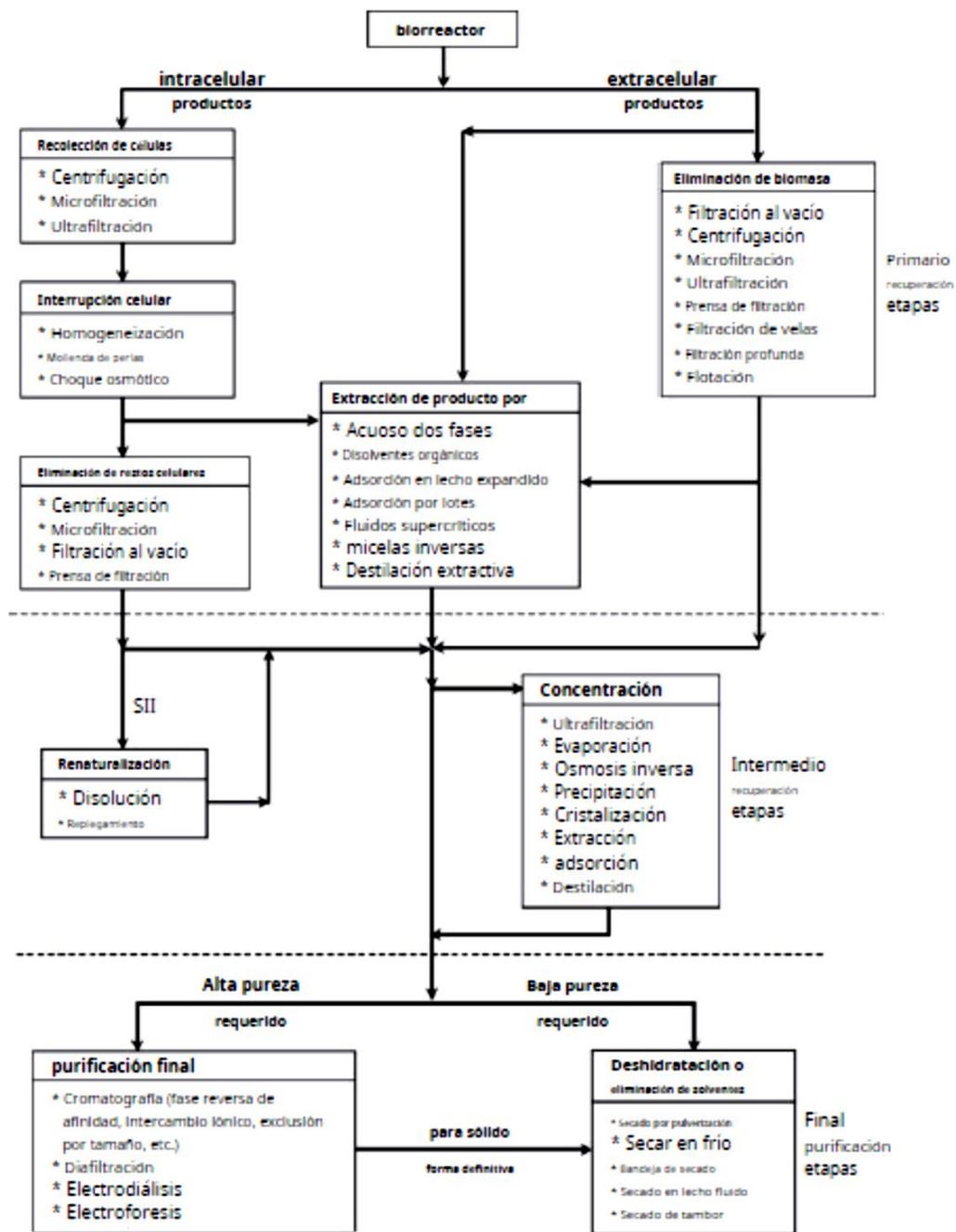


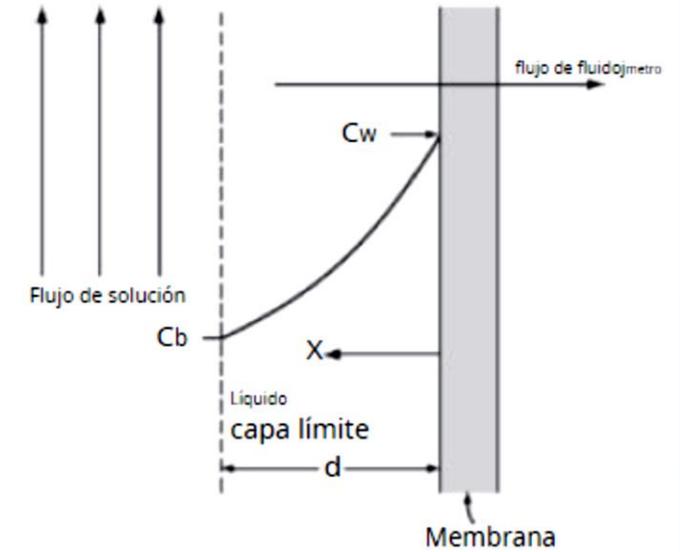
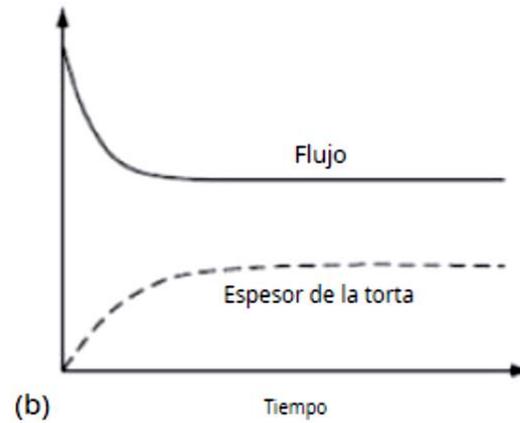
