

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**PURIFICACIÓN DE α -AMILASA DE
Aspergillus oryzae POR ADSORCIÓN**



MEMORIA

**Que para optar al Grado de
Doctor en Ciencias Químicas**

PRESENTA

LUIS FERNANDO BAUTISTA SANTA CRUZ

Madrid, 1997

A mi Familia

y a Eva.

... En este proceso adaptativo nada es inútil: los primeros groseros errores, así como las falsas rutas por donde la imaginación se aventura, son necesarios, pues acaban por conducirnos al verdadero camino, y entran, por tanto, en el éxito final, como entran en el acabado cuadro del artista los primeros informes bocetos.

..., la conquista de la nueva verdad constituye, sin disputa, la ventura más grande a que puede aspirar el hombre. Los halagos de la vanidad, las efusiones del instinto, las caricias de la fortuna, palidecen ante el soberano placer de sentir cómo brotan y crecen las alas del espíritu y cómo, al compás del esfuerzo, superamos la dificultad y dominamos y rendimos a la esquivia naturaleza.

Santiago Ramón y Cajal, Los tónicos de la voluntad (1898).

El presente trabajo de investigación se ha desarrollado en los laboratorios de Físicoquímica de los Procesos Industriales del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los Profesores Titulares José Aracil Mira y Mercedes Martínez Rodríguez.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de investigación que se expone en esta memoria se ha realizado a lo largo de los últimos cuatro años, aproximadamente. En el desarrollo de un trabajo de este tipo, muchas son las personas o instituciones que, de una forma u otra, se encuentran relacionadas con el mismo. Las aportaciones o influencias procedentes de cada una de ellas han servido para enriquecer y mejorar el resultado final del trabajo.

Por ello, desearía expresar mi agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

- A Pepe Aracil y a Mercedes Martínez porque desde que comencé a trabajar bajo su dirección, allá por el curso 1989/90 (con un paréntesis intermedio de tres años), me han transmitido su experiencia y conocimientos en las materias en las que he trabajado. De ellos siempre he recibido ayuda y apoyo, tanto personal como profesional y confiaron en mí para desarrollar el proyecto de investigación que ahora concluye y que se ha convertido en la presente tesis doctoral.
- A Roberto Soriano, por su ayuda y colaboración en el trabajo diario del laboratorio y porque juntos empezamos a estudiar la adsorción de α -amilasa y juntos hemos comenzado a comprender y descubrir las peculiaridades experimentales y teóricas que esconden los procesos cromatográficos.
- A Juanfran Escobedo, porque su punto de vista y consejos bioquímicos me han facilitado, en muchas ocasiones, el trabajo con las enzimas. Además, su compañía y presencia en el laboratorio nos ha alegrado a todos muchas largas tardes de trabajo.
- A Marimar Abad y M^a Ángeles Fernández, porque afrontaron problemas experimentales cuya resolución he adoptado, habiéndome sido de gran utilidad en el desarrollo del presente trabajo.
- A los compañeros y compañeras del laboratorio, Daniel García, Rafael García, Tomás García y Almudena Coterón, con quien he compartido estos años de tesis y a Gemma Vicente, Ana Renedo, Rocío Delgado, Joaquín Aguilar y Bea, que se unieron posteriormente al grupo, porque siempre han estado dispuestos a ayudar en lo que hiciera falta.
- A mi hermano José Manuel, por compartir conmigo parte de sus conocimientos acerca de las enzimas, permitiéndome comprenderlas un poco mejor, y por la ayuda prestada por él y su Mac para bucear por Internet y encontrar la información que buscaba.
- A Félix, Mariajo y Amalia, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, por la ayuda prestada con la electroforesis de las muestras de α -amilasa.

- Al Prof. Amador Haro por permitirme utilizar la cámara fría y algunos equipos del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Asimismo deseo expresar mi agradecimiento a José Luis, por su ayuda y consejos en el manejo de dichos equipos para la cristalización de la enzima.
- A mi familia, que siempre ha estado presente y a quien debo mi educación, que me ha apoyado para realizar los estudios que deseaba y seguir el camino que he ido trazando a lo largo de mi vida.
- A mis amigos, que siempre lo han hecho, y a todos aquellos que en algún momento me han animado y se han interesado por mi trabajo, porque aunque no se lo haya dicho, siempre lo he agradecido y me ha servido de ayuda.
- A Eva Atanes, porque ha visto crecer este trabajo desde su inicio, lo ha vivido y compartido con casi tanta intensidad como yo mismo. Porque su presencia a mi lado ha sido el apoyo que nunca me ha faltado y que me ha permitido llegar hasta aquí.
- También quiero expresar mi sincero agradecimiento por la financiación recibida de la Unión Europea (Proyecto BE-8138, Programa Brite EuRam II), DGICYT (Proyecto BIO94-1508-CE) y Comunidad Autónoma de Madrid (Proyecto AE00265/94), sin la que no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Ciudad Universitaria, Madrid, septiembre de 1997.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1.- α -AMILASA | 4 |
| 1.1.1.- Estructura y actividad catalítica | 5 |
| 1.1.2.- Producción | 10 |
| 1.1.3.- Propiedades fisicoquímicas | 14 |
| 1.1.4.- Aplicaciones | 18 |
| <i>Procesado del almidón</i> | 19 |
| <i>Producción de etanol</i> | 21 |
| <i>Producción de cerveza</i> | 21 |
| <i>Producción de jarabes azucarados y edulcorantes</i> | 22 |
| <i>Panificación</i> | 22 |

| | |
|--|----|
| <i>Producción de azúcar</i> | 23 |
| <i>Detergentes</i> | 23 |
| <i>Industria textil</i> | 23 |
| <i>Producción de acetona y butanol</i> | 24 |
| <i>Producción de ácido láctico</i> | 24 |
| <i>Biomasa microbiana</i> | 24 |
| 1.1.5.- Métodos de purificación | 24 |
| 1.2.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS | 25 |
| 1.2.1.- Etapas primarias | 26 |
| 1.2.2.- Etapas de purificación de alto valor añadido | 27 |
| <i>Interacción hidrofóbica</i> | 29 |
| <i>Intercambio iónico</i> | 35 |
| 1.3.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO | 40 |
| 1.4.- BIBLIOGRAFÍA | 41 |
| 2. TRANSFERENCIA DE MATERIA Y EQUILIBRIO QUÍMICO EN LOS PROCESOS DE ADSORCIÓN | 53 |
| 2.1.- INTRODUCCIÓN | 53 |
| 2.2.- PROCESOS DE TRANSFERENCIA DE MATERIA | 54 |
| 2.2.1.- Transferencia de materia en la capa límite externa | 54 |
| 2.2.2.- Transferencia de materia en el interior de los poros | 55 |
| <i>Difusión molecular</i> | 55 |
| <i>Difusividad de Knudsen</i> | 56 |
| <i>Difusividad en macroporos</i> | 56 |
| <i>Difusividad superficial</i> | 57 |
| 2.2.3.- Acoplamiento de mecanismos difusionales | 58 |
| 2.2.4.- Velocidad de adsorción | 59 |
| 2.3.- EQUILIBRIO DE ADSORCIÓN. ISOTERMAS | 60 |

| | |
|---|----|
| 2.3.1.- Introducción | 60 |
| 2.3.2.- Isoterma lineal | 62 |
| 2.3.3.- Isoterma no lineal | 62 |
| <i>Isoterma de Langmuir</i> | 62 |
| <i>Isoterma de Freundlich</i> | 63 |
| <i>Otras isothermas</i> | 63 |
| 2.4.- BIBLIOGRAFÍA | 64 |
| 3. MODELO MATEMÁTICO DEL PROCESO DE ADSORCIÓN | 67 |
| 3.1.- INTRODUCCIÓN | 67 |
| 3.2.- CROMATOGRAFÍA DE IMPULSO. ANÁLISIS DE MOMENTOS | 69 |
| 3.2.1.- Introducción | 69 |
| 3.2.2.- Modelo | 69 |
| 3.3.- ADSORCIÓN EN TANQUE AGITADO DISCONTINUO | 74 |
| 3.3.1.- Introducción | 74 |
| 3.3.2.- Modelo | 76 |
| <i>Establecimiento de hipótesis</i> | 76 |
| <i>Balance de materia en la fase líquida</i> | 77 |
| <i>Balance de materia en una sección radial de la partícula</i> | 77 |
| <i>Condiciones de contorno e iniciales</i> | 78 |
| 3.4.- ADSORCIÓN EN LECHO FIJO | 78 |
| 3.4.1.- Introducción | 78 |
| 3.4.2.- Modelo | 79 |
| <i>Establecimiento de hipótesis</i> | 80 |
| <i>Balance de materia en una partícula</i> | 80 |
| <i>Balance de materia en la columna</i> | 81 |
| <i>Condiciones de contorno</i> | 81 |
| <i>Condiciones iniciales</i> | 82 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5.- BIBLIOGRAFÍA | 82 |
| 4. CARACTERIZACIÓN Y MÉTODOS DE ANÁLISIS | 89 |
| 4.1.- CARACTERIZACIÓN DEL ADSORBATO | 89 |
| 4.1.1.- Determinación de la cantidad de proteína total | 90 |
| <i>Método de absorbancia en ultravioleta</i> | 91 |
| <i>Método de Bradford</i> | 91 |
| 4.1.2.- Cristalización de α -amilasa | 92 |
| 4.1.3.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes | 92 |
| 4.1.4.- Espectroscopía de absorción ultravioleta | 94 |
| 4.2.- CARACTERIZACIÓN DE LOS ADSORBENTES | 94 |
| 4.2.1.- Adsorción en fase gaseosa | 95 |
| <i>Área superficial (Área BET)</i> | 96 |
| <i>Distribución de tamaño de poro</i> | 96 |
| 4.2.2.- Porosimetría de mercurio | 97 |
| <i>Distribución de tamaño de poro</i> | 97 |
| <i>Área superficial</i> | 98 |
| 4.2.3.- Absorción de líquido | 99 |
| 4.2.4.- Distribución del tamaño de partícula por dispersión de luz | 99 |
| 4.3.- MÉTODOS DE ANÁLISIS | 100 |
| 4.3.1.- Absorbancia en ultravioleta | 101 |
| 4.3.2.- Actividad de α -amilasa | 101 |
| 4.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 102 |
| 4.4.1.- Caracterización del adsorbato | 102 |
| <i>Cantidad de proteína</i> | 102 |
| <i>Espectroscopía ultravioleta</i> | 103 |
| <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida</i> | 105 |
| 4.4.2.- Caracterización de los adsorbentes | 106 |

| | |
|---|-----|
| <i>Adsorción en fase gaseosa</i> | 106 |
| <i>Porosimetría de mercurio</i> | 107 |
| <i>Absorción de líquido</i> | 109 |
| <i>Tamaño de partícula por dispersión de luz</i> | 109 |
| 4.5.- BIBLIOGRAFÍA | 110 |
| 5. EXPERIMENTAL | 113 |
| 5.1.- PREPARACIÓN DE LOS ADSORBENTES | 113 |
| 5.2.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC) | 114 |
| 5.2.1. Materiales | 115 |
| 5.2.2.- Equipo experimental | 115 |
| 5.2.3.- Relleno y preparación de las columnas de HPLC | 116 |
| 5.2.4.- Desarrollo de un experimento | 117 |
| 5.2.5.- Experimentos previos | 117 |
| <i>Adsorbentes</i> | 118 |
| <i>pH</i> | 118 |
| <i>Fuerza iónica</i> | 118 |
| <i>Concentración de adsorbato</i> | 119 |
| <i>Tamaño de partícula</i> | 119 |
| <i>Caudal</i> | 120 |
| <i>Temperatura</i> | 120 |
| <i>Volumen de inyección</i> | 120 |
| <i>Reversibilidad</i> | 120 |
| 5.2.6.- Condiciones de operación | 121 |
| 5.3.- ADSORCIÓN EN TANQUE AGITADO DISCONTINUO | 122 |
| 5.3.1.- Materiales | 123 |
| 5.3.2.- Equipo experimental | 123 |
| <i>Sistema de adsorción</i> | 123 |

| | |
|---------------------------------------|-----|
| <i>Sistema termostático</i> | 123 |
| <i>Sistema de agitación</i> | 123 |
| <i>Sistema de recirculación</i> | 124 |
| <i>Espectrofotómetro ultravioleta</i> | 124 |
| <i>Medidor de pH</i> | 124 |
| 5.3.3.- Desarrollo de un experimento | 125 |
| 5.3.4.- Experimentos previos | 125 |
| <i>pH y fuerza iónica</i> | 126 |
| <i>Velocidad de agitación</i> | 126 |
| <i>Concentración inicial</i> | 126 |
| <i>Tamaño de partícula</i> | 127 |
| <i>Volumen de disolución</i> | 127 |
| <i>Masa de adsorbente</i> | 127 |
| 5.3.5.- Condiciones de operación | 127 |
| 5.4.- ADSORCIÓN EN LECHO FIJO | 128 |
| 5.4.1.- Materiales | 129 |
| 5.4.2.- Equipo experimental | 129 |
| <i>Módulo de elución</i> | 129 |
| <i>Columna</i> | 130 |
| <i>Módulo de análisis</i> | 130 |
| <i>Módulo de pH</i> | 130 |
| <i>Colector de fracciones</i> | 130 |
| <i>Módulo de control</i> | 131 |
| 5.4.3.- Desarrollo de un experimento | 131 |
| 5.4.4.- Experimentos previos | 132 |
| <i>Caudal</i> | 132 |
| <i>Concentración inicial</i> | 133 |

| | |
|--|-----|
| <i>Tamaño de partícula</i> | 133 |
| <i>Dimensiones del lecho</i> | 133 |
| <i>Temperatura</i> | 133 |
| 5.4.5.- Condiciones de operación | 134 |
| 5.5.- BIBLIOGRAFÍA | 134 |
| 6. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN | 137 |
| 6.1.- CROMATOGRAFÍA DE IMPULSO | 137 |
| 6.1.1.- Planificación de experimentos | 137 |
| 6.1.2.- Influencia de las variables de operación | 139 |
| <i>Cálculo de la porosidad de la columna</i> | 140 |
| <i>Hidrofobicidad de la resina Duolite XAD-761</i> | 141 |
| <i>Carga característica de la α-amilasa en la resina Duolite A-568</i> | 143 |
| <i>Influencia de las variables</i> | 144 |
| 6.1.3.- Análisis de momentos | 147 |
| <i>Datos termodinámicos y de equilibrio</i> | 147 |
| <i>Datos cinéticos</i> | 155 |
| 6.2.- ISOTERMAS DE ADSORCIÓN | 157 |
| 6.2.1.- Resultados experimentales | 157 |
| 6.2.2.- Ajuste de los resultados a modelos de isotermas | 160 |
| 6.3.- ADSORCIÓN EN TANQUE AGITADO DISCONTINUO | 168 |
| 6.3.1.- Planificación de experimentos | 168 |
| 6.3.2.- Resultados | 169 |
| 6.4.- ADSORCIÓN EN LECHO FIJO | 174 |
| 6.4.1.- Planificación de experimentos | 174 |
| 6.4.2.- Resultados experimentales | 176 |
| <i>Efecto del caudal</i> | 178 |
| <i>Efecto de la concentración</i> | 180 |

| | |
|--|-----|
| <i>Efecto de la temperatura</i> | 181 |
| <i>Efecto del tamaño de partícula</i> | 183 |
| <i>Efecto de la altura de lecho</i> | 185 |
| 6.4.3.- Estabilidad y reutilización de la columna | 186 |
| 6.5.- BIBLIOGRAFÍA | 188 |
| 7. MODELADO MATEMÁTICO | 191 |
| 7.1.- ADSORCIÓN EN TANQUE AGITADO DISCONTINUO | 191 |
| 7.2.- ADSORCIÓN EN LECHO FIJO | 195 |
| 7.3.- BIBLIOGRAFÍA | 199 |
| 8. ESCALADO Y SIMULACIÓN DEL PROCESO DE ADSORCIÓN EN LECHO FIJO | 201 |
| 8.1.- ESCALADO DEL PROCESO DE ADSORCIÓN EN LECHO FIJO | 201 |
| 8.2.- SIMULACIÓN TEÓRICA DEL PROCESO DE ADSORCIÓN EN LECHO FIJO | 204 |
| 8.3.- PREDICCIÓN TEÓRICA DEL CAMBIO DE ESCALA | 214 |
| 8.4.- BIBLIOGRAFÍA | 216 |
| 9. RESUMEN, CONCLUSIONES Y FUTUROS TRABAJOS | 217 |
| ANEXO A. RESOLUCIÓN NUMÉRICA DE LOS MODELOS DE ADSORCIÓN | 221 |
| A.1.- ANÁLISIS DE MOMENTOS | 221 |
| A.2.- MODELO DE ADSORCIÓN EN TANQUE AGITADO DISCONTINUO | 222 |
| A.3.- MODELO DE ADSORCIÓN EN LECHO FIJO | 223 |
| A.4.- BIBLIOGRAFÍA | 225 |
| ANEXO B. AJUSTE DE LAS ISOTERMAS DE ADSORCIÓN. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 227 |
| ANEXO C. FIGURAS | 237 |
| C.1.- EXPERIMENTOS DE ADSORCIÓN EN TANQUE AGITADO | 237 |
| C.2.- EXPERIMENTOS DE ADSORCIÓN EN LECHO FIJO | 242 |
| C.3.- MODELADO DE LA ADSORCIÓN EN TANQUE AGITADO DISCONTINUO | 246 |

| | |
|--|-----|
| C.4.- MODELADO DE LA ADSORCIÓN EN LECHO FIJO | 255 |
| NOMENCLATURA | 265 |

1. INTRODUCCIÓN

El espectacular avance que han experimentado la ingeniería genética y la ingeniería bioquímica en las dos últimas décadas ha permitido el desarrollo y la aparición de un gran número de productos y procesos biotecnológicos de nueva creación así como la sustitución de otros, que se realizan en la actualidad por procesos convencionales. Esta situación de rápido crecimiento continúa en la actualidad gracias, en parte, al sinergismo producido por el acoplamiento de las diferentes disciplinas de la ciencia, básica y aplicada, y la técnica que se van sumando al desarrollo de la biotecnología.

Esta parte de la ciencia se está desarrollando en base a tres partes fundamentales: la producción, el control de bioprocesos y la recuperación y purificación del producto final. A cada una de ellas, que está en proceso de evolución y ramificación, se le están añadiendo nuevas disciplinas de la ciencia y la técnica y otras ya establecidas que se han adaptado a las características particulares de los procesos y los productos biotecnológicos.

La separación y purificación a escala industrial de una proteína procedente de un caldo de fermentación es una etapa básica en la biotecnología de procesos actual, ya que, en general, representa el mayor coste de producción. La viabilidad económica y la competitividad de un proceso

biotecnológico depende no solo de las innovaciones llevadas a cabo en la producción gracias al avance de la biología molecular, inmunología, microbiología, etc., sino también de la innovación y optimización de los procesos de purificación (Wheelwright, 1987). En algunos procesos biotecnológicos, las etapas de separación y purificación pueden llegar a suponer entre un 50 y un 80% de los costes de operación.

El diseño de bioprocesos, económicamente rentables, a escala industrial para la purificación de proteínas supone la obtención de rendimientos elevados, altos niveles de pureza y minimización de costes, para lo cual es necesario realizar las siguientes acciones (Asenjo, 1990): (a) definición de las especificaciones del producto final, (b) caracterización de las propiedades fisicoquímicas de la mezcla y (c) definición de las etapas de purificación y de las restricciones del sistema.

La definición del producto final supone el conocimiento previo de la aplicación a la que se va a destinar. En esta etapa es necesario establecer la pureza y concentración requerida de la proteína que se va a obtener, así como los niveles permitidos para cada una de las impurezas que lo acompañan. Las especificaciones comerciales de pureza para las proteínas utilizadas en medicina suelen ser mucho más estrictas que las correspondientes a las proteínas industriales. Esta situación se hace especialmente crítica en el caso de la producción de vacunas, de las que es imprescindible eliminar trazas de determinadas impurezas a fin de evitar posibles reacciones inmunogénicas indeseadas.

El conocimiento de las propiedades fisicoquímicas del caldo de fermentación y de los componentes que lo integran es fundamental para el diseño del proceso de purificación. Es necesario determinar la cantidad y tipo de impurezas presentes, concentración del producto, lugar de localización (citoplasmática, periplásmica, extracelular, cuerpos de inclusión), características fisicoquímicas (punto isoeléctrico, masa molecular, carga, hidrofobicidad, ...) y estabilidad del mismo. Este último aspecto puede influir y determinar el tipo de operación unitaria adecuada para la purificación o discriminar las que no son viables para el mantenimiento de la actividad catalítica propia de la proteína que se persigue purificar.

Una vez realizadas las dos primeras etapas (a) y (b), es necesario definir las operaciones de separación que se incluirán en el proceso. Como primera aproximación se pueden aplicar una serie de reglas heurísticas para la selección de estas etapas (Wheelwright, 1987; Asenjo y Patrick, 1990):

- (i) Seleccionar etapas de separación que se basen en diferentes propiedades físicas, químicas o bioquímicas.

Un proceso de purificación suele ser más efectivo si cada una de las etapas que lo forman se basa en una propiedad diferente de los componentes que se desean separar. Por ejemplo, una operación de ultrafiltración seguida de cromatografía de intercambio iónico o de afinidad.

(ii) Elegir procesos de purificación que maximicen las diferencias entre las propiedades del producto y las impurezas.

Es conveniente conocer las propiedades fisicoquímicas de los componentes de la mezcla con objeto de establecer en cual de ellos difieren más el producto y el resto de sustancias no deseadas que lo acompañan.

(iii) Separar las principales impurezas lo antes posible.

Esto generalmente supone una reducción de la cantidad total de material que se va a procesar, elevando la concentración del producto. Esta situación implica varias ventajas de forma conjunta; en primer lugar la reducción de la corriente que se alimenta a las posteriores etapas disminuye el tiempo de procesado así como los costes de operación asociados a las mismas; en segundo lugar, en el proceso de eliminación de la impureza mayoritaria se suelen eliminar también otras con propiedades similares.

(iv) Realizar la etapa más cara o compleja al final.

A lo largo de un proceso de purificación, el volumen o la masa de material para procesar disminuye a medida que se desarrolla cada una de las etapas que lo componen. Los costes de producción aumentan proporcionalmente a la cantidad procesada por lo que es aconsejable utilizar operaciones de alto coste, como la cromatografía de afinidad, cuando esta cantidad es lo menor posible. Desde el punto de vista técnico, hay operaciones de separación más adecuadas para tratar los elevados volúmenes que existen al inicio del proceso.

(vi) Utilizar una etapa de alta resolución lo antes posible.

Esta regla implica el diseño de procesos de purificación con el menor número de etapas posible y, por tanto, una importante reducción de costes. Por ejemplo, en un proceso constituido por diez etapas en serie, en la que cada una de ellas tenga un rendimiento del 90%, el rendimiento final en el producto de interés será menor del 35% (como muestra la figura 1.1).

Dentro de las etapas de alta resolución destacan, por su versatilidad y facilidad de escalado, las técnicas cromatográficas. Existen diversos tipos diferentes de cromatografía dependiendo del mecanismo de interacción y retención del adsorbato por parte de la fase estacionaria (como se describe en el apartado 1.2), como son la cromatografía de interacción hidrofóbica y en fase reversa, de intercambio iónico, de afinidad, filtración en gel, etc.

Para utilizar de una forma eficaz los métodos de purificación a escala industrial es necesario un profundo conocimiento del comportamiento dinámico del proceso. Una forma adecuada de expresar dicho comportamiento es mediante el uso de modelos matemáticos fenomenológicos. Estos

expresan la evolución temporal de las variables dependientes del proceso de purificación (concentración de salida, pureza, ...) en función de las propiedades fisicoquímicas y condiciones de operación del mismo. Los modelos matemáticos se proponen a partir de una serie de hipótesis basadas en la observación experimental del sistema objeto de estudio y encuentran su utilidad en el desarrollo del diseño del proceso de purificación así como en la simulación y optimación de sus diferentes etapas. Esto último es de gran importancia debido a la considerable contribución de las etapas de separación-purificación en el coste global de producción, pudiendo alcanzar hasta el 80 % del mismo para el caso de determinadas proteínas terapéuticas (Kenney, 1990). La optimación de aquellas, de la forma más rigurosa posible, es fundamental para la rentabilización y viabilidad de cualquier proceso biotecnológico integrado.

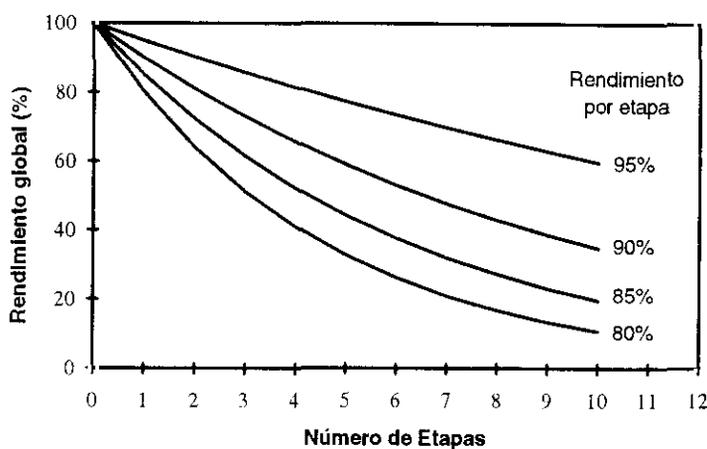


Figura 1.1: Rendimiento obtenido en un proceso de separación-purificación en función de la eficacia de cada etapa.

1.1.- α -AMILASA

La α -amilasa (1,4- α -D-glican glicanohidrolasa; EC 3.2.1.1) es una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces α -1,4-glicosídicos del almidón, quedando como productos de reacción poli- y oligosacáridos de diferente longitud, α -dextrinas y el disacárido maltosa.

La α -amilasa es una enzima presente en prácticamente todos los organismos vivos (Raimbaud *et al.*, 1989; Vihinen y Mäntsälä, 1989). Se han identificado y estudiado α -amilasas desde células procariontas de los géneros (*Bacillus*, *Streptomyces*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Saccharomycopsis*, *Streptococcus*, ...) y eucariotas (*Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Mucor*, *Candida*, *Rhizopus*, ...) hasta plantas superiores (maíz, trigo, cebada, ...), artrópodos (*Drosophila*) y mamíferos (cerdos, ratones, ratas, humanos), posiblemente por ser un mecanismo químico general para la obtención de glucosa para el metabolismo energético de estos organismos.

1.1.1.- Estructura y actividad catalítica

La α -amilasa de *Aspergillus oryzae* es una metaloproteína formada por una cadena polipeptídica que consta de 478 residuos. La estructura primaria se ha determinado mediante secuenciación directa de la cadena polipeptídica (Toda *et al.*, 1982) y también por deducción a partir de la secuencia de nucleotídica del gen que codifica para la proteína (Tada *et al.*, 1989). La molécula puede contener hasta 10 iones Ca^{2+} , aunque sólo uno de ellos no es disociable, siendo esencial para mantener la actividad catalítica y para estabilizar la estructura tridimensional de la proteína (Vallee *et al.*, 1959).

Tabla 1.1: Aminoácidos que forman la α -amilasa de *A. oryzae*.

| Amino ácido | Composición (A) [†] | Composición (B) [‡] | Diferencia (A-B) |
|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| | basado en la secuencia de aminoácidos | basado en la secuencia de nucleótidos | |
| Alanina | 37 | 37 | 0 |
| Arginina | 10 | 10 | 0 |
| Asparagina | 26 | 26 | 0 |
| Ácido Aspártico | 44 | 41 | 3 |
| Cisteína | 10 | 9 | 1 |
| Glutamina | 18 | 19 | -1 |
| Ácido glutámico | 12 | 12 | 0 |
| Glicina | 41 | 41 | 0 |
| Histidina | 6 | 7 | -1 |
| Isoleucina | 27 | 29 | -2 |
| Leucina | 34 | 34 | 0 |
| Lisina | 20 | 20 | 0 |
| Metionina | 9 | 9 | 0 |
| Fenilalanina | 14 | 14 | 0 |
| Prolina | 21 | 20 | 1 |
| Serina | 37 | 36 | 1 |
| Treonina | 40 | 40 | 0 |
| Triptófano | 9 | 10 | -1 |
| Tirosina | 34 | 34 | 0 |
| Valina | 29 | 30 | -1 |
| Total | 478 | 478 | |

Las diferencias encontradas entre las secuencias de aminoácidos obtenidas por ambos métodos (una adición, una supresión y diez sustituciones) no afectan a ningún residuo perteneciente al centro activo, pudiendo deberse a variación entre las cepas utilizadas para cada uno de los estudios

[†] Toda *et al.*, 1982.

[‡] Tada *et al.*, 1989.

(Tada *et al.*, 1989).

La estructura secundaria y terciaria de la α -amilasa de *A. oryzae* se ha estudiado en profundidad mediante difracción de rayos X (Matsuura *et al.*, 1979; Matsuura *et al.*, 1980; Matsuura *et al.*, 1984; Boel *et al.*, 1990; Swift *et al.*, 1991). La molécula es un elipsoide cuyas dimensiones se han calculado en 80 x 45 x 35 Å. La estructura se pliega formando dos dominios principales, amino terminal (residuos 1 al 380) y carboxilo terminal (residuos 384 al 478).

El primero de ellos está constituido a su vez por dos subdominios, denominados A y B. El A (residuos 1 al 121 y 177 al 380) consta de una estructura supersecundaria de barril $(\alpha/\beta)_8$ en la que existen ocho α -hélices rodeando a ocho láminas β , en su mayoría paralelas, que forman el barril. Este tipo de estructura se ha identificado en otros 16 tipos de proteínas, todas ellas con función catalítica (Farber y Petsko, 1990). Asimismo, parece ser una estructura básica en la mayoría de las α -amilasas de diferentes orígenes, incluso en aquellas con baja homología en estructura primaria. De estudios indirectos (MacGregor y Svensson, 1989; Raimbaud *et al.*, 1989) se desprende la conservación de este dominio que es también observado en otras α -amilasas cuya estructura tridimensional se ha determinado en especies tan alejadas como *Aspergillus niger* y cerdo (Brady *et al.*, 1991; Qian *et al.*, 1993).

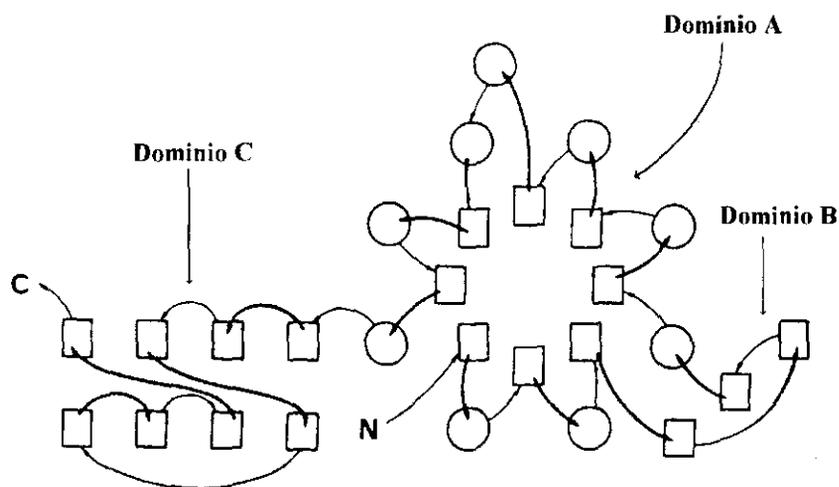


Figura 1.2: Esquema de la disposición de las estructuras de α -hélice (○) y láminas β (□) que forman los dominios A, B y C. Los extremos amino terminal y carboxilo terminal vienen señalados por N y C respectivamente (Fuente: Matsuura *et al.*, 1984).

El pequeño subdominio B (residuos 122 al 176) se localiza a partir del bucle siguiente a la tercera lámina β hasta la tercera α -hélice del subdominio A. Consta de tres hojas β antiparalelas, así como de una región de estructura más irregular formada por bucles de interconexión.

El dominio carboxilo terminal, C, (residuos 384 al 478) pliega ocho estructuras de lámina β

en *sandwich* antiparalelo y está unido al dominio N-terminal por una cadena peptídica compuesta principalmente por aminoácidos hidrofóbicos.

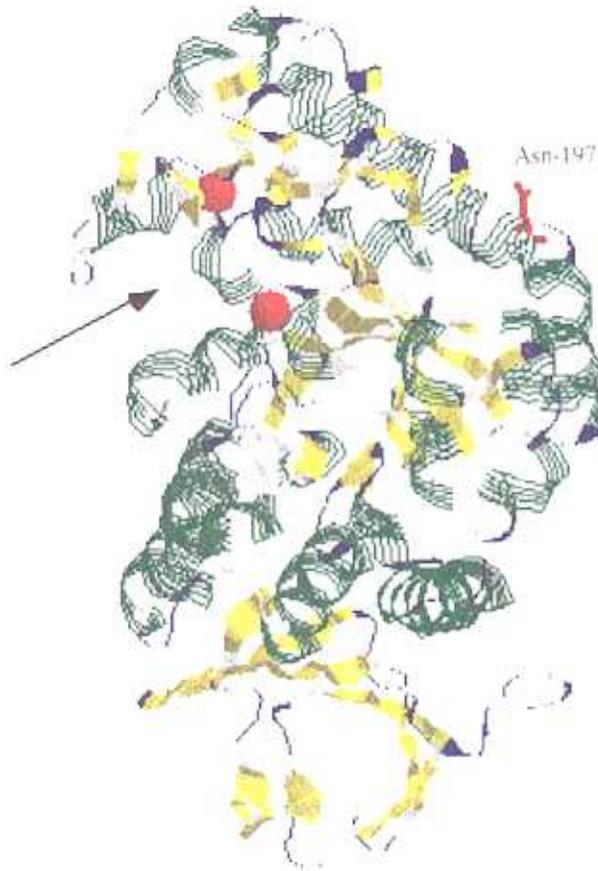


Figura 1.3: Representación de la estructura de la α -amilasa de *A. oryzae*. La flecha señala la hendidura en la que se encuentra el centro activo. Las dos esferas representan los dos iones calcio, el principal en la parte superior y el secundario en la parte inferior de la hendidura. También se señala el residuo de asparagina al que se une el oligosacárido.

En el dominio mayor, A, existe una hendidura hacia el extremo carboxílico del barril (α/β)₈, donde se localiza el sitio de unión del ion Ca^{2+} no dissociable (entre los subdominios A y B), posiblemente cumpliendo una función estabilizadora de la estructura tridimensional de la misma. El centro activo se sitúa en la parte inferior de la hendidura en la que se ha identificado un ion Ca^{2+} secundario en cuya coordinación está implicada la carga negativa del ácido glutámico en posición 230, perteneciente al centro activo, lo que justifica que un exceso de Ca^{2+} produzca una reducción de la actividad catalítica de la α -amilasa por bloqueo del mismo (Boel *et al.*, 1990).

Finalmente, la estructura tridimensional se encuentra estabilizada por cuatro enlaces disulfuro que han sido identificados entre los residuos de cisteína 30-38, 150-164, 240-283 y 439-474

(Matsmura *et al.*, 1984).

En base a la caracterización estructural de la α -amilasa de *A. oryzae*, se la ha clasificado como perteneciente a la clase "todo beta" y al plegamiento, superfamilia y familia " α -amilasas, dominio lámina β " (scop: Structural Classification of Proteins, release 1.35; <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>).

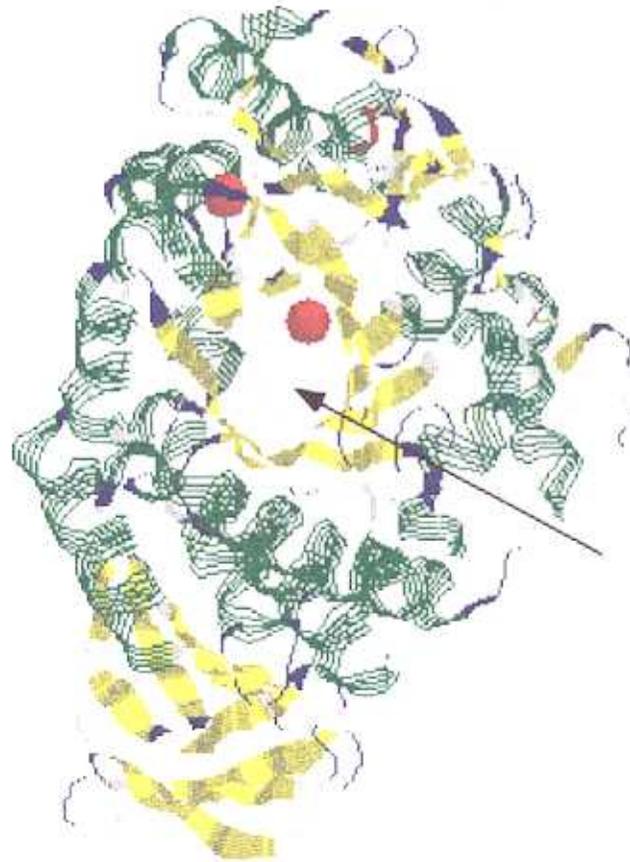


Figura 1.4: Representación de la estructura de la α -amilasa de *A. oryzae*. La flecha señala la posición del interior del barril formado por ocho láminas β .

En las figuras 1.3 y 1.4 se muestran dos proyecciones de la estructura tridimensional de la α -amilasa de *A. oryzae* en las que se distinguen las α -hélices y las láminas β , los dos iones calcio y el residuo en el que se une el oligosacárido (Asn-197). La figura 1.4 representa una rotación de la molécula en la que se observa claramente la estructura del barril descrita anteriormente, en la que ocho láminas β , rodeadas de ocho α -hélices, se disponen paralelamente de forma que dejan un hueco en su interior. Las coordenadas atómicas de la molécula de α -amilasa se han obtenido de la base de datos *Protein Data Bank* del *Brookhaven National Laboratory* (<http://www.pdb.bnl.gov/>; acceso:

2TAA) y se han representado gráficamente mediante el programa RasMac Molecular Graphics, Machintosh version 2.5 (© R. Sayle, 1994).

La α -amilasa es una exoenzima que cataliza la escisión, al azar, de los enlaces α -D-1,4 internos de las largas cadenas de polisacáridos de que se compone el almidón. El almidón, la forma principal de almacenamiento de hidratos de carbono en las plantas, es un polímero de α -D-glucosa que existe como mezcla de dos formas: amilosa y amilopectina. La primera es un polímero prácticamente lineal en el que las subunidades de glucosa se encuentran unidas por enlace α -D-1,4, llegando a alcanzar tamaños cuya masa molecular se encuentra alrededor de 300000. La amilopectina es un polímero ramificado cuya masa molecular puede oscilar entre $1.5 - 3.0 \cdot 10^9$, consistiendo en cadenas lineales formadas por subunidades de glucosa unidas entre si por enlace α -D-1,4 y ramificaciones de 20 a 30 subunidades unidas a la cadena lineal por enlaces α -D-1,6. El almidón procedente de los cereales consiste, aproximadamente, en un 20 - 30% de amilosa y un 80 - 70% de amilopectina.

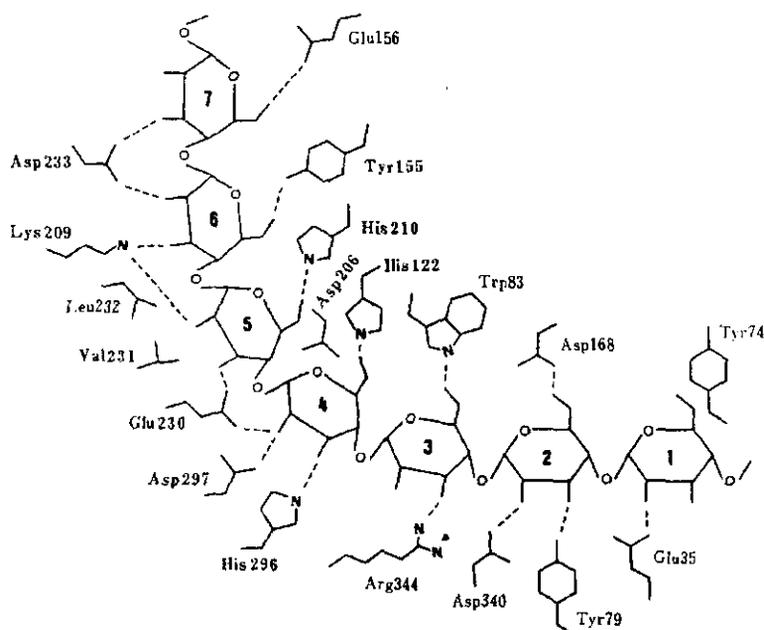


Figura 1.5: Representación del modelo de unión al sustrato y catálisis de la α -amilasa de *A. oryzae* mostrando los residuos de aminoácidos implicados en dicho mecanismo. Las líneas discontinuas representan posibles puentes de hidrógeno entre la enzima y el sustrato (Fuente: Matsuura *et al.*, 1984).

El modelo de unión al sustrato (Matsuura *et al.*, 1984) supone una conformación curvada de la amilosa en la que intervienen siete subunidades contiguas de glucosa que se acoplan al centro catalítico de la enzima mediante enlace con 19 de sus aminoácidos, dos de los cuales (Asp-297 y Glu-230) son los que intervienen directamente en la rotura de un único enlace glicosídico que existe entre

las subunidades de glucosa en posición 4 y 5.

La mayoría, sino todas, las proteínas secretadas por hongos filamentosos se encuentran glicosiladas. En particular, la α -amilasa de *A. oryzae* contiene una sola cadena de oligosacárido unida a un residuo de asparragina (Asn-197). Se han propuesto diferentes estructuras (Yamaguchi *et al.*, 1971; Minobe *et al.*, 1979) constando todas ellas de varias subunidades de manosa unidas a la proteína a través de dos restos de N-acetil glucosamina.

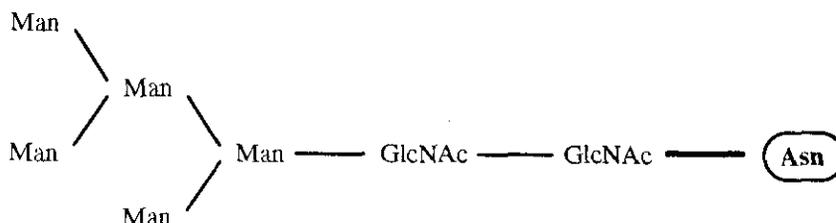


Figura 1.6: Esquema de la estructura del oligosacárido de la α -amilasa de *A. oryzae*, donde Man y GlcNAc representan, respectivamente, subunidades de D-manosa y de N-acetilglucosamina (Minobe *et al.*, 1979).

1.1.2.- Producción

La α -amilasa procedente de *A. oryzae* fue la primera enzima microbiana producida a escala industrial y comercializada (Takamine, 1894). El producto obtenido se denominó "Takadiastasa" y su producción se realizaba mediante cultivo en superficie (denominado semisólido).

Las ventajas de los cultivos sumergidos radican en la mayor facilidad de medir, controlar y modificar los factores y parámetros que influyen en el proceso (pH, temperatura, transferencia de oxígeno, composición del sustrato, ...) (Frost y Moss, 1987).

Debido a la gran importancia económica e industrial de los procesos de fermentación en los que se produce α -amilasa, hay una casi total falta de información acerca de las condiciones de crecimiento y producción de los microorganismos desarrolladas por las compañías productoras. Sin embargo existen bastantes estudios a escala de laboratorio y planta piloto sobre la influencia de las condiciones de operación en las que se desarrolla la fermentación de los diversos microorganismos productores de α -amilasa.

En la actualidad el *A. oryzae* es el microorganismo más ampliamente utilizado como fuente productora de α -amilasa de origen fúngico. En la literatura se encuentran numerosos estudios en los que se investiga la influencia de las condiciones experimentales en el crecimiento del microorganismo y en la producción de α -amilasa, así como de los diferentes tipos de operación en los que se

desarrollan las fermentaciones.

En condiciones similares de operación y para medios de cultivo con diferente composición, la producción de α -amilasa por *A. oryzae* se ve favorecida en fermentaciones realizadas mediante cultivo sumergido agitado frente a aquellas desarrolladas en cultivos líquidos sin agitación (Kundu y Das, 1970). Diferentes autores, por otra parte, obtienen menores niveles de producción utilizando cultivos sumergidos que los alcanzados con cultivos sobre substrato sólido en salvado de trigo o granos de arroz (Meyrath y Bayer, 1980; Nakadai y Nasuno, 1988). Este último tipo de fermentación se ha usado tradicionalmente en Japón para producir el preparado enzimático *koji*.

Respecto a la influencia de la fuente de carbono, se ha encontrado que para cultivos de *A. oryzae* en operación continua, la maltosa induce a la producción de α -amilasa entre un 50 y un 70% más eficazmente que la glucosa (Carlsen, 1994). Otros estudios señalan, tras la maltosa y en orden decreciente de eficacia, el α -metil-D-glicósido y el almidón como inductores de la síntesis de α -amilasa (Yakubi *et al.*, 1977). Sin embargo, el almidón produce mayores niveles de la enzima que la maltosa, dextrinas y otros azúcares simples cuando se utiliza como fuente de carbono para el crecimiento del microorganismo (Malik y Chaudhary, 1977).

Experimentos llevados a cabo en sistemas continuos y semicontinuos (Carlsen, 1994) indican que, en el caso del *A. oryzae*, el crecimiento celular está relacionado, casi linealmente, con la producción de α -amilasa. De esta forma, la actividad enzimática producida disminuye al hacerlo la velocidad específica de crecimiento. Por otro lado, la operación en continuo conduce a producciones de α -amilasa mayores que la operación mediante fermentaciones en semicontinuo.

Junto a los estudios correspondientes a la producción de α -amilasa por *A. oryzae*, existen otros relativos a otras α -amilasas fúngicas. Jarniewicz y Wlodarczyk (1978) seleccionaron una cepa de *A. niger* y desarrollaron un medio de cultivo basado en destilados procedentes de patata suplementado con almidón, obteniendo niveles altos de producción de α -amilasa durante la fermentación. También se han estudiado los parámetros de escalado en fermentadores agitados y aireados para este mismo microorganismo (Ghildyal *et al.*, 1980). El hongo comestible *Calvatia gigantea* produce también elevadas cantidades de α -amilasa en cultivos discontinuos (Kekos y Macris, 1983) a una temperatura de 25 °C, teniendo la enzima obtenida de este organismo características y propiedades muy similares a la procedente de *A. niger*.

Debido a la mayor termoestabilidad que las procedentes de hongos filamentosos, las α -amilasas de origen bacteriano ocupan un lugar importante en la industria, siendo más adecuadas que aquellas para determinadas aplicaciones. El *Bacillus subtilis* fue la primera especie bacteriana utilizada para producir α -amilasa. El cultivo líquido en superficie, utilizado en un principio, dio paso,

posteriormente, a la generalización del cultivo sumergido aireado de este y otros microorganismos productores de enzimas amilolíticas.

Las diferentes α -amilasas procedentes de distintas especies generan una amplia variedad de distribuciones de oligosacáridos como productos finales de la hidrólisis del almidón. La α -amilasa procedente de *Bacillus amyloliquefaciens* produce maltohexosa como componente mayoritario mientras el *Bacillus licheniformis* da, principalmente, maltopentosa y maltosa. La glucosa es obtenida solamente como producto minoritario (Norman, 1981).

Se ha observado que la fermentación de *B. amyloliquefaciens* en operación semicontinua produce un 60% más de actividad amilolítica que en operación discontinua cuando se trabaja a altas concentraciones de sustrato que actúan como inhibidor del crecimiento o cuando se generan cepas mutantes menos eficaces durante el proceso fermentativo (Yoo *et al.*, 1988). La selección de cepas mutantes de baja productividad de α -amilasa también se ha demostrado en fermentaciones en continuo de *B. subtilis* (Fencel y Pazlarova, 1982). En el citado estudio se comprueba que el uso de medios de cultivo en condiciones de limitación de nutrientes se favorece la selección de mutantes de baja productividad. Sin embargo, cuando se cultiva en medios más complejos y ricos en nutrientes, la producción de enzimas extracelulares no es una desventaja y se promueve la selección de cepas superproductoras.