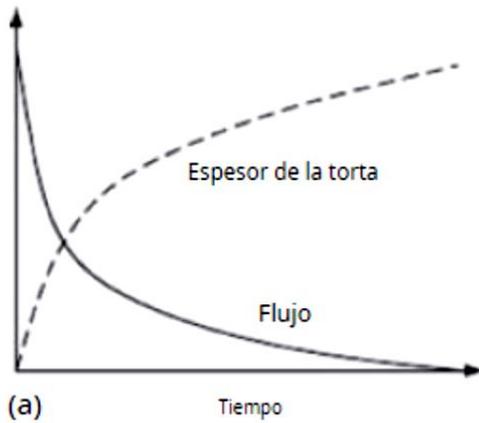
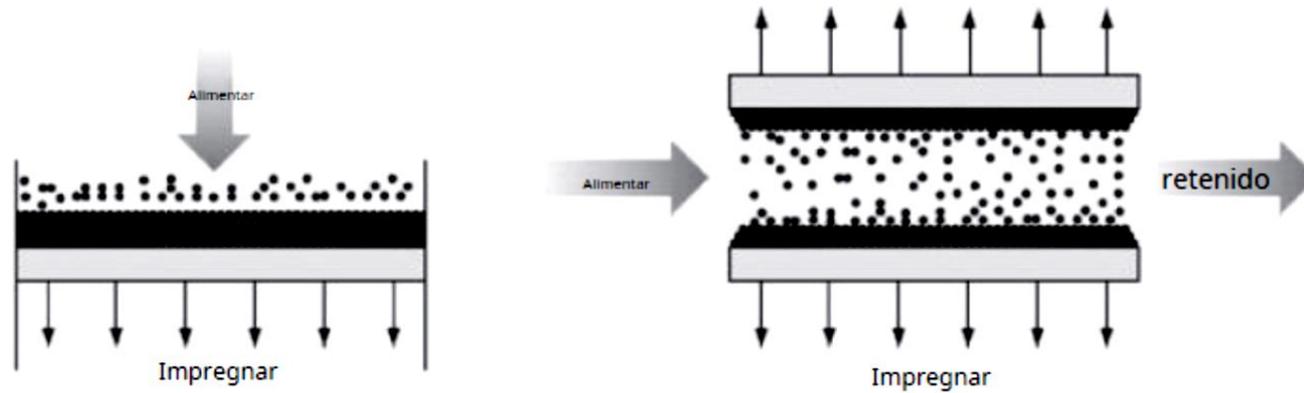
TEMA 10. Purificación de los productos