En fermentaciones sumergidas y aireadas de *B. licheniformis* en régimen discontinuo se ha demostrado que la utilización de glucosa como sustrato en lugar de almidón, aumenta la producción de α -amilasa. Paralelamente, la viscosidad del caldo de cultivo se reduce y desaparece el problema de la esterilización del almidón, causa frecuente de contaminación del medio durante las primeras horas del proceso (Tonkova *et al.*, 1993).

Análogamente al comportamiento de la fermentación de *A. oryzae* para producir α -amilasa, la síntesis de la enzima aumenta proporcionalmente con la velocidad específica de crecimiento en el caso de cultivos continuos de *B. licheniformis* (Frost y Moss, 1987). Mediante fermentaciones realizadas en operación semicontinua se alcanzan similares niveles de actividad enzimática que aquellos obtenidos en continuo, sin embargo, en el primer caso, la concentración de α -amilasa en el medio es más elevada (Pazlarova *et al.*, 1984).

La producción de α -amilasa se encuentra reprimida por glucosa e inducida por los fragmentos procedentes de la degradación del almidón. En la fermentación de *B. licheniformis*, los mayores rendimientos en α -amilasa se obtienen utilizando glucógeno y maltotetraosa, mostrándose también eficaz con maltotriosa y maltopentosa. Sin embargo, con disacáridos como la maltosa el rendimiento se reduce al 20% del obtenido con glucógeno, no siendo significativa la producción de α -amilasa

mediante la utilización de diversos monosacáridos (Saito y Yamamoto, 1975).

Gracias al avance de la ingeniería genética, se han logrado desarrollar microorganismos mediante mutación genética y selección fenotípica añadido a procesos de transferencia de genes entre diferentes especies. De este modo se logran obtener altos niveles de expresión de proteínas recombinantes. En general, la producción de este tipo de proteínas se encuentra promovida en condiciones de fermentación que perjudican la velocidad de crecimiento del microorganismo, para alcanzar relaciones más favorables entre la proteína de interés y el resto de proteínas del organismo productor.

En la fermentación del *B. subtilis*, al que se le ha introducido el gen que expresa dicha proteína en la bacteria termófila *Bacillus stearothermophilus*, la sustitución de glucosa por almidón como fuente de carbono hace disminuir la velocidad de crecimiento de las células recombinantes a la vez que favorece la producción de α -amilasa por unidad de masa celular y aumenta el período de tiempo en el que se está produciendo dicha enzima (Lee y Parulekar, 1993). Una estrategia adecuada para la obtención de α -amilasa mediante este microorganismo es la de realizar una primera etapa de fermentación en discontinuo, en la que se favorezca el crecimiento celular, seguida de una fermentación en semicontinuo con las condiciones apropiadas para obtener mayor actividad enzimática. De este modo, se obtienen aumentos de producción enzimática de hasta el 54% respecto al cultivo desarrollado en una sola etapa en discontinuo. En fermentaciones continuas llevadas a cabo con *B. subtilis* recombinante (Wei *et al.*, 1989), se ha comprobado que la actividad específica de α -amilasa disminuye al aumentar la velocidad de dilución así como la velocidad específica de crecimiento de las células recombinantes.

El *A. oryzae* se ha utilizado también como microorganismo huésped para expresar genes que codifican para la α -amilasa correspondientes a cepas mutantes superproductoras (Christensen *et al.*, 1988). Así, se ha conseguido elevar la concentración de α -amilasa en el sobrenadante del medio de fermentación desde 1.0 mg/ml, en el caso de la cepa original de *A. oryzae*, hasta 12.0 mg/ml en el caso de la cepa recombinante.

En la actualidad, no sólo se encuentran patentados procesos de producción en los que se utiliza α -amilasa, recombinante o no, como catalizador de determinadas reacciones químicas sino que también están sujetos a patente los procedimientos de clonación así como los vectores de expresión utilizados para producir enzimas recombinantes (Levin y Joyet, 1986).

Más recientemente, se ha estudiado la producción de enzimas extracelulares mediante el uso de células inmovilizadas. Se ha observado que el crecimiento de células a partir de esporas inmovilizadas de *A. niger*, *Penicillium funiculosum* y *Phanerochaete chrysosporium* por atrapamiento en gel de alginato cálcico produce distribuciones del microorganismo más homogéneas que la

obtenida por inmovilización del micelio ya crecido (Linko *et al.*, 1988). Los valores de temperatura y pH óptimos para la producción de α -amilasa por células de *A. niger* inmovilizadas son similares a las obtenidas para la fermentación utilizando el micelio libre, pero la estabilidad térmica de la enzima obtenida es mayor. La fermentación de *B. subtilis* inmovilizado en gel de *carrageenan* en bioreactores continuos aireados aumenta la producción de α -amilasa en un 20% respecto al cultivo en iguales condiciones con las bacterias en suspensión (Guo *et al.*, 1990).

También se han inmovilizado diversas bacterias termófilas anaerobias en gel de alginato para la producción de α -amilasa y pululanasa mediante fermentación en régimen semicontinuo a 60 °C utilizando almidón como sustrato (Klingeberg *et al.*, 1990). Los niveles de producción de α -amilasa aumentan con la inmovilización, hasta doce veces, en el caso del *Clostridium thermosaccharolyticum* y alrededor de dos veces para una cepa de *C. thermohydrosulfuricum* y para *Thermoanaerobacter finni*. Las fermentaciones llevadas a cabo con otra cepa mutante de *C. thermohydrosulfuricum* y con *Clostridium thermosulfurogenes* no han mejorado los resultados obtenidos mediante el cultivo de esas especies en suspensión.

Sin embargo, otros autores ponen en duda la eficacia y utilidad de las fermentaciones de microorganismos inmovilizados. Se han descrito una serie de problemas relacionados con la producción de α -amilasa por células de *B. amyloliquefaciens* inmovilizadas en gel de alginato cálcico (Argirakos *et al.*, 1992). En estos estudios se han descrito rendimientos inferiores a los alcanzados en fermentaciones tradicionales de dicha bacteria para tiempos altos de operación. Problemas de transferencia de materia, especialmente de oxígeno, degradación e inactivación celular por inhibición debida a la acumulación de material orgánico e inorgánico en el interior de las partículas así como el crecimiento en el medio líquido de las bacterias desorbidas son posibles causas de la falta de efectividad descrita.

1.1.3.- Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades fisicoquímicas de las diferentes α -amilasas varían en un amplio intervalo dependiendo del organismo productor, indicando una importante adaptación evolutiva a las condiciones medioambientales.

El pH óptimo para la actividad de las distintas α -amilasas oscila entre, aproximadamente, 2 y 10.5. Para la mayoría de las α -amilasas producidas por microorganismos de la especie *Aspergillus*, este intervalo se limita a 4.5 - 6.6 (Vihinen y Mäntsälä, 1989). Algunas procedentes de *Bacillus*, fuertemente acidófilos, pueden encontrar su pH óptimo a valores alrededor de 2 y de otros alcalófilos a valores de pH iguales o superiores a 10, aunque para la mayor parte de las α -amilasas procedentes

de bacterias el intervalo óptimo se encuentra entre 4.5 y 6.5.

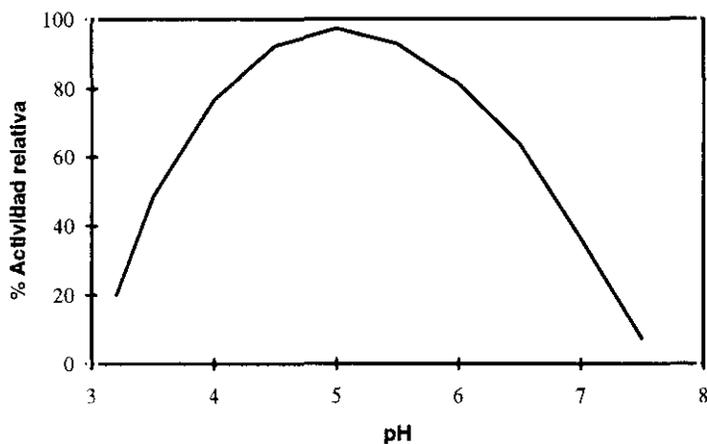


Figura 1.7: Efecto del pH sobre la actividad de α -amilasa de *A. oryzae* a 37 °C (Fuente: Ficha Técnica de Fungamyl® BG, Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dinamarca).

La temperatura de actividad óptima de la α -amilasa producida por el hongo filamentoso *A. oryzae* varía entre 35 y 55 °C, en función de la cepa que lo produce. La actividad hidrolítica de la α -amilasa procedente de bacterias del género *Bacillus* es óptima, generalmente, a valores más altos de temperatura, llegando hasta los 100 °C en algunas cepas de *B. licheniformis* (Piggott *et al.*, 1984).

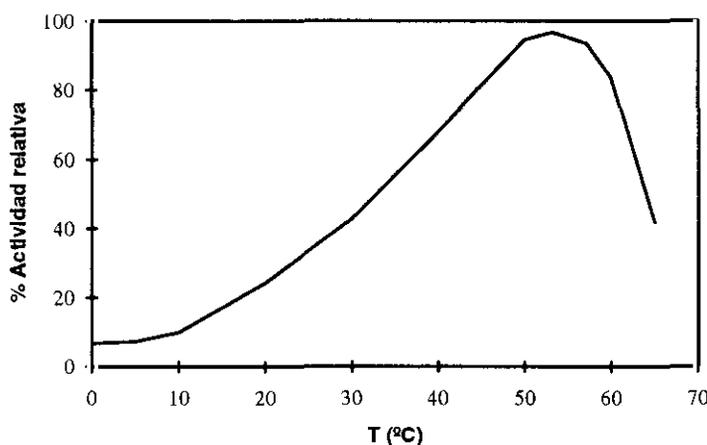


Figura 1.8: Efecto de la temperatura sobre la actividad de α -amilasa de *A. oryzae* a un pH de 4.7 (Fuente: Ficha Técnica de Fungamyl® BG, Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dinamarca).

En general, la mayoría de las α -amilasas son estables en los intervalos fisiológicos habituales de temperatura y pH. La estabilidad de las enzimas no solo depende de las condiciones de pH y temperatura sino, también, de la composición del medio en el que se encuentren. El intervalo de pH en el que las enzimas son estables, se modifica en función de la temperatura y el tiempo de incubación

en unas condiciones determinadas. En general, puede hablarse de una mayor termoestabilidad de las α -amilasa procedentes de *Bacillus*. Algunas cepas de *B. stearothermophilus* mantienen el 100% de la actividad tras una incubación a 70 °C durante 24 horas (Manning y Campbell, 1961; Manning *et al.*, 1961).

La α -amilasa de *A. oryzae* es una enzima extremadamente estable en el intervalo de pH 5 - 8, no detectándose desactivación, de forma significativa, tras largos períodos de tiempo en estas condiciones (Carlsen, 1994). En la figura 1.9 se muestra la estabilidad de la α -amilasa en función del pH a dos diferentes tiempos de incubación.

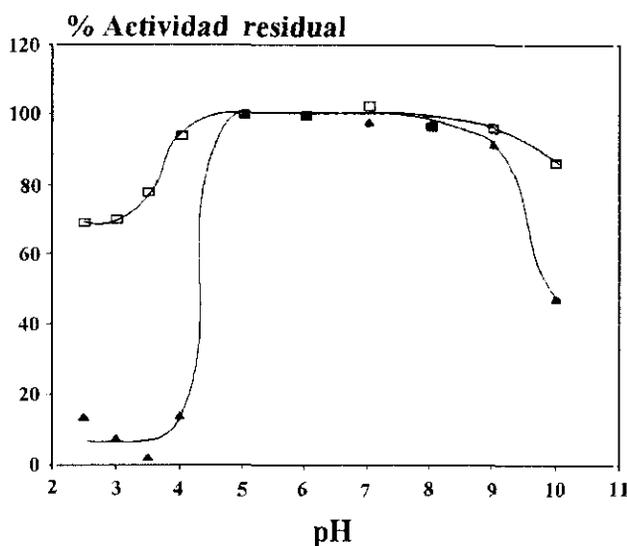


Figura 1.9: Estabilidad de la α -amilasa de *A. oryzae* en función del pH del medio. Incubada a 30 °C durante 30 minutos (□) y durante 14 horas (Δ) (Fuente: Carlsen *et al.*, 1996).

En condiciones más extremas, ácidas y básicas, la enzima se desactiva en gran medida en un intervalo muy estrecho de pH. Bajo incubación a pH ácido, la inactivación de la α -amilasa de *A. oryzae* sigue una cinética de primer orden, cuya constante aumenta parabólicamente con la disminución de la concentración de protones en el medio (Carlsen *et al.*, 1996). Estos mismos estudios indican que el proceso de reactivación de α -amilasa desactivada por ácido sigue también una cinética de primer orden, aunque la recuperación de actividad no es, en ningún caso, total. En la figura 1.10 se muestra el proceso de reactivación a diferentes valores de pH. Este mecanismo de inactivación propuesto supone la existencia de dos formas inactivas de α -amilasa, una de las cuales está en equilibrio reversible con la forma original activa cuando se aumenta el pH hasta valores neutros. La otra forma corresponde a una α -amilasa irreversiblemente inactiva (Carlsen, 1994).

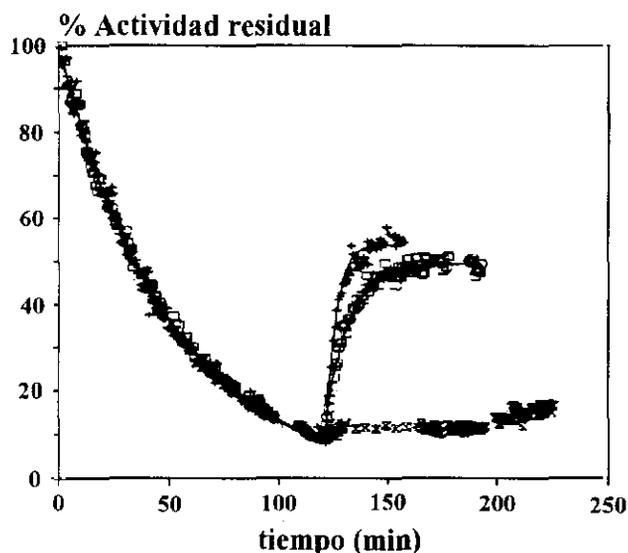


Figura 1.10: Reactivación de α -amilasa de *A. oryzae* inactivada por ácido a diferentes valores de pH. Tras incubación a pH 3.5 durante 120 minutos (desactivación), se aumentó a: pH 7.5 (+), pH 6.0 (□) y pH 5.0 (X), respectivamente (reactivación) (Fuente: Carlsen *et al.*, 1996).

Respecto a la inactivación térmica de la α -amilasa, cuando la temperatura aumenta por encima de un cierto nivel, las enzimas en disolución acuosa sufren un desplegamiento parcial causado por la ruptura, inducida térmicamente, del equilibrio de interacciones no covalentes que mantienen la estructura nativa de la molécula (Tomazic y Klibanov, 1988b). Esta desactivación, que supone la pérdida estructural del centro activo, es completamente reversible si la temperatura se disminuye rápidamente hasta valores de estabilidad. Para tiempos de incubación más prolongados, el grado de recuperación de la actividad enzimática no es total, lo que pone de manifiesto la existencia de un proceso irreversible de desactivación. La causa de este proceso se debe, probablemente, a un proceso monomolecular conformacional de formación de estructuras terciarias incorrectas acompañado, en función del pH, de oxidación de los residuos de cisteína o de deamidación de los residuos que contienen grupos amido. La termoinactivación irreversible puede evitarse, parcialmente, por adición de sustrato (Tomazic y Klibanov, 1988b). Este proceso se ha estudiado en α -amilasa procedente de una bacteria mesófila, *B. amyloliquefaciens*, y de otra termófila, *B. stearothermophilus*, siendo esta última mucho más estable debido a la existencia de puentes salinos extra entre dos o tres residuos de lisina (Tomazic y Klibanov, 1988a).

En el caso de la α -amilasa de *A. oryzae*, se ha estudiado la inactivación térmica cuando se encuentra inmovilizada sobre soportes de diferente naturaleza (Ulbrich *et al.*, 1986). Para este caso, se propone un mecanismo cualitativamente similar al mencionado anteriormente de la desactivación ácida de esta misma enzima. En él, la enzima activa se puede convertir a una forma inactiva final y en

un intermedio inactivo que, en función de la evolución de la temperatura, puede revertir tanto a la forma inactiva final como a la molécula de enzima activa.

Otros muchos factores pueden afectar a la estabilidad de la enzima, incluyendo la pureza del preparado (Hanzawa *et al.*, 1986), la presencia de calcio u otros iones (Vallee *et al.*, 1959), la adición de sustrato y otras sustancias estabilizantes (Janecek y Balaz, 1992; De Cordt *et al.*, 1994), la concentración de la disolución (Graber y Combes, 1990). La presencia de otras proteínas, como la seroalbúmina bovina, actúa como molécula estabilizadora, probablemente debido a que el aumento de la concentración de proteínas es ventajoso cuando existen proteasas contaminantes de la preparación (Carlsen, 1994).

La estabilización estructural y mantenimiento de la actividad catalítica de la α -amilasa por efecto de iones Ca^{2+} ha sido parcialmente comentada en la descripción de la estructura de dicha proteína. La de *A. oryzae* es, de todas las α -amilasas estudiadas, la que presenta una unión más fuerte al Ca^{2+} principal ($K_a \approx 10^{12} - 10^{15} \text{ M}^{-1}$) (Valee *et al.*, 1959). Mientras que la actividad hidrolítica de las α -amilasas de otros orígenes se ve inhibida por la presencia de un agente quelante como el etilén diamino tetraacetato (EDTA), la procedente de *A. oryzae* mantiene prácticamente intacta la suya debido a que la unión es tan fuerte que no es capaz de eliminar el Ca^{2+} principal de la enzima. Por otro lado, se ha comprobado que la existencia del ion calcio protege a la α -amilasa de la acción de enzimas proteolíticas (Stein y Fischer, 1958), indicando la formación de una estructura más compacta.

La existencia de otros iones pueden tener también efecto sobre la estabilidad y actividad de la α -amilasa. Así, la función del Ca^{2+} puede sustituirse, aunque con menor efectividad, con otros cationes divalentes como Sr^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} o Zn^{2+} e incluso algún cation monovalente, Na^+ (Vihinen y Mäntsälä, 1989). La presencia de Cl^- induce a un leve cambio conformacional en α -amilasa de páncreas porcino que hace aumentar 30 veces la magnitud de la constante cinética y la constante de unión al Ca^{2+} principal en 240 (Levitzki y Steer, 1974). Otros aniones monovalentes producen este efecto aunque en menor medida según aumentan sus radios iónicos. El Zn^{2+} parece jugar un papel de centro de unión en la dimerización de la α -amilasa procedente de *B. subtilis* (Valee *et al.*, 1959).

1.1.4.- Aplicaciones

Se ha estimado que el mercado mundial de enzimas industriales, en el año 1994, fue de unos 1.200 millones de dólares y se encuentra actualmente creciendo a un ritmo del 10% anual (Krauczyk, 1997). A nivel mundial la industria de los detergentes es la que mayor uso hace de las enzimas, con un 39% del total del mercado. A continuación se encuentra la industria textil (14%) y la industria de procesado de almidón (12%) (Novo Nordisk, 1995).



Figura 1.11.: Demanda del mercado de enzimas en Estados Unidos, año 1994 (Krauczyk, 1997).

La α -amilasa es una enzima de gran importancia económica ya que es utilizada en numerosas aplicaciones industriales en campos de utilización muy diversos. A continuación se hará un repaso de los diferentes usos que, de esta enzima, hace la industria.

Procesado del almidón

El almidón forma suspensiones en agua que, mediante calentamiento adecuado, llegan a gelificar. Es decir, los gránulos hidratados e hinchados se disuelven, aumentando rápida y significativamente la viscosidad de la suspensión. La temperatura a la que este proceso ocurre depende del origen del almidón, variando entre 58 y 72 °C.

Con objeto de cuantificar la extensión de la hidrólisis así como el tamaño de los productos finales de la hidrólisis, se define el grado de hidrólisis o equivalente de dextrosa (GH) y el grado de polimerización (GP). El primero de ellos se refiere a la cantidad de azúcares reducidos expresados como glucosa y calculados como porcentaje de sustancia total seca. El grado de polimerización es el número de subunidades de glucosa que contiene una cadena de oligo- o polisacárido.

El almidón se utiliza en diversos procesos como fuente de azúcares sencillos y oligosacáridos que sirven, posteriormente, de materia prima en aquellos. Para ello es necesario hidrolizar el almidón hasta obtener un producto con el GH y el GP adecuado para cada proceso. Dicha hidrólisis puede llevarse a cabo mediante la acción del calor y de ácidos fuertes. De esta forma, sin embargo, la aplicación a usos alimentarios se ve limitada debido a la introducción de sabores indeseados en el producto final cuando se alcanzan valores de GH superiores a 15-20 (Pepler y Reed, 1987). Otro problema adicional sería el medioambiental derivado del uso de ácidos minerales fuertes. Una alternativa al tratamiento anteriormente descrito es el uso de enzimas amilolíticas que evitan los efectos negativos expuestos, así como permiten una mejora en el control del proceso.

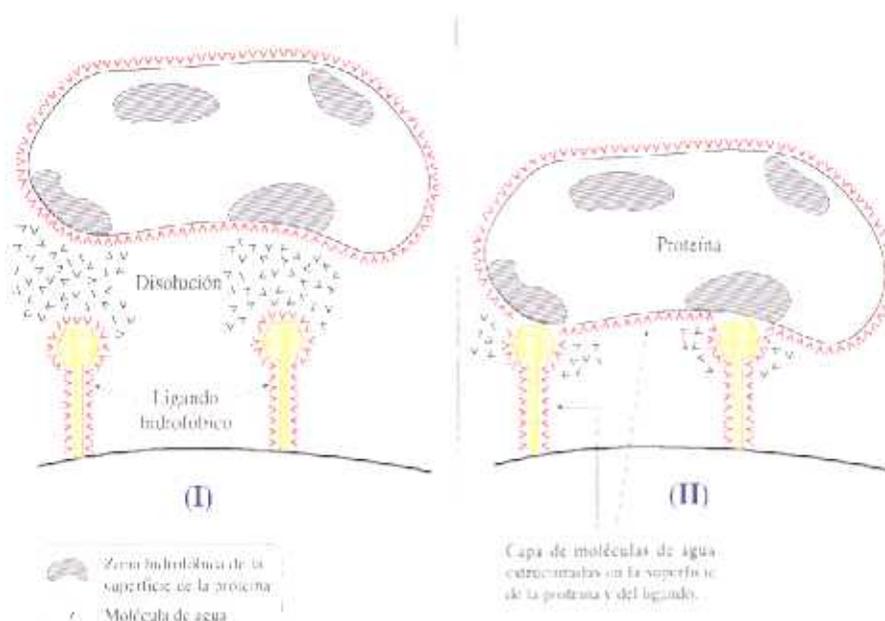


Figura 1.15: Esquema del mecanismo de interacción hidrofóbica. Las moléculas de agua se estructuran alrededor de la proteína en disolución y de cada ligando (I). Las moléculas de agua se eliminan de las zonas de interacción (II).