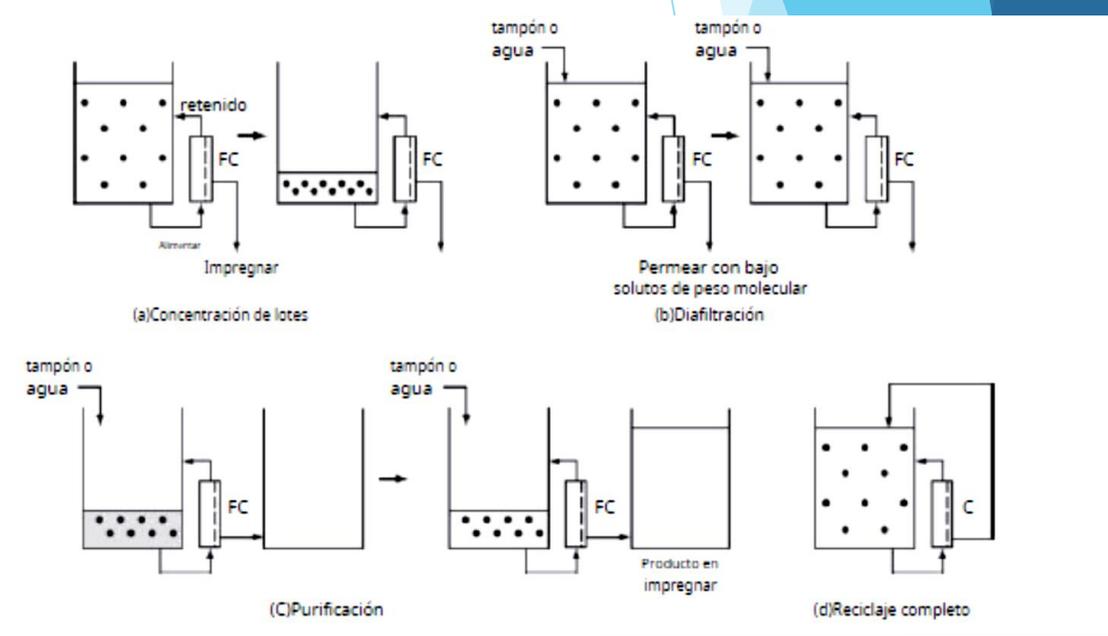
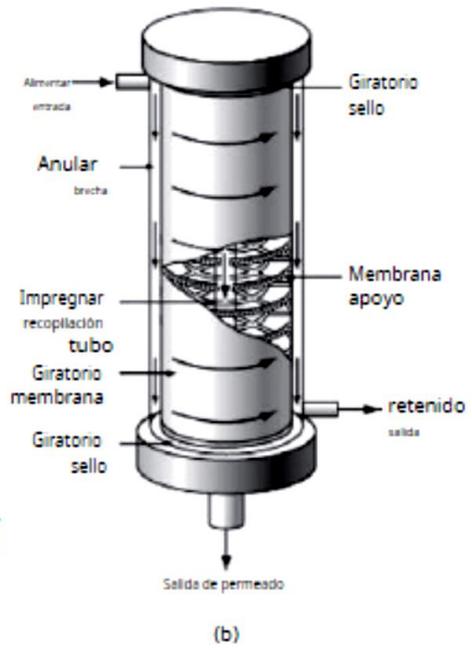
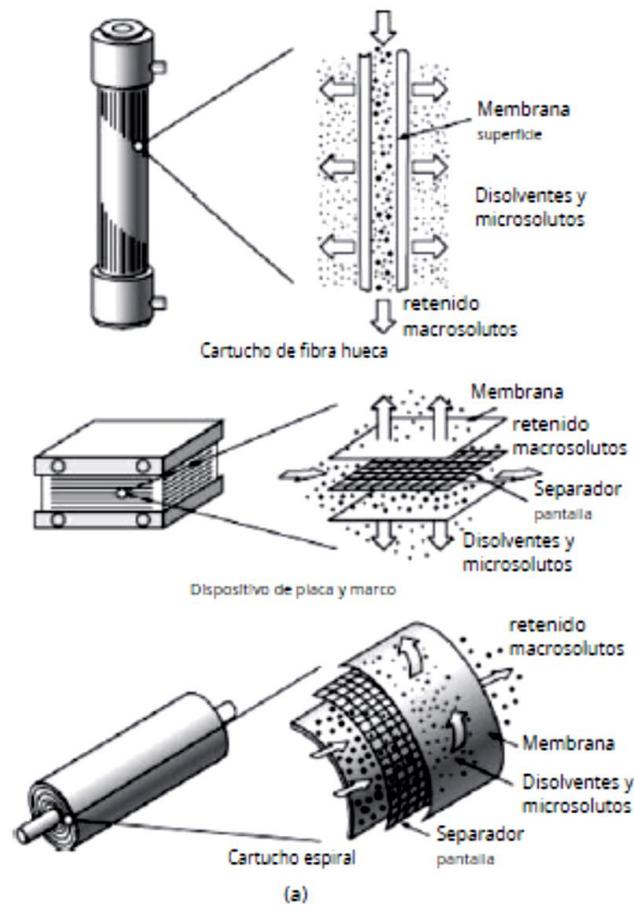
El producto se concentra por sedimentación, precipitación, filtración, centrifugación, extracción con solventes, destilación, evaporación del solvente y secado. Si fuera necesario purificarlo, se echará mano de otros procedimientos, como la cristalización y los métodos cromatográficos.