La fuerza impulsora que dirige la adsorción mediante interacciones hidrofóbicas es la ganancia de entropía del sistema (Hjertén, 1973; Hausnaugh *et al.*, 1984). Una molécula de proteína en disolución mantiene una o varias capas de moléculas de agua estructuradas alrededor de su superficie. Esta situación es termodinámicamente inestable ya que supone una disminución importante de la entropía en comparación con la de la proteína sin solvatar más la correspondiente a las moléculas libres de agua (Scopes, 1987). Para que se produzca la interacción entre las zonas no iónicas de la superficie externa de la proteína y de un ligando hidrofóbico del adsorbente, esta capa deberá eliminarse (figura 1.15). En el proceso de interacción, debido al aumento del desorden de la fase móvil, aumentará la entropía del sistema ($\Delta S^0 > 0$). En estos procesos el cambio entálpico suele ser pequeño por lo que la variación de energía libre, dada por la expresión [1.1] es negativa, ocurriendo el proceso de forma espontánea.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad [1.1]$$

La teoría solvofóbica (Sinanoglu y Abdulnur, 1965; Halicioğlu y Sinanoglu, 1969) describe el efecto del disolvente en la agregación de las zonas no iónicas entre diferentes moléculas de biopolímeros a partir de los cambios termodinámicos correspondientes al equilibrio de asociación de macromoléculas en disolución. La solubilización de cada molécula de biopolímero supone la creación de una cavidad entre las moléculas de disolvente. En base a ello, se ha desarrollado un modelo teórico que trata de explicar y predecir la retención de los adsorbatos en HIC (Melander y Horváth, 1977; Horváth *et al.*, 1977). En él se propone que la magnitud de la interacción hidrofóbica y, por tanto, de

de reacción entre 6 y 42 horas a pH 4.5-6.0.

Producción de etanol

En la bibliografía se han descrito numerosos materiales que contienen almidón como materia prima para la producción de etanol, como son el maíz (Wilke *et al.*, 1981), patatas y trigo (Maiorella *et al.*, 1981), raíz de mandioca (Lindeman y Rocchiccioli, 1979), etc.

En general, los carbohidratos procedentes de las plantas que contienen almidón no son directamente fermentables por la mayoría de las levaduras, debiendo ser previamente hidrolizados a azúcares más simples. Por ello, en primer lugar, el almidón, es hidratado y gelificado mediante molienda y calentamiento para posteriormente degradarlo a azúcares fermentables mediante el uso de enzimas amilolíticas (α -amilasa, β -amilasa, glucoamilasa, ...).

Se han descrito procesos económicamente rentables a escala industrial para la producción de etanol a partir de almidón de mandioca mediante fermentación no convencional tras la adición de enzimas amilolíticas procedentes de hongos (Ueda *et al.*, 1981). También se utiliza la α -amilasa, junto con otras enzimas amilolíticas, como sustituto parcial de la malta en la producción de diferentes bebidas alcohólicas (whisky, ron, bourbon, saké, etc.). Este mismo principio se ha venido utilizando desde 1945 para producir etanol como combustible.

Producción de cerveza

De manera análoga que en la producción de licores, la industria cervecera hace uso de la α -amilasa con el fin de aumentar la cantidad de azúcares fermentables para producir alcohol, reduciendo a su vez la cantidad de carbohidratos en la composición final de la cerveza. También se añade α -amilasa en determinados momentos del proceso con el objeto de disminuir la alta viscosidad, debido a la existencia de almidón gelificado, a valores razonablemente bajos (Peppler y Reed, 1987). Los procesos tradicionales utilizan malta como fuente de almidón y proteínas, así como diferentes enzimas, entre las que se encuentran las amilolíticas. La sustitución de esta malta por cereales no malteados junto con enzimas amilolíticas y proteolíticas, reduce costes de producción y facilita la uniformidad en la calidad del producto final.

Una aplicación más reciente de la α -amilasa en la industria cervecera es la producción de cervezas con bajo contenido calórico. En condiciones normales de elaboración, las enzimas presentes en la malta no hidrolizan por completo el almidón a azúcares fermentables, quedando aproximadamente un tercio del almidón transformado en dextrinas no fermentables pero que aportan energía al ser metabolizadas por el organismo. La adición de amilasas suplementarias permite la

degradación de todo el almidón a azúcares fermentables que se convertirán en alcohol y dióxido de carbono.

Producción de jarabes azucarados y edulcorantes

Una de las aplicaciones de la α -amilasa con mayor importancia económica es para la industria de bebidas. Entre ellas destaca la producción de jarabes azucarados y edulcorantes de alto contenido en glucosa y fructosa procedentes del maíz. Estos productos se utilizan como sustitutos de los jarabes de sacarosa en la industria de alimentación y bebidas.

En 1940 se patentó el uso de enzimas comerciales y almidón hidrolizado en la fabricación de jarabes de maíz (Langois y Dale, 1940). La primera aplicación industrial de una enzima inmovilizada fue la producción en continuo de jarabes de alto contenido en fructosa mediante la acción combinada varias enzimas amilolíticas (Venkatasubramanian, 1978), dando paso al estudio de la inmovilización de amilasas sobre numerosos soportes (Wykes *et al.*, 1971; Linko *et al.*, 1975; Babu y Venkatram, 1989; Siso *et al.*, 1990) en procesos de transformación del almidón (licuefacción y sacarificación). La utilización de enzimas inmovilizadas en los procesos de hidrólisis del almidón frente al uso de enzimas en disolución tiene una serie de ventajas económicas y técnicas. Por un lado reduce los costes de operación por la posibilidad de reutilizar la enzima y por otro se consigue un mayor control de la reacción así como una mayor estabilidad de la enzima.

Panificación

La producción de pan requiere la utilización de sustancias emulsionantes que se añaden a la mezcla de harina, agua, levadura y otros componentes y cuya función es la de acondicionar la masa y suavizar la textura del pan (miga) una vez cocido. Un adecuado acondicionamiento de la masa produce un incremento en la facilidad de mezcla y procesamiento de la misma, mayor capacidad de retención de gases, mayor volumen y mejor textura del producto acabado.

La α -amilasa puede ser utilizada como sustituto de los emulsionantes habitualmente utilizados por la industria panadera (ésteres del ácido diacetil tartárico, estearoil lactilato sódico, monoglicéridos, ...). Para una serie de estos, un aumento en el efecto suavizador de la masa va acompañado por una disminución en el efecto suavizador de la miga. El uso de α -amilasa favorece el aumento del volumen del pan una vez cocido debido a la producción de azúcares susceptibles de servir de sustrato a la levadura, prolongando la fermentación y produciendo mayor cantidad de alcohol y dióxido de carbono. Por otro lado, reduce la fuerza de la miga debido a la hidrólisis parcial del almidón presente en la harina que gelifica durante el proceso de cocción por lo que también se logra un retardo en el endurecimiento del pan (Hille, 1990).

Producción de azúcar

El almidón es un componente natural de la caña de azúcar que se encuentra en cantidades variables en función de la variedad y condiciones de crecimiento de la planta. Su presencia en cantidades altas puede crear dificultades en el proceso de refinado del azúcar, causando bajas velocidades de filtración, bajos índices de cristalización así como turbidez en algunas disoluciones preparadas con los azúcares producidos (Namer *et al.*, 1987). La adición de α -amilasa permite reducir el contenido de almidón en el proceso de producción de azúcar, aumentando el rendimiento y evitando la aparición de los problemas citados derivados de la presencia de almidón.

Detergentes

La α -amilasa (junto con otras enzimas amilolíticas, proteasas, celulasas, lipasas, etc.) se encuentra presente en la composición de muchos de los detergentes que se comercializan, con la función de actuar sobre las manchas procedentes de alimentos y sustancias ricas en almidón. En 1903, Otto Röhm patentó el uso de una proteasa, la tripsina pancreática, aunque su efectividad se reducía debido a la inactivación producida por la alcalinidad del detergente en disolución. La introducción generalizada de las amilasas en la formulación de los detergentes para ropa se realizó a partir de 1980 (Krauczyk, 1997). Posteriormente, la composición enzimática de los detergentes se ha completado con la adición de lipasas y celulasas. Las industrias fabrican detergentes con diferente composición en enzimas para cada país o área geográfica en función de la dieta habitual de sus habitantes e incluso de las costumbres y medios de lavado. En Hispanoamérica, las amilasas se han utilizado en grandes cantidades debido a que su dieta es rica en alimentos que contienen almidón.

Industria textil

Durante el proceso de tejeduría a partir de algodón o de mezclas de algodón y fibras sintéticas, los hilos se exponen a una considerable tensión mecánica. Con el fin de evitar su rotura, se recubren con una sustancia adhesiva y gelatinosa. Esta sustancia, denominada agente de encolado, suele estar compuesta de almidón o de derivados de este a los que se les pueden añadir otros polímeros como el alcohol de polivinilo, ácido poliacrílico, o carboximetil celulosa. Una vez tejido es necesario eliminar por completo el recubrimiento para lo que se pueden utilizar productos químicos fuertes como ácidos, bases o agentes oxidantes. Sin embargo, desde hace años se ha preferido el uso de amilasas que hidrolizan el almidón totalmente sin dañar la tela evitando, paralelamente, el alto nivel de contaminación de las aguas residuales del proceso (Novo Nordisk, 1992).

Producción de acetona y butanol

El proceso Weizmann produce acetona y butanol mediante la fermentación de azúcares por el *Clostridium acetobutylicum*. Dichos azúcares se obtienen tras los procesos de licuefacción y sacarificación por vía enzimática del almidón procedente de maíz, trigo, centeno u otros cereales generando glucosa y maltosa como productos finales (Beech, 1953).

Producción de ácido láctico

La maltosa y glucosa procedente de la hidrólisis enzimática del almidón de maíz se utiliza como sustrato en la producción de ácido láctico por fermentación mediante *Lactobacillus thermophilus* o *Lactobacillus amylophilus* (Mashell, 1959; Nakamura y Crowell, 1979).

Biomasa microbiana

El almidón y los residuos de la industria del almidón sirve como fuente de materia prima renovable para la producción de biomasa microbiana. A pesar de que algunas bacterias son capaces de utilizar almidón, en la mayoría de los casos es necesaria una hidrólisis previa del mismo para permitir su metabolización (Busta *et al.*, 1977).

1.1.5.- Métodos de purificación

Muchos de los trabajos publicados sobre purificación de α -amilasa están orientados a la preparación de pequeñas cantidades de enzima para su posterior caracterización y estudio. Esta circunstancia hace que los procedimientos utilizados se centren en la obtención de la máxima pureza a expensas de conseguir muy bajos rendimientos y costes unitarios muy elevados. La cristalización de α -amilasa procedentes de diferentes organismos para realizar estudios estructurales mediante difracción de rayos X es un ejemplo significativo de esta situación (Qian *et al.*, 1993; Brady *et al.*, 1991; Swift *et al.*, 1991; Ramasubbu *et al.*, 1991; Boel *et al.*, 1990; Buisson *et al.*, 1987; Matsuura *et al.*, 1979; Campbell, 1954; Akabori *et al.*, 1954).

El almidón entrecruzado ha sido utilizado como soporte de afinidad ya que este polímero es el sustrato natural de la α -amilasa (Somers *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1994; Rozie *et al.*, 1991; Somers y Van't Riet, 1990).

La extracción en sistemas de dos fases acuosas utilizando polietilén glicol/sulfato muestra buenos resultados para la purificación de α -amilasa procedente del caldo de la fermentación de *B. subtilis* (Schmidt *et al.*, 1994). Procedimientos basados en estos sistemas se encuentran patentados (Ananthapadmanabhan, 1988). En ellos se utilizan polietilén glicol, polipropilén glicol, alcohol

polivinílico, dextrano, poliéteres de silicona, etc. Relacionados con los últimos se encuentran estudios realizados sobre la concentración de α -amilasa mediante la extracción con micelas reversas (Dekker *et al.*, 1991).

La cromatografía de intercambio iónico y de interacción hidrofóbica se han utilizado eficazmente también como método de purificación de la enzima (Geng *et al.*, 1990; Szepesy *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1992). Todos estos estudios están encaminados a la investigación del mecanismo de retención implicado o al desarrollo de métodos preparativos para la obtención de la enzima purificada. La información sobre aspectos cinéticos y termodinámicos así como la aplicación de modelos matemáticos que describan el comportamiento de la operación de adsorción de α -amilasa en este tipo de sistemas es muy escasa y se encuentra muy dispersa.

1.2.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El desarrollo y comercialización de nuevos productos a través de la biotecnología requiere una adecuada coordinación y disposición de las operaciones unitarias con el fin de diseñar procesos eficaces que permitan alcanzar los objetivos específicos planteados. De forma general, los objetivos de un proceso son los de obtener productos de alto valor añadido a partir de materias primas relativamente baratas.

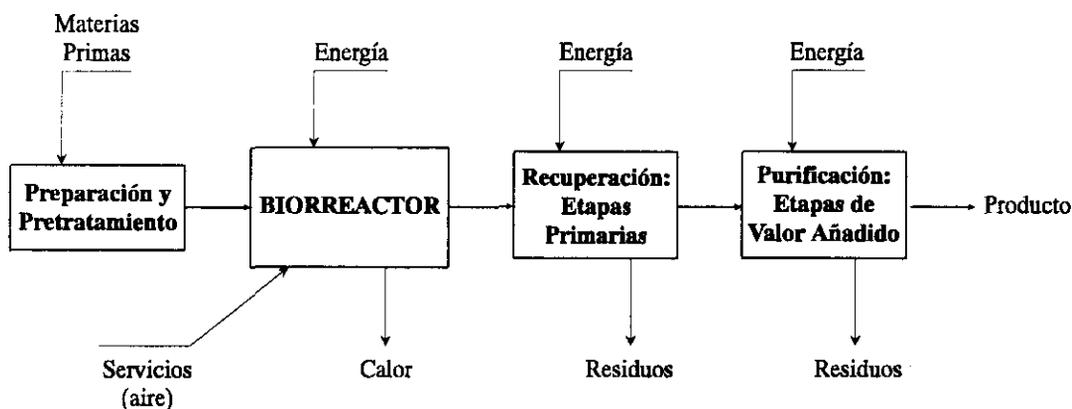


Figura 1.14: Esquema de un proceso bioquímico típico

La operación central de un proceso biotecnológico es la ocupada por el biorreactor, lugar donde se transforman las materia primas en productos mediante biocatálisis, fermentación o cultivo celular (ver figura 1.14). Sin embargo, esta etapa no tendría utilidad práctica si se encontrase aislada. Es necesario realizar una preparación y un pretratamiento adecuado a las materias primas y una posterior separación y purificación del producto o productos de valor generados en el biorreactor.

Las operaciones unitarias de separación basan su eficacia de trabajo en la explotación de una propiedad característica diferenciadora entre el producto de interés y el resto de los componentes de la mezcla. Los efluentes de los biorreactores suelen ser complejos, formados por un gran número de sustancias con características similares. Esto hace necesario utilizar diferentes procedimientos en serie para lograr la purificación final del producto de interés. En la tabla 1.2 se muestran las operaciones unitarias de separación habituales en procesos biotecnológicos, indicando la propiedad diferencial en la que se basa cada uno de ellos.

Tabla 1.2: Operaciones de separación.

| Operación | Propiedad fisicoquímica |
|-----------------------------|---|
| Centrifugación | Velocidad de sedimentación |
| Filtración, Microfiltración | Tamaño de partícula |
| Homogeneización | Naturaleza intracelular |
| Extracción en 2 fases | Coefficiente de reparto |
| Precipitación | Solubilidad (interacción electrostática e hidrofóbica) |
| Adsorción física | Fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, momento dipolar. |
| Intercambio iónico | Carga eléctrica |
| Afinidad | Afinidad biológica, función |
| Interacción hidrofóbica | Hidrofobicidad superficial |
| Ultrafiltración | Tamaño molecular |
| Filtración en gel | Tamaño molecular |
| Fase reversa | Interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas |
| Electroforesis | Punto isoelectrico, carga eléctrica, tamaño molecular, conformación |

1.2.1.- Etapas primarias

Una vez realizada la reacción, en el efluente del biorreactor se encuentra el producto para el que se ha diseñado el proceso. La misión de las etapas primarias de purificación o etapas de recuperación es la de concentrar el componente de interés, eliminar la mayor cantidad de subproductos y, en la medida de lo posible, reducir el volumen del efluente que será tratado en las etapas posteriores.

En el caso de fermentaciones para producir compuestos secretados al medio (extracelulares), la primera operación será la separación de las células productoras del caldo de fermentación. Esta

puede realizarse mediante centrifugación o filtración. Esta última pese a la mayor sencillez del equipo utilizado, presenta la desventaja de que la compresibilidad de las células o del micelio depositado sobre el filtro disminuye la permeabilidad, dificultando la operación (Belter, 1985). La aplicación de la filtración tangencial aumenta el caudal de filtrado, respecto a la filtración tradicional en condiciones equivalentes, en un factor de 100 a 1000 (Gabler, 1985). Otra alternativa atractiva la constituye la separación mediante el uso de membranas de fibras huecas (Tutunjian, 1985).

Previamente a la separación de las células del fermentador, si el producto de interés queda en el citoplasma, es necesaria la liberación del mismo por ruptura de la pared celular mediante métodos mecánicos, lisis química o enzimática, choque osmótico, calentamiento, congelación-descongelación, uso de células mutantes con pared celular deficiente, etc. (Engler, 1985).

Una vez clarificado el medio a purificar, pueden aplicarse gran número de procesos que sirven para concentrar el producto de interés, generalmente bastante diluido, e ir eliminando contaminantes principales. Entre estas etapas pueden destacarse las correspondientes a los procesos de membrana: ultrafiltración, ósmosis inversa, microfiltración de flujo cruzado y diálisis (Fane y Radovich, 1990), que permiten la separación en base a la diferencia en el tamaño molecular de los componentes.

Las separaciones llevadas a cabo en sistemas de dos fases inmiscibles permite una elevada afinidad en condiciones suaves no desnaturizantes para las proteínas (Albertsson *et al.*, 1990). Su aplicación a la recuperación de proteínas y ácidos nucleicos es relativamente reciente, pese a ser esta una técnica conocida y aplicada a otras sustancias desde hace tiempo. La razón es que hay pocas proteínas solubles en disolventes orgánicos comunmente utilizados en la industria química y la mayoría de ellos produce un elevado grado de desnaturización en las proteínas. La sustitución de la extracción tradicional en dos fases, acuosa/orgánica, por dos fases acuosas inmiscibles realizadas a partir de polímeros solubles (polipropilén glicol - alcohol polivinílico, metilcelulosa - dextrano, etc.) permite la formación de un entorno favorable para las moléculas biológicamente activas evitando, así, su desnaturización (Kula, 1985).

La precipitación suele utilizarse en las etapas iniciales del diagrama de flujo, produciendo tanto purificación como concentración, aunque es esta última acción la que realiza de forma más efectiva. Es una operación técnicamente sencilla y económica, ya que es posible el uso de gran número de agentes precipitantes, muchos de ellos de muy bajo coste y que no producen la desnaturización de los productos biológicos (Glatz, 1990).

1.2.2.- Etapas de purificación de alto valor añadido

En los casos en los que sea necesario cumplir con las exigentes especificaciones impuestas por la industria farmacéutica, cosmética o de alimentación, será necesario recurrir a la aplicación de

etapas de purificación más eficaces y selectivas. Las especificaciones mencionadas pueden referirse al grado de pureza del producto, a los niveles máximos de determinados contaminantes o a ambos.

Pese a la alta efectividad de separación y purificación que tienen los métodos electroforéticos, su aplicación a nivel industrial no se halla generalizada, aunque se han descrito algunos trabajos sobre el escalado de la purificación de α -amilasa de *B. subtilis* mediante autoenfoco (Dobrnsky *et al.*, 1987).

La cromatografía, es, posiblemente, la técnica más ampliamente difundida como etapa de alta eficacia en los procesos de purificación utilizados en biotecnología. La denominación de cromatografía es muy general y engloba a todos los sistemas basados en la interacción entre moléculas disueltas en un líquido (o en un gas) con la superficie de un sólido o con ligandos unidos a un sólido inerte. Dentro de ella, dependiendo del mecanismo responsable de la interacción, pueden diferenciarse numerosas técnicas:

- Filtración en gel.
- Afinidad.
- Interacción hidrofóbica y fase reversa
- Intercambio iónico.

Los sistemas cromatográficos de filtración en gel se basan en la diferente difusividad que sufren las moléculas de distinto tamaño al atravesar una columna rellena de una matriz de porosidad determinada. En operación normal, las moléculas de mayor tamaño, al no entrar en el interior de los poros del polímero de la fase estacionaria, atraviesan la columna más rápidamente que las moléculas pequeñas. Esto se debe a que el paso de estas últimas por la columna se retarda al introducirse y difundirse por el interior de la matriz porosa de la fase estacionaria. Esta característica hace que esta operación sea adecuada y muy utilizada como procedimiento para desalar disoluciones de biopolímeros. Las fases estacionaria habituales están basadas en polímeros como son dextrano entrecruzado, poli(acrilamida o agarosa. La porosidad se produce al gelificar estas sustancias en contacto con el agua. La naturaleza de estos polímeros, hace que no sean excesivamente rígidos por lo que no permiten la utilización de elevados caudales de funcionamiento. Actualmente están apareciendo nuevos soportes que palfan en cierta medida este efecto negativo. Estos soportes rígidos son de vidrio modificado, sílice funcionalizada o polímeros como el poli(2-hidroxi-etil metacrilato) (Yarmush *et al.*, 1985). Su utilización de forma más generalizada a nivel industrial está condicionada por el limitado desarrollo que presenta en operación en régimen continuo.

El término cromatografía de afinidad (Cuatrecasas *et al.*, 1968) se refiere a la interacción bioespecífica entre dos sustancias, una en solución y otra unida a un soporte sólido. Es una herramienta muy valiosa en la purificación de sustancias biológicamente activas. La biomolécula se

une, generalmente de forma covalente, a un ligando unido a un soporte sólido inerte. Debido a la alta bioespecificidad, mediante la cromatografía de afinidad se pueden obtener rendimientos elevados por el ahorro de etapas previas que supone. Los soportes de afinidad suelen ser caros debido a que no son muy versátiles en cuanto a número de diferentes aplicaciones posibles. Deben diseñarse para cada adsorbato que se quiera purificar ya que una mayor versatilidad llevará acompañada una menor bioespecificidad. Las matrices deberán ser fácilmente derivatizables con el fin de poder unir el ligando adecuado para la aplicación deseada. Las matrices utilizadas son geles de agarosa, vidrio poroso, sílice, poliacrilamida, celulosa y diversos hidroxialquil metacrilatos (Yarmush y Colton, 1985). Los últimos desarrollos en cromatografía de afinidad están enfocados al desarrollo de procesos de inmunoadsorción. Esto suponen la unión de un antígeno a un anticuerpo inmovilizado a la matriz o viceversa, logrando así una especificidad en la adsorción no conseguida por ningún otro procedimiento. La técnica se hace todavía más efectiva si se utilizan anticuerpos monoclonales (Horstmann, 1989).

En el presente trabajo se realizará el estudio de la adsorción de α -amilasa mediante interacción hidrofóbica e intercambio iónico. A continuación se revisarán con mayor detalle los aspectos teóricos y experimentales correspondientes a ambos mecanismos.

Interacción hidrofóbica

A principios de los años 70 se comenzaron a utilizar fases estacionarias compuestas por ligandos ligeramente hidrofóbicos, alquilaminas de diferente longitud de cadena, unidos covalentemente a matrices inertes de gel de agarosa (Er-El *et al.*, 1972; Shaltiel y Er-El, 1973) con el fin de separar y purificar proteínas. El término *Cromatografía de Interacción Hidrofóbica*, HIC, fue introducido por Hjertén (1973) para referirse a la separación de proteínas mediante las interacciones mediadas por sales que se producen entre las zonas hidrofóbicas de la superficie de las mismas con los ligandos hidrofóbicos de la fase estacionaria. Las primeras fases estacionarias diseñadas especialmente para su aplicación en HIC se desarrollaron para paliar la relativa baja eficacia de las anteriores debido a su poca resistencia física que no las hacían adecuadas para su uso en columnas de alta presión. Consistían en matrices silíceas con un recubrimiento polimérico de carácter hidrofílico y ligandos n-butilo y fenilo (Kato *et al.*, 1983). Más recientemente se han desarrollado fases estacionarias con matrices poliméricas hidrofílicas proporcionando, junto con una elevada resistencia física, una gran estabilidad química que permite su utilización a valores extremos de pH (Cooke *et al.*, 1990). Esta circunstancia es, sobre todo, adecuada para la regeneración del soporte ya que la separación o purificación de proteínas a pH altamente ácido o alcalino produce, generalmente, la desnaturalización de las mismas.

A altas concentraciones salinas, los biopolímeros se unen a la fase estacionaria mediante interacciones hidrofóbicas que se atenúan al disminuir la concentración de sal en la fase móvil, eluyéndose, de esta manera, en orden creciente de su carácter hidrofóbico. Esta relación se ha comprobado también para aminoácidos funcionalizados (Gehas y Wetlaufer, 1990). Entre los ligandos habitualmente utilizados, los de tipo alquílico son los que producen adsorbentes más hidrofóbicos, seguidos de los de tipo fenólico, poliéteres y glicoles, siendo necesarias fases móviles de mayor concentración salina para quedar adsorbidos en estos últimos.

La cromatografía en fase reversa es una técnica, fundamentalmente analítica, que comparte con la HIC el uso de la diferente hidrofobicidad de las moléculas como propiedad que proporciona diferente selectividad y afinidad por un determinado soporte. La diferencia entre ambos tipos de adsorción reside en el grado de interacción proteína-ligando. En el caso de cromatografía en fase reversa, la densidad superficial de los ligandos unidos a la matriz es muy elevada, por lo que la interacción con el adsorbato es tan fuerte que es necesario añadir disolventes orgánicos a la fase móvil para disminuir la tensión superficial de la misma y permitir, así, la elución de las biomoléculas retenidas. En estas condiciones se produce la pérdida de la estructura nativa de las proteínas, quedando expuestos los residuos hidrofóbicos del interior de la molécula, lo cual conduce a un incremento adicional en la intensidad de la interacción. La interacción que producen los ligandos en HIC es más suave debido a la mayor dispersión de los mismos, pudiéndose variar la fortaleza de la interacción hidrofóbica modificando la densidad superficial de los ligandos en el soporte (Fausnaugh *et al.*, 1984). Debido a la menor hidrofobicidad de la fase estacionaria en HIC, en la etapa de elución se pueden utilizar fases móviles que no desnaturalizan apreciablemente las proteínas. También se ha estudiado el uso de tensioactivos de carga neta nula que, por su naturaleza, no producen efectos desnaturalizantes en la estructura de las proteínas a la vez que disminuyen su retención en columnas con adsorbentes hidrofóbicos debido a un efecto competitivo entre la proteína y el agente tensioactivo por los ligandos correspondientes (Buckley y Wetlaufer, 1989; Buckley y Wetlaufer, 1990). Por ello, estas sustancias pueden ser utilizadas como agentes moduladores de la elución en HIC.

Los fenómenos fisicoquímicos subyacentes en el mecanismo de la HIC de proteínas son análogos a los correspondientes al efecto salino por el cual la solubilidad de las proteínas se reduce en presencia de concentraciones crecientes de sales neutras. Sin embargo, a pesar de dicha analogía, este efecto es consecuencia de las interacciones hidrofóbicas proteína-proteína a diferencia del mecanismo de retención en el proceso de HIC que es el resultado de las interacciones inducidas por sales entre las proteínas y los centros de unión, ligeramente hidrofóbicos, de la fase estacionaria.

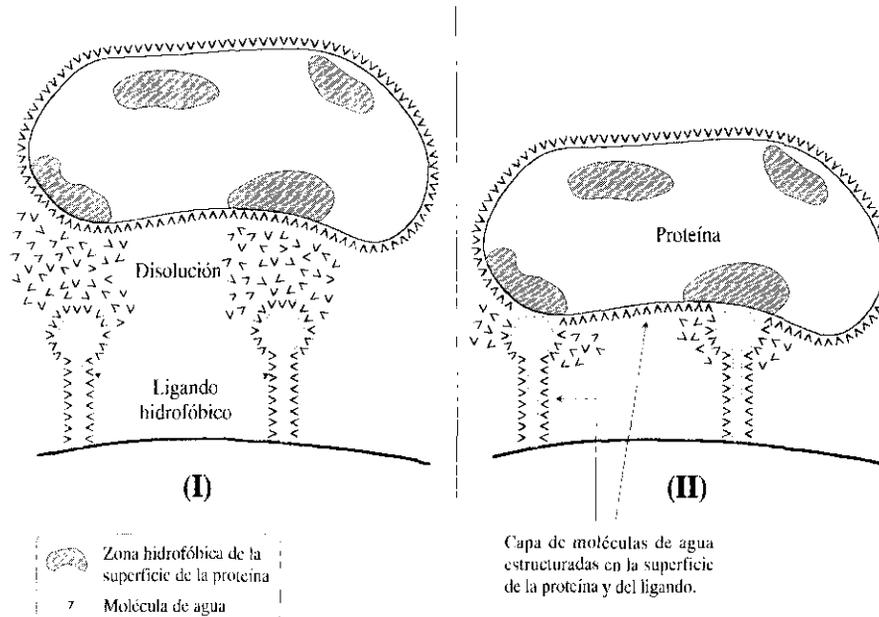


Figura 1.15.: Esquema del mecanismo de interacción hidrofóbica. Las moléculas de agua se estructuran alrededor de la proteína en disolución y de cada ligando (I). Las moléculas de agua se eliminan de las zonas de interacción (II).

La fuerza impulsora que dirige la adsorción mediante interacciones hidrofóbicas es la ganancia de entropía del sistema (Hjertén, 1973; Fausnaugh *et al.*, 1984). Una molécula de proteína en disolución mantiene una o varias capas de moléculas de agua estructuradas alrededor de su superficie. Esta situación es termodinámicamente inestable ya que supone una disminución importante de la entropía en comparación con la de la proteína sin solvatar más la correspondiente a las moléculas libres de agua (Scopes, 1987). Para que se produzca la interacción entre las zonas no iónicas de la superficie externa de la proteína y de un ligando hidrofóbico del adsorbente, esta capa deberá eliminarse (figura 1.15). En el proceso de interacción, debido al aumento del desorden de la fase móvil, aumentará la entropía del sistema ($\Delta S^0 > 0$). En estos procesos el cambio entálpico suele ser pequeño por lo que la variación de energía libre, dada por la expresión [1.1] es negativa, ocurriendo el proceso de forma espontánea.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad [1.1]$$

La teoría solvofóbica (Sinanoglu y Abdulnur, 1965; Halicioglu y Sinanoglu, 1969) describe el efecto del disolvente en la agregación de las zonas no iónicas entre diferentes moléculas de biopolímeros a partir de los cambios termodinámicos correspondientes al equilibrio de asociación de macromoléculas en disolución. La solubilización de cada molécula de biopolímero supone la creación de una cavidad entre las moléculas de disolvente. En base a ello, se ha desarrollado un modelo teórico que trata de explicar y predecir la retención de los adsorbatos en HIC (Melander y Horváth, 1977; Horváth *et al.*, 1977). En él se propone que la magnitud de la interacción hidrofóbica y, por tanto, de

la retención de las moléculas de adsorbato, viene determinada por un balance de energías de Van der Waals, electrostáticas e hidrofóbicas implicadas en la unión del adsorbato sobre los grupos funcionales de la fase estacionaria. En cromatografía, una forma adecuada de expresar la retención de un soluto es mediante el factor de capacidad, k' , que viene definido de la forma siguiente:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad [1.2]$$

donde t_R y t_0 son, respectivamente, los tiempos de retención correspondientes al adsorbato y a un soluto que no se adsorba, en iguales condiciones de operación.

La relación entre el factor de capacidad y los cambios termodinámicos ocurridos en HIC, de acuerdo con el modelo citado puede expresarse como:

$$\ln k' = -\frac{1}{RT} \left(\Delta G_{\text{cav.}}^0 + \Delta G_{\text{e.e.}}^0 + \Delta G_{\text{vdW}}^0 + \Delta G_{\text{asoc.}}^0 + \Delta G_{\text{red.}}^0 \right) + \ln \left(\frac{RT}{PV} \right) + \xi \quad [1.3]$$

Los tres primeros términos, $\Delta G_{\text{cav.}}^0$, $\Delta G_{\text{e.e.}}^0$ y ΔG_{vdW}^0 , representan la variación de energía libre neta entre la fase móvil y la estacionaria asociada con la formación de cavidades, con los efectos electrostáticos y las interacciones de Van der Waals respectivamente. $\Delta G_{\text{asoc.}}^0$ corresponde al cambio de energía libre para la asociación ligando-adsorbato en ausencia de disolvente que lo rodee (es decir, el que correspondería a una fase gaseosa) y $\Delta G_{\text{red.}}^0$ es la reducción en energía libre debida a las interacciones disolvente-ligando y disolvente-adsorbato no tenidas en cuenta en los tres primeros términos. Los valores V y P son, respectivamente, el volumen molar medio del disolvente y la presión de operación. El parámetro ξ es constante para cada columna y está relacionado con la concentración de ligandos accesibles de la misma.

Únicamente los tres primeros términos son dependientes de la concentración de sal en la fase móvil (Melander *et al.*, 1984) por lo que la ecuación anterior, para un sistema cromatográfico determinado, puede simplificarse de la siguiente forma:

$$\ln k' = \gamma' - \frac{1}{RT} \left(\Delta G_{\text{cav.}}^0 + \Delta G_{\text{e.e.}}^0 + \Delta G_{\text{vdW}}^0 \right) \quad [1.4]$$

donde γ' es un valor constante que engloba a los términos no dependientes de la concentración salina.

De acuerdo con la teoría solvofóbica, $\Delta G_{\text{cav.}}^0$ depende linealmente de la concentración salina en el disolvente:

$$\Delta G_{\text{cav.}}^0 = -\Delta A_s \sigma m + \gamma'' \quad [1.5]$$

siendo ΔA_s la diferencia en el área superficial del ligando y la molécula de adsorbato expuestos a la fase móvil entre los estados adsorbido y en solución, correspondiendo al área molecular de contacto

en la unión ligando-adsorbato. El parámetro σ es el incremento molal de tensión superficial de la sal, m es la concentración molal de sal en el disolvente y γ'' un parámetro constante.

La contribución energética debida a interacciones electrostáticas se determina a partir de la aplicación de la teoría de Debye-Hückel mediante la siguiente expresión:

$$\Delta G_{e.e.}^0 = A - \frac{B (m^{1/2})}{1 + C (m^{1/2})} - D \mu m \quad [1.6]$$

donde μ es el momento dipolar de la proteína y A, B, C y D son valores constantes para cada adsorbato, siendo A y B proporcionales a la carga neta de la proteína y C y D están relacionados con el tamaño molecular de la misma.

La contribución de las fuerzas de Van der Waals, aunque de menor magnitud que las anteriores, depende linealmente de la concentración de sal:

$$\Delta G_{vdw}^0 = v m + \gamma''' \quad [1.7]$$

representando v y γ''' un valor constante para cada pareja sal-macromolécula y fase estacionaria.

De esta forma, la ecuación 1.3 puede reescribirse como:

$$\ln k' = - \frac{B (m^{1/2})}{1 + C (m^{1/2})} - D \mu m + \Delta A_s \sigma m + v m + \gamma \quad [1.8]$$

En el límite, para valores de la fuerza iónica suficientemente elevados, el logaritmo del factor de capacidad depende linealmente de la molalidad de la sal, por lo que, definiendo el *parámetro de interacción hidrofóbica*, λ , se obtiene la siguiente expresión:

$$\ln(k'/k'_0) = \lambda m \quad [1.9]$$

donde k'_0 es el factor de capacidad en ausencia de sal y el parámetro de interacción hidrofóbica viene definido por $\lambda = \Delta A_s \sigma + v - D \cdot \mu$.

Como puede observarse, el parámetro de interacción hidrofóbica está en relación directa con el área de contacto entre proteína y ligando. Se ha estudiado y confirmado esta relación para una serie de proteínas (Katti *et al.*, 1987), observándose también que dicho área de contacto es directamente proporcional al área superficial correspondiente a las zonas hidrofóbicas accesibles de la superficie exterior de la molécula de proteína, considerando propiedades superficiales y cargas netas constantes para cada una de ellas.

De acuerdo con el desarrollo termodinámico anterior, la retención del adsorbato aumentará

con la temperatura. Sin embargo, su influencia no ha sido completamente generalizada. Se han descrito sistemas en los que la temperatura no tiene un claro y determinante efecto positivo sobre la intensidad de la adsorción (Hjertén, 1973). En otros casos, la dependencia de la retención con la temperatura, aunque globalmente aumenta en un amplio margen (0-50 °C), existen intervalos en los que la influencia sobre la retención es prácticamente nula (Lu *et al.*, 1986; Wu *et al.*, 1986), debido, posiblemente, a cambios conformacionales de la proteína a diferentes temperaturas.

Como ya se ha indicado, la adsorción por interacción hidrofóbica está inducida por la presencia de sales disueltas. Sin embargo, no todos los iones tienen el mismo efecto sobre la intensidad de la adsorción de las moléculas de proteína sobre los ligandos hidrofóbicos. La capacidad de un ion para estructurar las moléculas de agua en torno a él (efecto anticaotrópico) está en relación directa con la fortaleza de la interacción. Al solvotarse, los iones hacen disminuir el número de moléculas de disolvente (agua) disponibles en el medio, por lo cual disminuye la solubilidad de la proteína y aumenta la tensión superficial de la disolución aumentando, por tanto, la retención del adsorbato. El efecto de los iones descrito sigue el orden propuesto por Hofmeister (figura 1.16) para el efecto de diferentes iones en la solubilidad de las proteínas (Roe, 1989)

Esta propiedad se ha utilizado para optimar la separación de mezclas de proteínas con diferente comportamiento ácido-base, amplio intervalo de masas moleculares y carácter hidrofóbico (El Rassi *et al.*, 1990). La inclusión de varias sales con diferente efecto sobre la interacción hidrofóbica en la elución de la mezcla de proteínas permite modular, con mayor eficacia, la retención de cada una de ellas en sistemas de HIC.

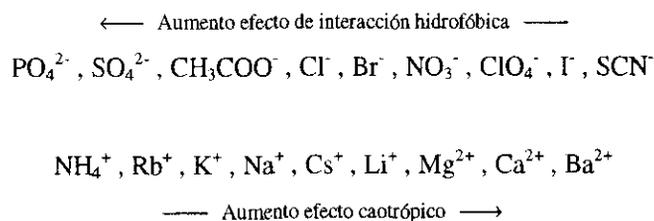


Figura 1.16: Series de Hofmeister

En determinados casos, se ha observado que algunas sales de magnesio no producen los resultados predichos por la teoría Melander-Horváth (Arakawa y Timasheff, 1982; Arakawa y Timasheff, 1984a; Arakawa y Timasheff, 1984b). La adición de MgSO_4 en HIC produce retenciones menores, aunque regulares, que las que les correspondería por su efecto en la tensión superficial mientras que el uso de MgCl_2 produce resultados irregulares, difíciles de correlacionar (Szepesy y Horváth, 1988). Como causa de esta desviación se ha propuesto la existencia de interacciones

preferenciales entre los iones salinos y la proteína en disolución (Arakawa, 1986), aunque también podría estar relacionado con un cambio estructural de dicha proteína (Fausnaugh y Regnier, 1986).

Otro factor que puede tener importancia en la HIC, por su efecto sobre las cargas eléctricas de la proteína y el adsorbente, es el pH. La hidrofobicidad de una proteína es máxima cuando su carga neta es nula, es decir, cuando el pH del medio coincide con su punto isoeléctrico. En general, la disminución del pH hace aumentar la interacción entre la molécula de proteína y los grupos no iónicos de los ligandos hidrofóbicos, especialmente los aromáticos y otras estructuras con orbitales electrónicos π . En este caso se ha propuesto (Scopes, 1987) que la nube de electrones se asocia a las proteínas en áreas cargadas positivamente que se encuentran adyacentes a las cadenas laterales de los residuos hidrofóbicos de la cadena polipeptídica. Como al disminuir el pH aumentan las cargas positivas y disminuyen las cargas repulsivas de signo negativo, la fuerza de la interacción se intensifica. Cuando se utilizan adsorbentes alifáticos más simples, especialmente si se unen mediante un enlace que cree una carga positiva como en el caso del bromuro de cianógeno, el efecto de la disminución del pH sobre la retención puede darse en sentido opuesto debido a mecanismos paralelos de intercambio iónico. En el marco de la teoría solvofóbica, se ha descrito que, para un determinado sistema cromatográfico, la variación del pH no afecta significativamente al parámetro de interacción hidrofóbica (pendiente en la ecuación 1.9) aunque sí lo hace sobre el valor de k_0 (Fausnaugh y Regnier, 1986). Esto indica que la ionización, a pesar de que no altera la superficie hidrofóbica de contacto, sí modifica la intensidad de la adsorción.

Las características físicoquímicas del adsorbente también son de gran importancia en el comportamiento de la adsorción por interacción hidrofóbica. La longitud del ligando es un factor que afecta a la selectividad y la retención de proteínas en HIC. Para experimentos realizados con adsorbentes producidos por unión de ligandos alquílicos de diferente longitud de cadena y, por tanto, de diferente hidrofobicidad, los de mayor longitud mostraban una mayor retención, a igualdad del resto de las condiciones de operación (Fausnaugh *et al.*, 1984; Gooding *et al.*, 1986). Sin embargo, la hidrofobicidad relativa de diferentes columnas puede ser modificada mediante la utilización de distintas sales (Szepeszy y Rippel, 1992a; Szepeszy y Rippel, 1992b).

Intercambio iónico

La purificación mediante adsorción por intercambio iónico se basa en la retención selectiva, por parte del sólido intercambiador de iones, de las especies químicas implicadas debida a la diferente distribución de carga eléctrica expuesta en la superficie externa las mismas.

Los aminoácidos que componen las proteínas contienen grupos ionizables que, en función de las condiciones del medio, pueden encontrarse cargados o no. Las cargas positivas se deben a los

grupos funcionales pertenecientes a las cadenas laterales de los residuos de arginina, lisina e histidina y, en menor medida, a los grupos amino terminales. Por otro lado, las cargas negativas que portan las cadenas polipeptídicas son debidas a los grupos carboxilo de los ácidos aspártico y glutámico, a los grupos carboxilo terminales y, más débilmente, a los grupos tiol de los residuos de cisteína. En la tabla 1.3 se muestran los valores de pK correspondientes a los grupos susceptibles de ionización que se encuentran en los aminoácidos que componen una proteína.

Tabla 1.3: Valores intrínsecos de pK de los diferentes grupos ionizables de las proteínas (Creighton, 1993).

| Grupo Ionizable | pK |
|---------------------------|-------------|
| α -Amino | 6.8 - 8.0 |
| α -Carboxilo | 3.5 - 4.3 |
| β -Carboxilo (Asp) | 3.9 - 4.0 |
| γ -Carboxilo (Glu) | 4.3 - 4.5 |
| δ -Guanidino (Arg) | 12.0 |
| ϵ -Amino (Lys) | 10.4 - 11.1 |
| Imidazol (His) | 6.0 - 7.0 |
| Tiol (Cys) | 9.0 - 9.5 |
| Fenoxi (Tyr) | 10.0 - 10.3 |

Las interacciones electrostáticas producidas entre los grupos con carga opuesta juegan un papel importante en la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas. Dependiendo de la cantidad relativa de aminoácidos básicos y ácidos y en función, principalmente, de las condiciones de pH así como de la temperatura, fuerza iónica o presencia de otros compuestos, las proteínas muestran una carga neta que puede variar desde valores positivos hasta negativos. El pH al cual la carga neta es nula se denomina punto isoelectrico, pI. Debido a que la variación del pH del medio modifica la carga neta de la proteína, la capacidad del intercambiador de iones se ve también afectada.

Las proteínas tienen estructuras tridimensionales y distribuciones superficiales de carga que son características, por lo que su purificación o separación del medio en que se encuentran mediante adsorción por intercambio iónico puede ser una operación muy selectiva y eficaz. Como ilustración de la alta sensibilidad y selectividad que presenta este mecanismo, se han realizado estudios en los que se comprueba que la sustitución de 2 residuos de aminoácidos cargados en una β -lactoglobulina hace cambiar sustancialmente su tiempo de retención en sistemas de cromatografía líquida (Yamamoto *et al.*, 1987). Junto a la alta selectividad comentada, la cromatografía de intercambio iónico presenta la ventaja de no necesitar, en general, la utilización de fases móviles de naturaleza tóxica o

desnaturalizante para las proteínas presentes.

Los adsorbentes de intercambio iónico utilizados industrialmente presentan una alta capacidad de retención, son duraderos y fácilmente regenerables. Por otro lado, su coste es sensiblemente inferior a los utilizados en cromatografía de afinidad. Por todo ello, la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico es una operación empleada frecuentemente a escala industrial para la purificación de proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, antibióticos y otros productos de interés en la industria de alimentación (Wang, 1990).

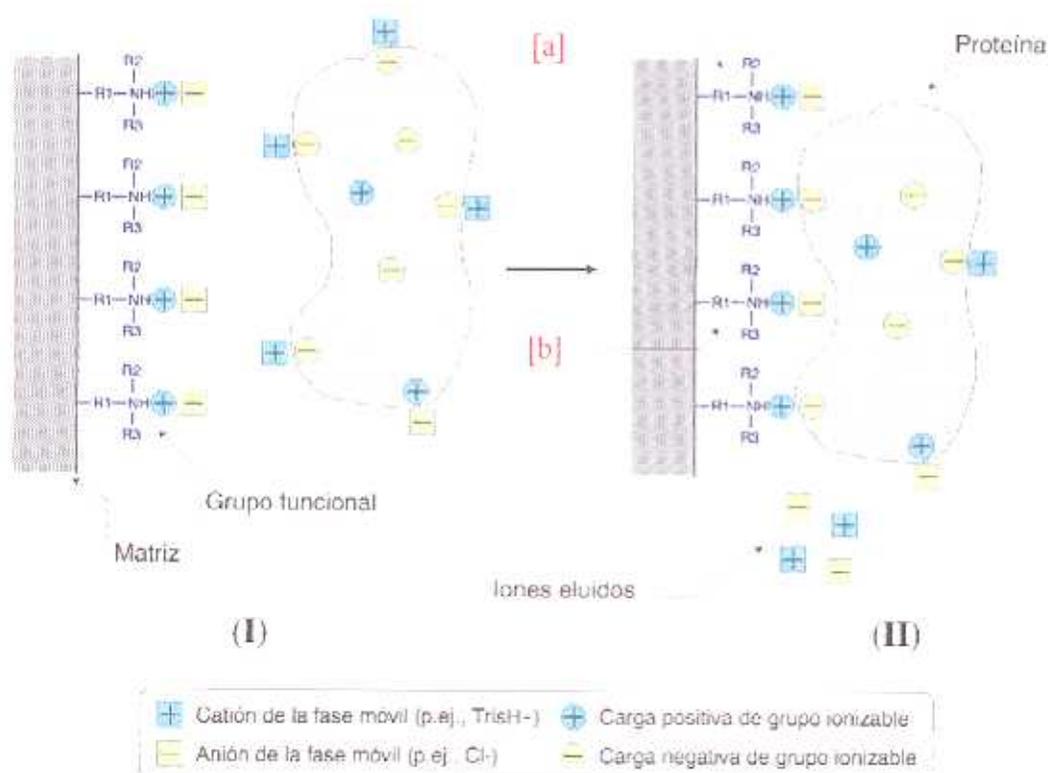


Figura 1.17: Esquema del proceso de intercambio de iones que experimentan los grupos funcionales de un soporte (p.ej., amina terciaria) por la acción de una proteína con carga neta negativa. Los iones Cl⁻ y TrisH⁺, asociados a los grupos ionizados del soporte y la proteína respectivamente implicados en la unión de ambos, son eluidos en el seno de la fase móvil, quedando grupos funcionales estéricamente impedidos [b] e impedidos no estéricamente [a].