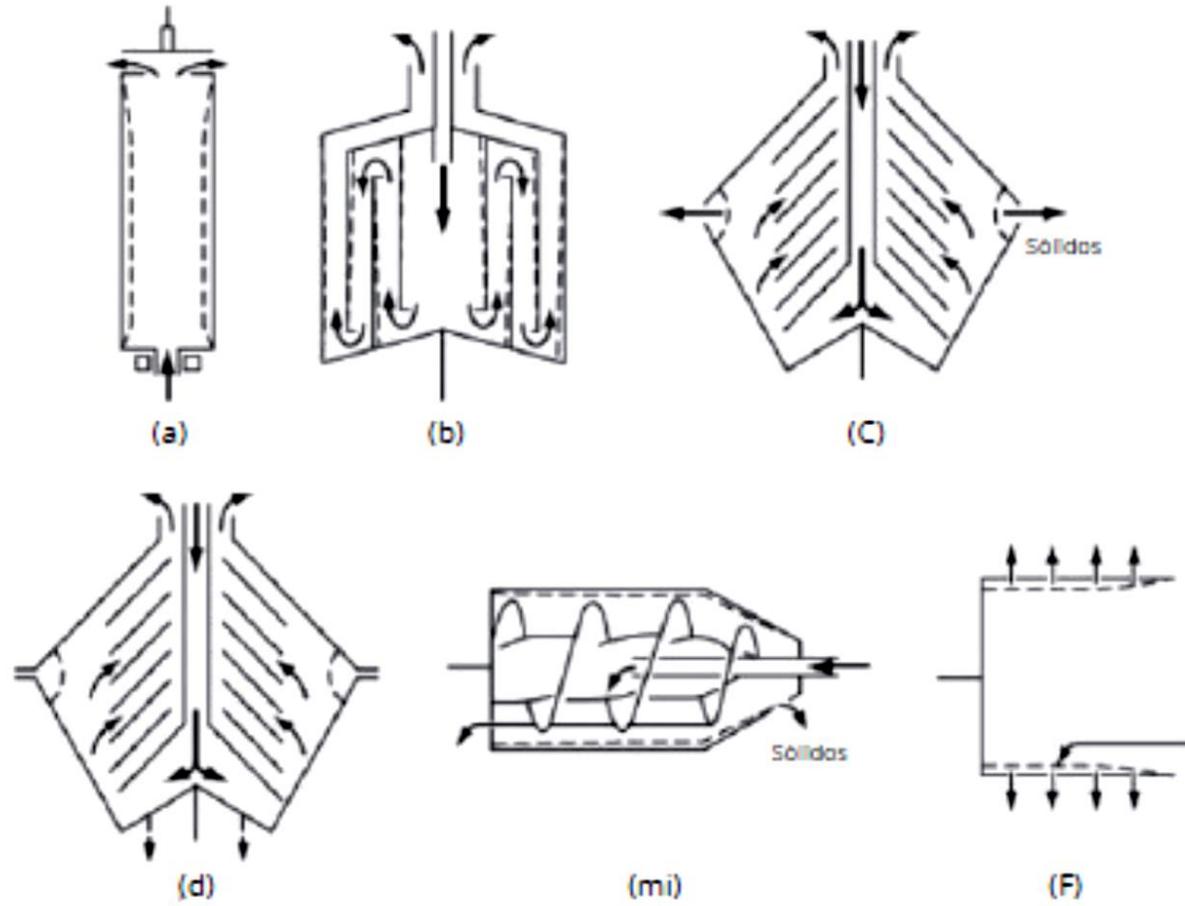


Filtración y filtración de flujo tangencial





Sedimentación y centrifugación



Ruptura celular y separación del extracto celular

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

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 105kPa) donde las fuerzas de corte rompen las células.

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.

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

La ruptura celular química y biológica, aunque eficaz, tiene una aplicabilidad limitada.

Una vez que las células se destruyen, los restos celulares aún deben eliminarse del extracto celular. Se emplean operaciones de separación sólido-líquido como centrifugación o filtrado

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 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.

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

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

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS Y ADSORCIÓN

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 isotermas de adsorción que relacionan la concentración de soluto en la fase móvil con la concentración de soluto en la superficie del adsorbente.

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.

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 .

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 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

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.

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.

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, 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.