El equilibrio de intercambio iónico de biomoléculas es más complejo que el de iones salinos o moléculas de pequeño tamaño en lo referente a su comportamiento cromatográfico. Debido al gran tamaño molecular de las proteínas, la capacidad de retención del adsorbente representa una fracción del número total de grupos funcionales unidos a la matriz, generalmente menor del 15%. Esto se debe a efectos estéricos por los que una molécula de proteína puede bloquear determinados centros de adsorción o dificultar la unión de otras moléculas a ligandos vecinos. La capacidad máxima de un adsorbente de intercambio iónico depende del tamaño del adsorbato, su forma, la distribución

superficial de carga y la orientación con que interaccionan adsorbato y adsorbente. Debido a estos efectos, la capacidad de adsorción de una resina de intercambio iónico disminuye, de una forma casi lineal, al aumentar el logaritmo de la masa molecular de la proteína (Scopes, 1981).

Las resinas de intercambio aniónico o catiónico consisten en una matriz inerte, generalmente porosa, a la que se encuentran unidos ligandos que contienen grupos ionizables con carga positiva o negativa, respectivamente. Estos grupos funcionales se encuentran neutralizados por el correspondiente ión de signo opuesto, denominado contraión. Mediante el mecanismo de intercambio iónico, una proteína con carga neta de igual signo que el contraión desplaza a uno o varios de estos, quedando unida al ligando. Las proteínas en disolución también tienen sus cargas neutralizadas por sus correspondientes contraiones. En la figura 1.17 se muestra, esquemáticamente, el mecanismo descrito.

Existe un conocimiento relativamente escaso del mecanismo de intercambio iónico en su aplicación a péptidos y proteínas (Wang, 1990) debido a una serie de factores característicos de este tipo de sistemas que a continuación se señalan:

- El valor de pK de los grupos básicos o ácidos débiles de los residuos de aminoácidos puede variar en función de los residuos de su entorno.
- La estructura terciaria de las cadenas polipeptídicas puede modificarse al variar las condiciones de pH, concentración salina, temperatura o por la presencia de determinadas sustancias en el medio.
- En los intercambiadores iónicos de carácter débil la densidad de carga y la capacidad total de retención puede modificarse por cambios de pH, afectando de esta forma al equilibrio de adsorción.
- En ocasiones, la unión de una biomolécula al sólido adsorbente se debe a un mecanismo mixto de intercambio iónico y de interacción hidrofóbica (Heinitz *et al.*, 1988) por lo que la afinidad adsorbente-adsorbato tiene una dependencia compleja con la concentración salina.
- Una proteína puede cambiar su conformación tridimensional tras la unión con la resina de intercambio iónico u otras superficies. En estos casos las isotermas pueden variar con el tiempo de contacto, mostrando una dependencia con la historia de la concentración en la fase adsorbida.

Los tratamientos termodinámicos más simples tienen en cuenta la carga neta de la proteína como factor principal por el cual se produce el intercambio. Sin embargo, se ha comprobado experimentalmente que, en determinados sistemas, no hay una buena correlación entre dicha carga

neta y la retención del adsorbato (Kopaciewicz *et al.*, 1983). Así, se ha observado que existe retención de proteínas que se encuentran en su punto isoeléctrico o incluso a valores de pH inferiores en columnas de intercambio aniónico. Esta adsorción no está causada por fuerzas hidrofóbicas, sino por la existencia de asimetría en la distribución superficial de cargas que presentan las proteínas a cualquier valor de pH (Drager y Regnier, 1986). De esta forma, las proteínas, aunque la carga neta que soporten sea nula, pueden presentar en algunas zonas de su superficie una concentración de grupos cargados que le confieren una densidad de carga local no nula que le permiten unirse a intercambiadores de iones adoptando la orientación adecuada. La biomolécula, a medida que fluye a través del adsorbente y debido al movimiento térmico, tiende a situarse en una o varias orientaciones que minimicen la energía libre en el estado adsorbido.

Con objeto de comprender y describir de una forma más completa el mecanismo de intercambio iónico de macromoléculas poliiónicas, se introdujo el concepto de *carga característica* (Velayudhan y Horváth, 1986). Este designa al número de cargas o residuos de aminoácidos (para cadenas polipeptídicas) cargados de la biomolécula que intervienen en la unión, por interacción electrostática, a la superficie del adsorbente. Este valor depende de las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, temperatura, etc.) así como de las características del adsorbente (Velayudhan y Horváth, 1994).

Existen diferentes métodos para determinar el valor de la carga característica. En primer lugar se pueden destacar los cálculos *a priori* basados en la mecánica estadística. Estos requieren un tratamiento matemático muy complejo a la vez que un conocimiento muy completo del sistema que se está estudiando. Esta situación no es con la se cuenta habitualmente debido a la dificultad de describir *adecuadamente el comportamiento y características de las estructuras proteicas. Por ello, se han desarrollado procedimientos basados en datos obtenidos experimentalmente en sistemas relativamente sencillos. Entre ellos se encuentran los basados en datos obtenidos a partir de experimentos en impulso en equipos de HPLC por elución isocrática (Drager y Regnier, 1986; Velayudhan y Horváth, 1986) y los que hacen uso de los valores obtenidos a partir de la isoterma de Langmuir del sistema (Velayudhan y Horváth, 1986).*

De los tratamientos experimentales anteriores, podemos generalizar una relación lineal entre el logaritmo del factor de capacidad y el logaritmo de la concentración salina (o fuerza iónica) de la fase móvil de la siguiente manera:

$$\log(k') = \log A - \frac{Z_P}{Z_S} \log[S] \quad [1.10]$$

basado en el siguiente equilibrio, no mecanístico:



donde Z_S y Z_P son las cargas netas del contraión y la carga característica de la proteína respectivamente. P y S hacen referencia a la proteína y al contraión salino. La barra sobre alguno de ellos representa que la especie correspondiente se encuentra unida al ligando de la fase estacionaria.

1.3.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

La implantación de un proceso biotecnológico a escala industrial requiere un profundo conocimiento de sus mecanismos y de los factores que en él influyen. Además, para diseñar y optimar procesos de purificación de forma no empírica, es necesaria la utilización de modelos matemáticos generales que permitan describir y predecir el comportamiento del sistema. Por ello y por todo lo anteriormente expuesto, los objetivos del presente trabajo de investigación son los siguientes:

- Desarrollar una metodología que permita el diseño de procesos de purificación de bioproductos mediante adsorción.
- Determinar y cuantificar los factores que influyen en la adsorción de α -amilasa de *Aspergillus oryzae* sobre soportes de intercambio iónico e interacción hidrofóbica.
- Aplicar modelos matemáticos fenomenológicos que permitan diseñar, simular y optimar la operación de adsorción de α -amilasa sobre los soportes estudiados.
- Determinar los parámetros cinéticos y termodinámicos que caracterizan al modelo teórico desarrollado para utilizar este en la operación de diseño, simulación y escalado del proceso de adsorción de α -amilasa.

A continuación se describe la metodología y el plan de trabajo propuesto para la realización de los objetivos planteados:

- Elección de los adsorbentes más adecuados y de las condiciones de operación en las que se va a desarrollar el estudio posterior de la adsorción de α -amilasa.
- Caracterización fisico-química del adsorbato y de los adsorbentes utilizados.
- Estudio experimental, en forma secuencial, de la adsorción de α -amilasa sobre los adsorbentes seleccionados mediante los siguientes procesos: (1) cromatografía de impulso en columnas de HPLC, (2) adsorción en tanque agitado discontinuo y (3) adsorción en lecho fijo.
- Determinación de los parámetros cinéticos y termodinámicos del proceso de

adsorción de α -amilasa mediante el ajuste de los resultados experimentales al modelo matemático desarrollado.

1.4.- BIBLIOGRAFÍA

- Akabori, S.; Ikenaka, T.; Hagihara, B. (1954). "Isolation of crystalline taka-amylase A from Takadiastase Sankyo", *J. Biochem.*, **41** (5), 577-582
- Albertsson, P.Å.; Johansson, G. y Tjerneld, F. (1990). "Aqueous two-phase separations" en: *Separation processes in Biotechnology* (J.M. Asenjo Ed.), Marcel Dekker, Nueva York, 287-327.
- Ananthapadmanabhan, K.P. y Goddard, E.D. (1988). "Isolation of enzymes from aqueous multiphase systems containing polymers with inverse solubility behaviour: effect of temperature", *Eur. Pat. Appl.*, EP 262,651
- Arakawa, T. (1986). "Thermodynamic analysis of the effect of concentrated salts on protein interaction with hydrophobic and polysaccharide columns", *Arch. Biochem. Biophys.*, **248** (1), 101-105.
- Arakawa, T. y Timasheff, S.N. (1982). "Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions", *Biochemistry*, **21** (25), 6545-6552.
- Arakawa, T. y Timasheff, S.N. (1984a). "Protein stabilization and destabilization by guanidinium salts", *Biochemistry*, **23** (25), 5924-5929.
- Arakawa, T. y Timasheff, S.N. (1984b). "Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding", *Biochemistry*, **23** (25), 5912-5923.
- Argirakos, G.; Thayanithy, K. y Wase, D.A.J. (1992). "Effect of immobilization on the production of alpha-amylase by an industrial strain of *Bacillus amyloliquefaciens*", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **53** (1), 33-38.
- Asenjo, J.A. (1990). "Selection of operations" en: *Separation processes in biotechnology* (J.A. Asenjo Ed.). Marcel Dekker, Nueva York, 3-16.
- Asenjo, J.A. y Patrick, I. (1990). "Large-scale protein purification" en: *Protein purification applications: a practical approach* (E.L.V. Harris y S. Angal Eds.), IRL Press, Oxford, 1-28.
- Babu, P.S.R. y Venkatram, T. (1989). "Immobilization of alpha-amylase and glucoamylase on a modified cellulose matrix", *Indian Chem. Eng.*, **31** (2), 49-54.
- Beech, S.C. (1953). "Acetone-butanol fermentations of starches", *Appl. Microbiol.*, **2**, 85-95.

- Belter, P.A. (1985). "Filtration of fermentation broths" en: *Comprehensive biotechnology* (vol. 2)", (M. Moo-Young Ed.) Pergamon Press, Oxford, 347-350.
- Boel, E.; Brady, L.; Brzozowski, A.M.; Derewenda, Z.S.; Dodson, G.G.; Jensen, V.J.; Petersen, S.B.; Swift, H.; Thim, L. y Woldike, H.F. (1990). "Calcium binding in alpha-amylases: An X-ray diffraction study at 2.1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*", *Biochemistry*, **29** (26), 6244-6249.
- Brady, R.L.; Brzozowski, A.M.; Derewenda, Z.S.; Dodson, E.J. y Dodson, G.G. (1991). "Solution of the structure of *Aspergillus niger* acid alpha-amylase by combined molecular replacement and multiple isomorphous replacement methods", *Acta Cryst.*, **B47**, 527-535.
- Buckley, J.J. y Wetlaufer, D.B. (1989). "Use of the surfactant 3-(3-cholamidopropyl)-dimethylammoniopropane sulfonate in hydrophobic interaction chromatography of proteins", *J. Chromatogr.*, **464**, 61-71.
- Buckley, J.J. y Wetlaufer, D.B. (1990). "Surfactant-mediated hydrophobic interaction chromatography of proteins: gradient elution", *J. Chromatogr.*, **518**, 99-110.
- Buisson, G.; Duée, E.; Payan, F. (1987). "Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity", *EMBO J.*, **6** (13), 3909-3916
- Busta, F.F.; Schmidt, B.E. y MacKay, L.L. (1977). "Method of production and recovery of protein from food wastes", U.S. Patent 4,018,650.
- Campbell, L.L. (1954). "Crystallization of alpha-amylase from a thermophilic bacterium", *J. Am. Chem. Soc.*, **76** (20), 5256.
- Carlsen, M. (1994). "α-Amylase production by *Aspergillus oryzae*", PhD Thesis, Department of Biotechnology, Technical University of Denmark.
- Carlsen, M.; Nielsen, J. y Villadsen, J. (1996). "Kinetic studies of acid-inactivation of α-amylase from *Aspergillus oryzae*", *Chem. Eng. Sci.*, **51** (1), 37-43.
- Christensen, T.; Woeldike, H.; Boel, E.; Mortensen, S.B.; Hjortshøj, K.; Thim, L. y Hansen, M.T. (1988). "High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*", *Bio/Technology*, **6** (12), 1419-1422.
- Cooke, N.; Shieh, P. y Miller, N. (1990). "High performance hydrophobic interaction chromatography of proteins", *LC-GC Int.*, **3** (1), 8-13.
- Creighton, T.E. (1993), en: *Proteins: structures and molecular properties* (2ª ed.), W.H. Freeman,

Nueva York.

- Cuatrecasas, P.; Wilchek, M. y Anfinsen, C.B. (1968). "Selective enzyme purification by affinity chromatography", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 636-643.
- De Cordt, S.; Avila, I.; Hendrickx, M. y Tobback, P. (1994). "DSC and protein-based time-temperature integrators: case study of α -amylase stabilized by polyols and/or sugar", *Biotechnol. Bioeng.*, **44** (7), 859-865
- Dekker, M.; Koenen, P.H.M.; Van't Riet, K. (1991). "Reversed micellar-membrane-extraction of enzymes", *Trans. IChemE, Part C (Food Bioprod. Proc.)*, **69** (3), 54-58
- Dobransky, T.; Polivka, L.; Hass, I., Sova, O. y Petrvalsky, E. (1987). "Purification of alpha-amylase by industrial autofocusing", *J. Chromatogr.*, **411**, 486-489.
- Drager, R.R.; Regnier, F.E. (1986). "Application of the stoichiometric displacement model of retention to anion-exchange chromatography of nucleic acids", *J. Chromatogr.*, **359**, 147-155.
- El Rassi, Z.; de Ocampo, L.F. y Bacolod, M.D. (1990). "Binary and ternary salt gradients in hydrophobic-interaction chromatography of proteins", *J. Chromatogr.*, **499**, 141-152.
- Engler, C.R. (1985). "Disruption of microbial cells" en: *Comprehensive biotechnology* (vol. 2), (M. Moo-Young Ed.) Pergamon Press, Oxford, 305-324.
- Er-el, Z.; Zaidenzaig, Y. y Shaltiel, S. (1972). "Hydrocarbon coated sepharoses used in purification of glycogen phosphorylase", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 383-390.
- Fane, A.G. y Radovich, J.M. (1990). "Membrane systems" en: *Separation processes in biotechnology* (J.M. Asenjo Ed.), Marcel Dekker, Nueva York, 209-262.
- Farber, G.K. y Petsko, G.A. (1990). "The evolution of α/β barrel enzymes", *TIBS*, **15**, 228-234.
- Fausnaugh, J.L.; Kennedy, L.A. y Regnier, F.E. (1984). "Comparison of hydrophobic-interaction and reversed-phase chromatography of proteins", *J. Chromatogr.*, **317**, 141-155.
- Fausnaugh, J.L. y Regnier, F.E. (1986). "Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins", *J. Chromatogr.*, **359**, 131-146.
- Fencl, Z. y Pazlarova, J. (1982). "Production of extracellular enzymes in continuous culture", *Folia Microbiol. (Praga)*, **27**, 340-349.
- Frost, G.M. y Moss, D.A. (1987). "Production of enzymes by fermentation" en: *Biotechnology* (vol. 7a, Enzyme technology) (J.F. Kennedy Ed.), VCH Publishers, Weinheim, 65-211.
- Gabler, F.R. (1985). "Cell processing using tangential flow filtration" en: *Comprehensive biotechnology* (vol. 2), (M. Moo-Young Ed.) Pergamon Press, Oxford, 351-366.

- Gehas, J. y Wetlaufer, D.B. (1990). "Isocratic hydrophobic interaction of dansyl amino acids. Correlation of hydrophobicity and retention parameters", *J. Chromatogr.*, **511**, 123-130.
- Geng, X.; Guo, L.; Chang, J. (1990). "Study of the retention mechanism of proteins in hydrophobic interaction chromatography", *J. Chromatogr.*, **507**, 1-23
- Ghildyal, N.P.; Prema, P.; Srikanta, S.; Sreekantiah, K.R. y Ahmed, S.Y. (1980). "Studies on the production of alpha-amylase in submerged culture", *J. Food. Sci. Technol.*, **17**, 165-167.
- Glatz, C.E. (1990). "Precipitation" en: *Separation processes in biotechnology* (J.M. Asenjo Ed.), Marcel Dekker, Nueva York, 329-356.
- Gooding, D.L.; Schmuck, M.N.; Nowlan, M.P. y Gooding, K.M. (1986). "Optimization of preparative hydrophobic interaction chromatography purification methods", *J. Chromatogr.*, **359**, 331-337.
- Graber, M.; Combes, D. (1990). "Action pattern of alpha-amylase from *Aspergillus oryzae* in concentrated media", *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 12-18
- Guo, Y.; Lou, F.; Peng, Z.Y.; Yuan, Z.Y. y Korus, R.A. (1990). "Kinetics of growth and α -amylase production of immobilized *Bacillus subtilis* in an airlift bioreactor", *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 99-102.
- Halicioglu, T. y Sinanoglu, O. (1969). "Solvent effects on cis-trans azobenzene isomerization: a detailed application of a theory of solvent effects on molecular association", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **158**, 308-317.
- Hanzawa, S.; Odagawa, A.; Sakata, H.; Takeuchi, M. y Ichishima, E. (1986). "Degradation of α -amylase from *Aspergillus oryzae* with firmly bound proteinases at pH 3.0", *Current Microbiol.*, **14**, 235-239
- Heinitz, M.L.; Kennedy, L.; Kopaciewicz, W.; Regnier, F.E. (1988). "Chromatography of proteins on hydrophobic interaction and ion-exchange chromatographic matrices: mobile phase contributions to selectivity", *J. Chromatogr.*, **443**, 173-182.
- Hille, J.D.R. (1990). "The use of enzymes in breadmaking to replace emulsifiers", Gist-brocades B.V. *Technical Information*.
- Hjertén, S. (1973). "Some general aspects of hydrophobic interaction chromatography", *J. Chromatogr.*, **87**, 325-331.
- Horstman, B.J. (1989), en: *Affinity adsorption on agarose matrices*, PhD. Thesis. Department of Chemical Engineering, University of Cambridge.

- Horváth, C.; Melander, W. y Molnar, I. (1977). "Liquid chromatography of ionogenic substances with nonpolar stationary phases", *Anal. Chem.*, **49**, 142-154.
- Jarniewicz, J. y Wlodarczyk, Z. (1978). "Amylolytic fungal preparations for distilleries", *Acta Alim. Pol.*, **4** (1), 93-105.
- Kato, Y.; Kitamura, T. y Hashimoto, T. (1983). "High performance hydrophobic interaction chromatography of proteins", *J. Chromatogr.*, **266**, 49-54.
- Katti, A.; Maa, Y.F. y Horváth, C. (1987). "Protein surface area and retention in hydrophobic interaction chromatography", *Chromatographia*, **24**, 646-650.
- Kekos, D. y Macris, B.J. (1983). "Production and characterisation of amylase from *Calvatea gigantea*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **45** (3), 935-941.
- Kenney, A.C. (1990). "Automation in protein purification: the use of expert systems for control of processes in biotechnology" en: *Separation processes in biotechnology* (J.M. Asenjo Ed.), Marcel Dekker, Nueva York, 603-616
- Klingeberg, M.; Vorlop, K.D. y Antranikian, G. (1990). "Immobilization of anaerobic thermophilic bacteria for the production of cell-free thermostable alpha-amylases and pullulanases", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33** (5), 494-500.
- Kopaciewicz, M.A.R., Fausnaugh, J.; Regnier, F.E. (1983). "Retention model for high-performance ion-exchange chromatography", *J. Chromatogr.*, **266**, 3-21.
- Krauczyk, T. (1997). "Detergent enzymes", *Inform*, **8** (1), 6-14.
- Krishna, R.; Wesselingh, J.A. (1997). "The Maxwell-Stefan approach to mass transfer", *Chem. Eng. Sci.*, **52** (6), 861-911
- Kula, M.R. (1985). "Liquid-liquid extraction of biopolymers" en: *Comprehensive biotechnology* (vol. 2), (M. Moo-Young Ed.) Pergamon Press, Oxford, 451-471.
- Kundu, A.K. y Das, S. (1970). "Production of amylase in liquid culture by a strain of *Aspergillus oryzae*", *Appl. Microbiol.*, **19** (4), 598-603.
- Langois, D.P. y Dale, U.K. (1940). U.S. Patent 2,202,609.
- Lee, J. y Parulekar, S.J. (1993). "Enhanced production of alpha-amylase in fed-batch cultures of *Bacillus Subtilis* TN106[pAT5]", *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 1142-1150.
- Levin, D. y Joyet, P. (1986). "Vecteurs d'expression de l'alpha-amylase dans *Bacillus subtilis*, souches obtenues et procédé de préparation d'alpha-amylase", Eur. Pat. Appl. EP0205371.
- Levitzki, A. y Steer, M.L. (1974). "The allosteric activation of mammalian alpha-amylase by

- chloride", *Eur. J. Biochem.*, **41** (1), 171-180.
- Lindeman, L.R. y Rocchiccioli, C. (1979). "Ethanol in Brazil: brief summary of the state of the industry in 1977", *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1107-1119.
 - Linko, Y.Y.; Li, G.X.; Zhong, L.Ch.; Linko, S. y Linko, P. (1988). "Enzyme production by immobilized cells", *Methods Enzymol.*, **137**, 686-696.
 - Linko, Y.Y.; Saarinen, P. y Linko, M. (1975). "Starch conversion by soluble and immobilized alpha-amylase", *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 153-165.
 - MacGregor, E.A. y Svensson, B. (1989). "A super-secondary structure predicted to be common to several α -1,4-D-glucan-cleaving enzymes", *Biochem. J.*, **259**, 145-152.
 - Maiorella, B.L.; Wilke, C.R. y Blanch, H.W. (1981). "Alcohol production and recovery", *Adv. Biochem. Eng.*, **20**, 43-49.
 - Malik, M.A. y Chaudhary, M.I. (1977). "Effect of carbon source on the production of alpha-amylase", *Pak. J. Biochem.*, **10** (1), 14-18.
 - Manning, G.B. y Campbell, L.L. (1961). "Thermostable α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. I. Crystallization and some general properties", *J. Biol. Chem.*, **236**, 2953-2957.
 - Manning, G.B.; Campbell, L.L. y Foster, R.J. (1961). "Thermostable α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. II. Physical properties and molecular weight", *J. Biol. Chem.*, **236**, 2958-2961.
 - Mashell, G. (1959). "Production and application of lactic acid", *Ind. Eng. Chem.*, **35**, 283-290.
 - Matsuura, Y.; Kusunoki, M.; Date, W.; Harada, S.; Bando, S.; Tanaka, N. y Kakudo, M. (1979). "Low resolution crystal structures of taka-amylase A and its complexes with inhibitors", *J. Biochem.*, **86** (6), 1773-1783.
 - Matsuura, Y.; Kusunoki, M.; Harada, W.; Tanaka, N.; Iga, Y.; Yasuoka, N.; Toda, H.; Narita, K. y Kakudo, M. (1980). "Molecular structure of taka-amylase A. I. Backbone chain folding at 3 Å resolution", *J. Biochem.*, **87**, 1555-1558.
 - Matsuura, Y.; Kusunoki, M.; Harada, W. y Kakudo, M. (1984). "Structure and possible catalytic residues of taka-amylase A", *J. Biochem.*, **95** (3), 697-702.
 - Melander, W. y Horváth, C. (1977). "Effect of neutral salts on the formation and dissociation of protein aggregates", *J. Solid Phase Biochem.*, **2** (2), 141-161.
 - Melander, W.R.; Corradini, D. y Horváth, C. (1984). "Salt-mediated retention of proteins in hydrophobic-interaction chromatography. Application of solvophobic theory", *J. Chromatogr.*,

317, 67-85.

- Meyrath, J. y Bayer, G. (1980). "Environmental factors and cultivation techniques in fungal alpha-amylase production", *Procc. FEBS Meet. (Ind. Clin. Enzymol.)*, **61**, 331-338.
- Minobe, S.; Nakajima, H.; Itoh, N.; Funakoshi, I. y Yamashina, I. (1979). "Structure of a major oligosaccharide of taka-amylase A", *J. Biochem.*, **86**, 1851-1854.
- Nakadai, T. y Nasuno, S. (1988). "Culture conditions of *Aspergillus oryzae* for production of enzyme preparation", *J. Ferment. Technol.*, **66** (5), 525-533.
- Nakamura, L.K. y Crowell, C.D. (1979). "*Lactobacillus amylophilus*: A new starch hydrolysing sp. from swine-waste corn fermentation", *Dev. Ind. Microbiol.*, **20**, 531-540.
- Namer, I.; Rivas, E.M. y Bell, A. (1987). "Aspectos tecnico-economicos de la produccion simultanea de alfa-amilasa y dextranasa", *Revista ICIDCA*, **21** (2), 13-16.
- Norman, B.E. (1981). "New developments in starch syrup technology" en: *Enzyme and food processing* (G.G. Birch, N.; Blakebrough y K.J. Parker Eds.), Applied Science Publishers, Londres, 15-50.
- Novo Nordisk (1992), en: *Enzimas - campos de aplicación*, Novo Nordisk A/S, Bagsværd.
- Novo Nordisk (1995). "Mayor concentración de los negocios en el futuro", *Biotimes*, **3**, 4-5.
- Peppler, H.J. y Reed, G. (1987). "Enzymes in food and feed processing" en: *Biotechnology* (vol. 7a Enzyme technology) (J.F. Kennedy Ed.), VCH Publishers, Weinheim, 549-603.
- Piggott, R.P.; Rossiter, A.; Ortlepp, S.A.; Pembroke, J.T. y Ollington, J.F. (1984). "Cloning on *Bacillus subtilis* of an extremely thermostable α -amylase: comparison with other cloned heatstable α -amylases", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122** (1), 175-183.
- Qian, M.; Haser, R. y Payan, F. (1993). "Structure and molecular model refinement of pig pancreatic alpha-amylase at 2.1 Å resolution", *J. Mol. Biol.*, **231**, 785-799.
- Raimbaud, E.; Buleon, A.; Pérez, S. y Henrissat, B. (1989). "Hydrophobic cluster analysis of the primary sequences of alpha-amylases", *Int. J. Biol. Macromol.*, **11**, 217-225.
- Ramasubbu, N.; Bhandary, K.K.; Scannapieco, F.A.; Levine, M.J. (1991). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of human salivary α -amylase". *Proteins: Struct. Func. Genetics*, **11**, 230-232
- Roc, S. (1989). "Separation based on structure" en: *Protein purification methods. A practical approach*, (E.L.V. Harris y S. Angal Eds.) IRL Press, Oxford.
- Rozie, H.; Bonte, A.; Van't Riet, K.; Visser, J.; Rombouts, F.M. (1991). "Adsorption and

- desorption characteristics of bacterial alpha-amylases on cross-linked potato starch", *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **13** (2), 181-195
- Saito, N. y Yamamoto, K. (1975). "Regulatory factors affecting alpha-amylase production in *Bacillus licheniformis*". *J. Bacteriol.*, **121** (3), 848-856.
 - Schmidt, A.S.; Ventom, A.M. y Asenjo, J.A. (1994). "Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase systems", *Enzyme Microbiol. Technol.*, **16** (2), 131-142
 - Scopes, R.K. (1981). "Quantitative studies of ion exchange and affinity elution chromatography of enzymes", *Anal. Biochem.*, **114**, 8-18.
 - Scopes, R.K. (1987), en: *Protein purification. Principles and practice* (2ª ed.), Springer-Verlag, Nueva York.
 - Shaltiel, S. y Er-el, Z. (1973). "Hydrophobic chromatography. Use for purification of glycogen synthetase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70** (3), 778-781.
 - Sinanoglu, O. y Abdulnur, S. (1965). "Effect of water and other solvents on the structure of biopolymers", *Fed. Procc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **24** (2, part III), S12-S23.
 - Siso, M.I.G.; Graber, M.; Condoret, J.S. y Combes, D. (1990). "Effect of diffusional resistances on the action pattern of immobilized alpha- amylase", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **48** (2), 185-200.
 - Somers, W.; Van't Riet, K. (1990). "Downstream processing of alpha-amylase by affinity interactions", *Proc. 5th Eur. Congr. Biotechnol.*, **2**, 774-777
 - Somers, W.A.C.; Koenen, P.H.M.; Rozie, H.J.; Visser, J.; Romboust, F.M. y Van't Riet, K. (1995). "Isolation of α -amylase on crosslinked starch", *Enzyme Microbiol. Technol.*, **17** (1), 56-62
 - Stein, E.A. y Fischer, E.H. (1958). "The resistance of alpha-amylases towards proteolytic attack", *J. Biol. Chem.*, **232** (2), 867-879.
 - Swift, H.J.; Brady, L.; Derewenda, Z.S.; Dodson, E.; Dodson, G.G.; Turkenburg, J.P. y Wilkinson, A. (1991). "Structure and molecular model refinement of *Aspergillus oryzae* (TAKA) alpha-amylase: An application of the simulated-annealing method", *Acta Cryst.*, **B47**, 535-544.
 - Szepesy, L. y Horváth, C. (1988). "Specific salt effects in hydrophobic interaction chromatography of proteins", *Chromatographia*, **26**, 13-18.
 - Szepesi, L.; Vida, L.; Toth, M.; Laszlo, E. (1990). "Investigation of some alpha-amylases by high performance hydrophobic interaction chromatography", *J. Chromatogr.*, **499**, 197-204
 - Szepesy, L. y Rippel, G. (1992a). "High performance hydrophobic interaction chromatography of proteins", *LC-GC Int.*, **5** (11), 24-29.

- Szepesy, L. y Rippel, G. (1992b). "Comparison and evaluation of HIC columns of different hydrophobicity", *Chromatographia*, **34** (5-8), 391-397.
- Tada, S.; Iimura, Y.; Gomi, K.; Takahashi, K.; Hara, S. y Yoshizawa, K. (1989). "Cloning and nucleotide sequence of the genomic taka-amylase A gene of *Aspergillus oryzae*.", *Agric. Biol. Chem.*, **53** (3), 593-599.
- Takamine, J. (1894). "Process of making diastatic enzyme", U.S. Patent 525,823.
- Toda, H.; Kondo, K. y Narita, K. (1982). "The complete amino acid sequence of taka-amylase A", *Proc. Japan Acad.*, **58** Ser. B, 208-212.
- Tomazic, S.J. y Klibanov, M. (1988). "Mechanisms of irreversible thermal inactivation of *Bacillus* α -amilases", *J. Biol. Chem.*, **263** (7), 3086-3091.
- Tomazic, S.J. y Klibanov, M. (1988). "Why is one *Bacillus* alpha-amylase more resistant against irreversible thermoactivation than another?", *J. Biol. Chem.*, **263** (7), 3092-3096.
- Tonkova, A.; Manolov, R. y Dobreva, E. (1993). "Thermostable alpha-amylase from derepressed *Bacillus licheniformis* produced in high yields from glucose", *Process Biochem.*, **28** (8), 539-542.
- Tutunjian, R.S. (1985). "Cell separations with hollow fiber membranes" en: *Comprehensive biotechnology* (vol. 2), (M. Moo-Young Ed.) Pergamon Press, Oxford, 367-381
- Ueda, S.; Zenin, C.T.; Monteiro, D.A. y Park, Y.K. (1981). "Production of ethanol from raw cassava starch by non-conventional fermentation method", *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 291-299.
- Ulbrich, R.; Schellenberger, A. y Damerau, W. (1986). "Studies on the thermal inactivation of immobilized enzymes", *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 511-522.
- Vallee, B.L.; Stein, E.A.; Sumerwell, W.N. y Fischer, E.H. (1959). "Metal content of alpha-amylases of various origins", *J. Biol. Chem.*, **234** (11), 2901-2905.
- Velayudhan, A. y Horváth, C. (1986). "On the stoichiometric model of electrostatic interaction chromatography for biopolymers", *J. Chromatogr.*, **367**, 160-162.
- Velayudhan, A. y Horváth, C. (1994). "Adsorption and ion-exchange isotherms in preparative chromatography", *J. Chromatogr. A*, **663**, 1-10.
- Venkatasubramanian, K. (1978), en: *Enzyme: the interface between technology and economics* (J.P. Danksy y B. Wolnak Eds.), Marcel Dekker, Nueva York.
- Vihinen, M. y Mäntsälä, P. (1989). "Microbial amylolytic enzymes", *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **24**, 329-418.

- Wang, N.H.L. (1990). "Ion exchange in purification" en: *Separation processes in biotechnology* (J.A. Asenjo Ed.). Marcel Dekker, Nueva York, 359-400.
- Wei, D.; Parulekar, S.J.; Stark, B.C. y Weigand, W.A. (1989). "Plasmid stability and α -amylase production in batch and continuous cultures of *Bacillus subtilis* TN106[pAT5]", *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 1010-1020.
- Wheelwright, S.M. (1987). "Designing downstream processes for large-scale protein purification", *Bio/Technology*, **5**, 789-793.
- Wilke, C.R.; Yang, R.D.; Scamanna, A.F. y Freitas, R.P. (1981). "Raw material evaluation and process development studies for conversion of biomass to sugars and ethanol", *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 163-183.
- Wykes, J.R.; Dunnill, P. y Lilly, M.D. (1971). "Immobilisation of α -amylase by attachment to soluble support materials", *Biochim. Biophys. Acta*, **250**, 522-529.
- Wu, S.L.; Benedek, K. y Karger, B.L. (1986a). "Thermal behavior of proteins in high-performance hydrophobic-interaction chromatography", *J. Chromatogr.*, **359**, 3-17.
- Wu, S.L.; Figueroa, A. y Karger, B.L. (1986b). "Protein conformational effects in hydrophobic interaction chromatography. Retention characterization and the role of mobile phase additives and stationary phase hydrophobicity", *J. Chromatogr.*, **371**, 3-27.
- Yakubi, M.; Ono, N.; Hoshino, K. y Fukui, S. (1977). "Rapid induction of alpha-amylase by nongrowing micelya of *Aspergillus oryzae*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 1.
- Yamaguchi, H.; Ikenaka, I. y Matsushima, Y. (1971). "The complete sequence of a glycopeptide obtained from taka-amylase A", *J. Biochem.*, **70**, 587-594.
- Yamamoto, S.; Nomura, M. y Sano, Y. (1987). "Adsorption chromatography of proteins: determination of optimum conditions", *AIChE J.*, **33** (9), 1426-1434.
- Yamamoto, S.; Nomura, M.; Sano, Y. (1992). "Stepwise elution chromatography as a method for both purification and concentration of proteins", *Chem. Eng. Sci.*, **47** (1), 185-188
- Yarmush, M.L.; Antosen, K. y Yarmush, D.M. (1985). "Molecular sieve chromatography" en: *Comprehensive biotechnology* (vol. 2) (M. Moo-Young Ed.) Pergamon Press, Oxford, 489-505.
- Yarmush, M.L. y Colton, C.K. (1985). "Affinity chromatography" en: *Comprehensive biotechnology* (vol. 2) (M. Moo-Young Ed.) Pergamon Press, Oxford, 507-521.
- Yoo, Y.J.; Cadman, T.W.; Hong, J. y Hatch, R.T. (1988). "Fed-batch fermentation for the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*", *Biotechnol. Bioeng.*, **31** (5), 426-432.

-
- Zhang, X.Z.; Xie, S.; Wu, X.; Jin, F. y Li, X. (1994). "Purification and characterization of thermostable α -amylase II from *Bacillus* sp-JF₂ strain", *Enzyme Microbiol. Technol.*, **16**, 985-990

2. TRANSFERENCIA DE MATERIA Y EQUILIBRIO QUÍMICO EN LOS PROCESOS DE ADSORCIÓN

2.1.- INTRODUCCIÓN

La cantidad de proteína o cualquier otro adsorbato que un adsorbente puede retener, viene determinada por el equilibrio químico existente entre ambos. Este último también establece la separación entre los diferentes componentes de una mezcla que una columna cromatográfica es capaz de resolver. Aun siendo un factor de gran importancia en la elección de un adsorbente, la capacidad del mismo no es el único a tener en cuenta. Para el diseño de procesos de adsorción es fundamental el conocimiento de la velocidad con la que se alcanza el equilibrio entre las fases así como la velocidad de transporte de las moléculas de adsorbato desde el seno del fluido, en el que se encuentra, hasta los sitios de adsorción en la superficie del adsorbente.

La adsorción de un soluto sobre la superficie interna de una partícula porosa de adsorbente consta de varias etapas de transferencia de materia en serie. La velocidad relativa de cada una de ellas frente al resto determinará la etapa o etapas controlantes de la velocidad global del proceso. Dichas etapas pueden agruparse en tres procesos principales:

- *Difusión externa:* la molécula de adsorbato debe difundirse desde el seno de la disolución hasta la superficie externa de la partícula de adsorbente a través de la capa límite externa que la rodea.
- *Difusión interna:* el adsorbato se difunde desde la superficie externa de la partícula a través del interior de los poros hasta los puntos de adsorción mediante uno o varios mecanismos difusionales que se describirán a continuación.
- *Adsorción:* se produce el equilibrio de adsorción propiamente dicho entre el adsorbato y los sitios de adsorción de la superficie interna de la partícula de adsorbente.

Junto a todo ello, en el caso de trabajar en sistemas en los que el adsorbente se encuentre dispuesto como fase estacionaria en el interior de una columna, habrá que tener en cuenta los posibles efectos que la dispersión axial y radial tienen sobre la velocidad de transferencia de materia.

2.2.- PROCESOS DE TRANSFERENCIA DE MATERIA

En este apartado se revisan los mecanismos de transporte que se presentan en los procesos de adsorción en sólidos porosos. Cada uno de ellos viene determinado por las características fisicoquímicas del adsorbato y del adsorbente así como por las condiciones del medio en el que se encuentran. La fuerza impulsora de cada uno de los mecanismos define la expresión de la velocidad con la que dicho transporte se realiza. El análisis cinético de un sistema concreto permitirá conocer la etapa o etapas controlantes de la velocidad global del proceso.

2.2.1.- Transferencia de materia en la capa límite externa

El flujo de un soluto a través de la capa límite externa que rodea a una partícula sólida se considera linealmente dependiente de la diferencia entre la concentración de dicho soluto en el seno de la disolución y en la superficie exterior de la partícula, lo cual puede expresarse mediante la relación matemática descrita por la ecuación 2.1.

$$J_r = k_f (C - C|_{r=R}) \quad [2.1]$$

La resistencia a dicho flujo viene caracterizada por el denominado coeficiente de transferencia de materia externo, k_f . Furusawa y Smith (1973) describen un procedimiento para

determinar experimentalmente el valor de k_f a partir de la pendiente a tiempo cero de la curva cinética de adsorción. Existen diversas ecuaciones empíricas para la estimación de dicho parámetro, muchas de ellas (Wakao y Funazkri, 1978; Wilson y Geankoplis, 1966) correlacionan el número de Sherwood con otros números adimensionales, como son el de Reynolds y Schmit. Estas, sin embargo, son de difícil aplicación a sistemas de tanque agitado debido a la dificultad de determinar la velocidad superficial de las partículas suspendidas (Fritz *et al.*, 1980). Para la estimación del coeficiente de transferencia de materia externo en sistemas de tanque agitado en fase líquida, se puede utilizar la siguiente correlación (Geankoplis, 1983):

$$k_f = \frac{2 D_{AB}}{d_p} + 0.31 \left(\frac{\mu}{\rho D_{AB}} \right)^{-\frac{2}{3}} \left(\frac{\Delta\rho \mu g}{\rho^2} \right)^{\frac{1}{3}} \quad [\text{m} / \text{s}] \quad [2.2]$$

donde d_p es el diámetro de partícula en m, μ es la viscosidad de la solución en Pa·s, ρ es la densidad de la disolución en kg/m^3 , $\Delta\rho$ es la diferencia de densidad entre las partículas y la fase fluida en kg/m^3 , $g = 9.81 \text{ m}/\text{s}^2$ es la constante de aceleración de la gravedad y D_{AB} la difusividad molecular del soluto en la fase fluida en m^2/s .

2.2.2.- Transferencia de materia en el interior de los poros

El transporte de materia a través del interior de los poros de una partícula de adsorbente puede deberse a varios mecanismos difusionales, que pueden darse de forma individual o conjunta.

Difusión molecular

A pesar de que el mecanismo de difusión molecular es, fundamentalmente, similar en fase gaseosa y en fase líquida, la teoría que soporta esta última está mucho menos desarrollada. Dicho mecanismo se caracteriza porque la resistencia al flujo se produce debido a las colisiones entre las moléculas de soluto que se difunden. Para la determinación del coeficiente de difusión molecular en fase líquida existen un gran número de correlaciones empíricas y semiempíricas basadas en las ecuaciones de Nernst-Einstein y Stokes-Einstein (Álvarez *et al.*, 1982).

Para adsorbatos no electrolitos cuya masa molecular sea inferior, aproximadamente, a 1000, la ecuación de Wilke y Chang (1955) es una de las más habitualmente utilizadas:

$$D_{AB} = \frac{117 \cdot 10^{-16} (\psi_B M_B)^{1/2} T}{\mu_{AB} V_A^{0.6}} \quad [\text{m}^2 / \text{s}] \quad [2.3]$$

donde ψ_B es el parámetro de asociación del disolvente (para el agua tiene un valor de 2.6, aunque otros autores recomiendan un valor de 2.26 (Álvarez *et al.*, 1982)), M_B es la masa molecular del

disolvente, T es la temperatura en kelvin; μ_B es la viscosidad del líquido en Pa·s y V_A es el volumen molar del soluto a su temperatura normal de ebullición en m^3/molkg .

Para solutos de mayor masa molecular, como es el caso de la α -amilasa, se ha usado la correlación de Polson (1950), basada en la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D_{AB} = 9.4 \cdot 10^{-15} \frac{T}{\mu (M_A)^{1/3}} \quad [\text{m}^2 / \text{s}] \quad [2.4]$$

donde M_A es la masa molecular del soluto que se difunde.

Difusividad de Knudsen

En sistemas gaseosos, cuando el diámetro de poro es pequeño o la presión es suficientemente baja, puede ocurrir que las colisiones entre moléculas de adsorbato y las paredes internas de los poros sean más frecuentes que las colisiones entre dos moléculas de adsorbato. En este caso, una vez que la molécula de adsorbato ha chocado con la pared interna del poro, se adsorbe y es reemitida inmediatamente en una dirección aleatoria. Este mecanismo de transferencia de materia en el interior del poro se denomina difusión de Knudsen y el coeficiente de difusión que lo caracteriza puede ser estimado mediante la siguiente correlación (Ruthven, 1984):

$$D_K = 97.0 R_p \left(\frac{T}{M} \right)^{1/2} \quad [\text{m}^2 / \text{s}] \quad [2.5]$$

Debido a que en fase líquida el recorrido libre medio de las moléculas de soluto es muy pequeño, se considera que este mecanismo no es significativo y, por tanto, no controla la velocidad de transporte de materia.

Difusividad en macroporos

Dependiendo del sistema adsorbato-adsorbente así como de las condiciones de operación, pueden darse situaciones de transición entre los diferentes mecanismos difusionales. En el caso de gases, en la región en la que tanto la difusión molecular como la difusión de Knudsen son significativas, la difusividad en la fase líquida puede definirse mediante la siguiente expresión (Ruthven, 1984):

$$\frac{1}{D} = \frac{1}{D_m} + \frac{1}{D_K} \quad [2.6]$$

La magnitud de la difusividad de un soluto en la fase líquida del interior de los poros de un sólido es menor que la que corresponde a la difusividad molecular de dicho soluto en disolución. Esto

se debe a que junto a los mecanismos difusionales que se dan en el interior del poro, el flujo de materia se reduce debido a la propia estructura y geometría porosa. Esta situación hace que la estimación teórica del coeficiente de difusión en los poros no sea una tarea siempre posible por lo que se suele recurrir a la experimentación para una determinación exacta.

El factor de tortuosidad, τ , es el parámetro que relaciona los coeficientes de difusión en los poros y molecular de la siguiente manera:

$$D_p = \frac{D_m}{\tau} \quad [2.7]$$

El factor de tortuosidad varía inversamente con la porosidad de la partícula y su valor suele estar en el intervalo 2-6. Su estimación teórica requiere una caracterización muy profunda y compleja de la estructura porosa por lo que habitualmente se determina experimentalmente para cada adsorbente.

El flujo a través del líquido que llena los macroporos de una partícula esférica se puede expresar, considerando constante la difusividad, de acuerdo con una expresión de similar forma a la ley de Fick:

$$J_p = D_p \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left[r^2 \frac{\partial c_s}{\partial r} \right] \quad [2.8]$$

Difusividad superficial

El flujo de adsorbato a través de la capa de moléculas adsorbidas a la superficie del adsorbente se conoce como difusividad superficial.

La determinación del valor de la difusividad superficial no puede hacerse por medidas directas ya que al ser un proceso en paralelo al flujo de adsorbato a través del poro en la fase fluida, sería necesario eliminar la contribución correspondiente a este último (Schneider y Smith, 1968).

Estudios realizados en fase gaseosa indican que la difusividad superficial es significativa cuando el espesor de la capa adsorbida es grande y el tamaño de poro es relativamente pequeño. En general, en estos casos, el flujo a través de la fase fluida es fundamentalmente debido al mecanismo de difusión de Knudsen.

Para la difusión superficial, la expresión del flujo másico debido a dicho mecanismo tiene una forma similar. En este caso la fuerza impulsora es el gradiente radial de concentración superficial adsorbida en el interior de la partícula (ecuación 2.9):

$$J_s = D_s \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left[r^2 \frac{\partial q}{\partial r} \right] \quad [2.9]$$

2.2.3.- Acoplamiento de mecanismos difusionales

En el interior de una partícula sólida porosa, pueden producirse diferentes situaciones dependiendo de la interacción relativa entre el sólido y el adsorbato en función de la naturaleza de la partícula, del adsorbato y de los poros. En el caso de agregados formados por compactación o extruido de cristales microporosos, como es la situación típica que se presenta en *pellets* de zeolitas (Ruthven, 1984), además de la difusión en el interior de los cristales existirá la correspondiente al transporte en los macroporos que se forman en los espacios intercristalinos. Por otro lado, los adsorbentes sintéticos macrorreticulares formados por polímeros o copolímeros entrecruzados (fenol-formaldehído, estireno-divinilbenceno, polietileno, polipropileno, etc.) presentan únicamente meso- y macroporos.

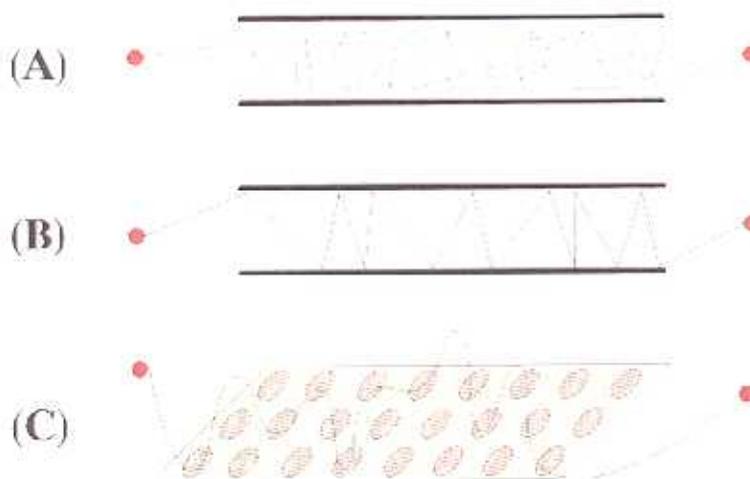


Figura 2.1: Esquema de los tres mecanismos de difusión habituales en el transporte de materia en el interior de poros: (A) difusión molecular, (B) difusión de Knudsen (gases) y (C) difusión superficial.

La contribución principal al transporte de materia en los microporos del interior de cristales o en el caso de sustancias fuertemente adsorbidas suele corresponder a la difusión superficial (Krishna y Wesselingh, 1997). Cuando en el proceso de adsorción de un soluto sobre un adsorbente poroso se producen, en paralelo, los mecanismos de difusión en fase líquida del poro y difusión superficial, la difusividad global, D_T , se expresa como (Schneider y Smith, 1968):

$$D_T = D_p + \frac{\rho_r}{\epsilon_p} K_A D_s \quad [2.10]$$

donde K_A es la constante de adsorción.

En este caso, el flujo total de adsorbato en los poros a través de una sección radial de la partícula es la suma de las contribuciones debidas a ambos mecanismos de transporte:

$$J_T = D_p \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial c_1}{\partial r} \right) + \frac{\rho_p K_A}{\epsilon_p} D_s \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial q}{\partial r} \right) \quad [2.11]$$

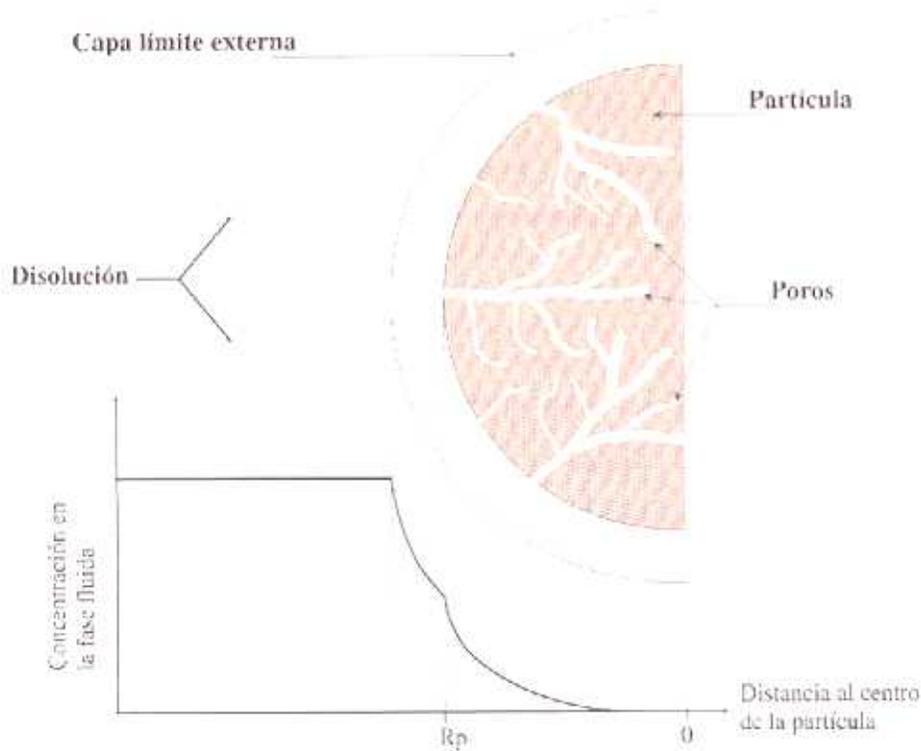
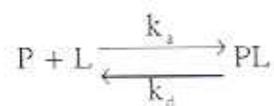


Figura 2.2: Representación esquemática de una partícula de adsorbente poroso y de la variación de concentración desde el seno de la disolución hasta el interior de los poros, atravesando la capa límite que rodea a las partículas (Las formas figuran idealizadas y las magnitudes no se encuentran a escala para facilitar la visualización).

2.2.4.- Velocidad de adsorción

Como equilibrio químico, el proceso de adsorción de un adsorbato, P, sobre un ligando, L, unido a una matriz sólida, puede expresarse de forma simplificada como:



donde PL representa el complejo adsorbido y k_a y k_d son las constantes de la velocidad de adsorción y

desorción respectivamente.

Tanto la velocidad de adsorción como la de desorción suelen considerarse muy elevadas en comparación con las etapas de difusión que se dan en los procesos de adsorción, por lo que puede considerarse que, en todo momento, la concentración de adsorbato en el líquido del interior del poro se encontrará en equilibrio local con la concentración adsorbida en la superficie interna del adsorbente. De esta forma la velocidad global del proceso de adsorción en sólidos porosos viene determinada por las etapas difusionales en el interior de las partículas.

2.3.- EQUILIBRIO DE ADSORCIÓN. ISOTERMAS

En el presente apartado se examinará el equilibrio entre adsorbato y adsorbente así como las formas de expresar el mismo, centrándose principalmente en los sistemas de adsorción en fase líquida.

2.3.1.- Introducción

Las isotermas correspondientes al equilibrio de adsorción, como su nombre indica, describen la distribución del adsorbato entre la fase estacionaria y la fase fluida a temperatura constante. Esta última condición se corresponde con la suposición de que, en la mayoría de los procesos de adsorción en fase líquida, ni la transición de fases ni la impulsión de la fase móvil genera efectos significativos de transferencia de calor que invaliden la hipótesis planteada.

La práctica totalidad de los desarrollos teóricos relacionados con la adsorción se han llevado a cabo en fase gaseosa por la posibilidad de conocer con mayor detalle y profundidad las interacciones y características de las dos fases presentes. La adsorción en fase líquida ha aplicado, adaptado y, en su caso, discriminado los modelos ya existentes para poder explicar y predecir el comportamiento observado en dichos sistemas.

La forma gráfica de la isoterma de adsorción difiere en función del mecanismo de interacción entre el adsorbato y el adsorbente, de las características fisicoquímicas de ambos y de las propiedades porosas del adsorbente. Una clasificación clásica de los diferentes tipos de isotermas, atendiendo a su forma, fue dada por Brunauer (Brunauer *et al.*, 1938; Brunauer *et al.*, 1940).

La isoterma tipo I, identificada previamente (Langmuir, 1916; Langmuir, 1918), presenta una forma hiperbólica y supone un mecanismo restringido a la adsorción de una monocapa de moléculas sobre la superficie del sólido. Además, no considera impedimentos ni interacciones entre moléculas adyacentes adsorbidas. El tipo II tiene un similar comportamiento que el tipo I a concentraciones de adsorbato bajas, pero al aumentar esta se produce la adsorción en multicapas, produciendo una forma convexa a altas concentraciones. El tipo III adopta esta última configuración debido a una distribución

de tamaños de poro muy amplia, lo que provoca un continuo llenado de los poros según aumenta la concentración. Las isothermas tipo IV, semejantes a las tipo II, presentan un valor asintótico debido al mecanismo de condensación capilar. El tipo V se relaciona con las isothermas tipo III, presentando un límite superior como en el caso de la isoterma tipo IV por similares razones. No todos estos tipos de isoterma, observados en adsorción gas-sólido, se han descrito en sistemas líquido-sólido.

Otra clasificación que agrupa los tipos anteriores en tres categorías (figura 2.3) es la siguiente:

- Isothermas cóncavas: adsorción favorable.
- Isothermas convexas: adsorción desfavorable.
- Isothermas que presentan punto de inflexión.

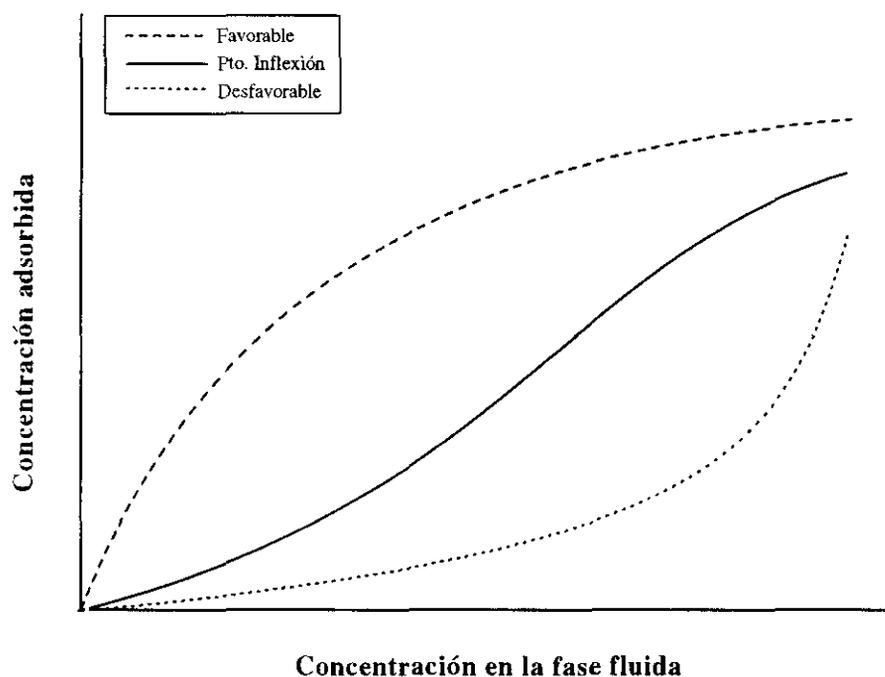


Figura 2.3: Clasificación de las isothermas de adsorción atendiendo a la forma de la curvatura.

Aunque la forma de las isothermas nos da información sobre el proceso de adsorción, es conveniente, a efectos prácticos, disponer de datos de equilibrio o, mejor aun, de una expresión matemática que nos relacione la concentración de adsorbato a cada temperatura en ambas fases. Existen en la literatura numerosas ecuaciones para tal fin, pudiéndose clasificar en dos grupos principales: las isothermas lineales y las no lineales. A continuación se describen las condiciones en las que se presentan ambas, junto con las expresiones matemáticas que las describen.

2.3.2.- Isoterma lineal

La forma más simple de expresar el equilibrio entre las moléculas de adsorbato en la fase fluida y en la fase adsorbida es mediante una relación lineal, denominada ley de Henry. Esta supone que la adsorción se lleva a cabo sobre superficies homogéneas a concentraciones suficientemente bajas como para considerar que cada molécula se encuentra aislada de las moléculas vecinas. En estas condiciones, la isoterma puede expresarse de la siguiente forma:

$$q = K_A C_{eq} \quad [2.12]$$

donde q y C_{eq} son la concentración de adsorbato en el adsorbente y en la fase líquida respectivamente y K_A es la constante de adsorción o de Henry.

2.3.3.- Isoterma no lineal

En determinados sistemas, o cuando la concentración de adsorbato es suficientemente elevada, la tendencia lineal de la isoterma desaparece y es necesario disponer de expresiones que reproduzcan adecuadamente el comportamiento del equilibrio. Los modelos no lineales más frecuentemente utilizados en sistemas líquidos son los basados en las isotermas de Langmuir y Freundlich.

Isoterma de Langmuir

El modelo teórico en que se basa (Langmuir, 1916; Langmuir, 1918) fue desarrollado a partir de argumentos cinéticos simples correspondientes a la adsorción de gases. Las suposiciones sobre las que se asienta son las siguientes:

- Las moléculas se adsorben sobre un número determinado de sitios localizados en posiciones fijas.
- Cada sitio de adsorción acepta solamente una molécula y se disponen en forma de monocapa.
- Todos los sitios son energéticamente equivalentes
- No existen interacciones laterales entre moléculas adsorbidas.

La velocidad de adsorción es proporcional a la concentración libre y a la fracción desocupada de los sitios de adsorción. La velocidad de desorción es proporcional a la fracción ocupada de dichos sitios. Ambas velocidades, en el equilibrio, son iguales.

A partir de lo anterior, se puede expresar la relación de equilibrio como:

$$\Theta = \frac{q}{q_m} = \frac{b C_{eq}}{1 + b C_{eq}} \quad [2.13]$$

siendo Θ la fracción de superficie cubierta por moléculas de adsorbato, q_m la máxima cantidad de adsorbato sobre la superficie del adsorbente y b representa la constante de equilibrio a baja concentración (pendiente de la isoterma cuando $C_{eq} \rightarrow 0$).

Isoterma de Freundlich

La desviación observada del comportamiento predicho por la isoterma de Langmuir en diversos casos, puede ser debido a la heterogeneidad energética de la superficie del adsorbente (Ruthven, 1984), no cumpliéndose una de las suposiciones de la teoría de Langmuir.

Realizando la hipótesis de la existencia de una distribución logarítmica, que tiende a un valor asintótico, de la energía de adsorción correspondiente a los sitios de unión de la superficie del adsorbente, se llega a la siguiente expresión semiempírica:

$$q = K_f C_{eq}^\beta \quad [2.14]$$

donde K_f y β ($\beta < 1$) son parámetros constantes para cada temperatura.

Este modelo presenta la desventaja de que no predice la saturación, de forma asintótica, del adsorbente a alta concentración de soluto ni se reduce al comportamiento lineal a baja concentración del mismo. Por esta razón, la utilización de la isoterma de Freundlich se encuentra limitada a superficies heterogéneas y a un intervalo determinado de concentración.

Otras isothermas

Para poder describir adecuadamente el comportamiento de sistemas que se apartan del predicho por las isothermas descritas anteriormente, se han propuesto numerosas expresiones, algunas de las cuales se indican a continuación.

La suposición de una heterogeneidad superficial debida a dos tipos de sitios de adsorción independientes no cooperativos puede expresarse mediante la isoterma bi-Langmuir (Katti *et al.*, 1990; Dose *et al.*, 1991):

$$q = \frac{a_1 C_\infty}{1 + b_1 C_\infty} + \frac{a_2 C_\infty}{1 + b_2 C_\infty} \quad [2.15]$$

Otros tratamientos más empíricos son los correspondientes a la isoterma de Langmuir-Freundlich (Bellot y Condoret, 1993):

$$q = \frac{a C_{\infty}^n}{1 + b C_{\infty}^n} \quad [2.16]$$

o a la de Redlich-Peterson (McKay y Al Duri, 1989):

$$q = \frac{a C_{\infty}}{1 + b C_{\infty}^n} \quad [2.17]$$

La elección de cualquiera de las isothermas expuestas, o de otras muchas descritas en la bibliografía dependerá, principalmente, del sistema estudiado y de la profundidad con que se conozca, de los datos experimentales de que se disponga y del grado de exactitud que se quiera alcanzar.

2.4.- BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, R.; Bueno, J.L. y Andrés, L.J. (1982). "Coeficientes de difusión molecular en fase líquida. I - Ecuaciones de predicción y de correlación en sistemas binarios", *Ingeniería Química*, **154**, 137-155.
- Bellot, J.C. y Condoret, J.S. (1993). "Modelling of liquid chromatography equilibria", *Process Biochem.*, **28**, 365-376.
- Brunauer, S.; Emmett, P.H. y Teller, E. (1938). "Adsorption of gases in multimolecular layers", *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 309-319.
- Brunauer, S.; Deming, L.S.; Deming, W.E. y Teller, E. (1940). "On a theory of the Van der Waals adsorption of gases", *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 1723-1732.
- Dose, E.V.; Jacobson, S. y Giochon, G. (1991). "Determination of isotherms from chromatographic peak shapes", *Anal. Chem.*, **63** (8), 833-839.
- Fritz, W.; Merk, W. y Schlünder, E.U. (1980). "Competitive adsorption of two dissolved organics onto activated carbon - II. Adsorption kinetics in batch reactors", *Chem. Eng. Sci.*, **36**, 731-741.
- Furusawa, T. y Smith, J.M. (1973). "Fluid-particle and intraparticle mass transport rates in slurries", *Ind. Eng. Chem., Fundam.*, **12** (2), 197-203.
- Geankoplis, C.J. (1983), en: *Transport processes and unit operations* (2ª ed.), Allyn and Bacon, Boston.
- Katti, A.; Huang, J.X. y Guiochon, G. (1990). "Prediction of the profiles of the elution bands of proteins in preparative liquid chromatography", *Biotech. Bioeng.*, **36**, 288-292.
- Krishna, R. y Wesselingh, J.A. (1997). "The Maxwell-Stefan approach to mass transfer", *Chem. Eng. Sci.*, **52** (6), 861-911.

- Langmuir, I. (1916). "The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I: solids", *J. Am. Chem. Soc.*, **38**, 2221-2295.
- Langmuir, I. (1918). "The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum", *J. Am. Chem. Soc.*, **40** (9), 1361-1403.
- McKay, G. y Al Duri, B: (1989). "Prediction of multicomponent adsorption equilibrium data using empirical correlations", *Chem. Eng. J.*, **41** (1), 9-23.
- Polson, A. (1950). "Some aspects of diffusion in solution and a definition of a colloidal particle", *J. Phys. Colloid Chem.*, **54**, 649-652.
- Ruthven, D.M. (1984), en: *Principles of adsorption and adsorption processes*, John Wiley & Sons, Nueva York.
- Schneider, P. y Smith, J.M. (1968). "Chromatographic study of surface diffusion", *AIChE J.*, **14** (6), 886-895.
- Wakao, N. y Funazkri, T. (1978). "Effect of fluid dispersion coefficients on particle-to-fluid mass transfer coefficients in packed beds", *Chem. Eng. Sci.*, **33**, 1375-1384.
- Wilke, C.R. y Chang, P. (1955). "Correlations of diffusion coefficients in diluted solutions", *AIChE J.*, **1** (2), 264-270.
- Wilson, E.J. y Geankopolis, C.J. (1966). "Liquid mass transfer at very low Reynolds numbers in packed beds", *Ind. Eng. Chem., Fundam.*, **5** (1), 9-14.

3. MODELO MATEMÁTICO DEL PROCESO DE ADSORCIÓN

3.1.- INTRODUCCIÓN

Los procesos de separación basados en la cromatografía líquida o, de forma más general, en el equilibrio líquido/sólido son muy utilizadas como etapas finales de la purificación de productos obtenidos mediante biotecnología. Hasta hace pocas décadas, los procesos biotecnológicos, salvo determinados procesos clásicos de fermentación (por ejemplo, producción de cerveza y de otras bebidas), estaban reducidos a la obtención de productos de muy alto valor añadido con producciones muy bajas. En la actualidad, están apareciendo nuevos procesos biotecnológicos a la vez que otros ya establecidos, que se realizan mediante procedimientos *clásicos* de la química, pasan a realizarse utilizando la biotecnología. En este campo, actualmente, gran parte del trabajo desarrollado para pasar de la investigación en el laboratorio a la producción industrial se realiza mediante escalado intermedio en planta piloto con procedimientos empíricos o semiempíricos.

El asentamiento de los principios generales de los procesos biotecnológicos, acompañado de

la consolidación de la técnica necesaria para su desarrollo, hace necesario el establecimiento de modelos matemáticos que permitan el diseño y simulación de cada una de las operaciones que lo componen. De esta forma, el desarrollo de procesos biotecnológicos se situaría en una posición similar a la que tienen los procesos químicos *convencionales*, cuyos representantes más destacados son los pertenecientes a la industria petroquímica.

La proposición de modelos matemáticos que describan el comportamiento del sistema a partir de parámetros conocidos o de fácil obtención requiere un profundo conocimiento del proceso, determinando las variables que influyen en el mismo así como la cuantificación de la mencionada influencia. En el caso de la adsorción, además de la extensión del equilibrio entre el adsorbato y el adsorbente, es necesario conocer la velocidad de transporte del adsorbato hasta los sitios de adsorción sobre la superficie del sólido. Esto último viene determinado por los mecanismos de transferencia de materia que se encuentran presentes en el proceso.

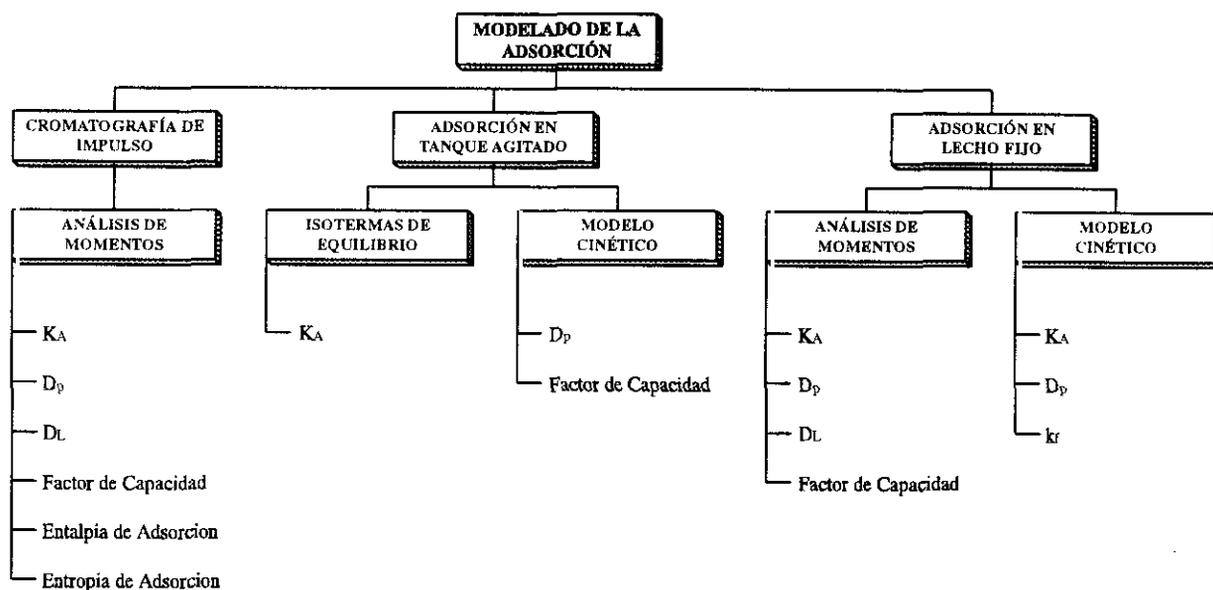


Figura 3.1: Parámetros cinéticos y termodinámicos que se obtienen a partir de los tratamientos matemáticos aplicados a cada uno de los sistemas experimentales estudiados.

En el presente trabajo se estudiará la adsorción de α -amilasa sobre adsorbentes con mecanismos de adsorción diferentes, interacción hidrofóbica e intercambio iónico. El estudio se realizará utilizando una metodología secuencial desarrollada en anteriores trabajos por nuestro grupo de investigación (Aracil y Martínez, 1993) mediante los siguientes sistemas experimentales: cromatografía de impulso en HPLC, adsorción en tanque agitado discontinuo y adsorción en lecho fijo (Aracil *et al.*, 1992). Los modelos matemáticos propuestos, de complejidad creciente, permitirán caracterizar el proceso de adsorción mediante los parámetros cinéticos y termodinámicos del sistema.

3.2.- CROMATOGRAFÍA DE IMPULSO. ANÁLISIS DE MOMENTOS

La aplicación más conocida, difundida y establecida de la *cromatografía líquida de alta eficacia*, HPLC, es como técnica analítica, encontrándose muy desarrollada y bien establecida para una gran diversidad de sustancias químicas. Sin embargo, otra aplicación de importancia creciente, es como método de purificación para determinados productos de alto valor añadido en la industria farmacéutica o de alimentación, debido a la facilidad de escalar el proceso y a los altos grados de pureza que se alcanzan.

3.2.1.- Introducción

El estudio del proceso de adsorción mediante HPLC permite obtener una valiosa información del sistema de una forma rápida, repetitiva, con equipos comerciales relativamente sencillos y a partir de muy pequeñas cantidades de adsorbente y, sobre todo, de adsorbatos (Aracil y Martínez, 1993). Estas circunstancias hacen que sea una técnica especialmente adecuada para productos de gran valor añadido como son antibióticos, péptidos, proteínas, hormonas, anticuerpos monoclonales, etc.

Tras la aplicación del impulso de adsorbato en la fase móvil a la entrada de la columna, la información de que se dispondrá será la de la curva de respuesta a la salida de la misma, es decir, la concentración de adsorbato a la salida en función del tiempo. Estos datos, junto con los correspondientes a las condiciones de operación y características del sistema (caudal, temperatura, tamaño y porosidad de las partículas y de la columna) permitirán la aplicación del método de los momentos, como se describe en el siguiente apartado, con el fin de obtener los parámetros cinéticos y de equilibrio que caracterizan al sistema.

3.2.2.- Modelo

El análisis de la respuesta de un sistema cromatográfico ante la introducción de una perturbación en impulso o en escalón ha sido ampliamente utilizada y estudiada con el fin de extraer información acerca de los factores que afectan al proceso de adsorción así como para conocer y discriminar los diferentes mecanismos de transferencia de materia que tienen lugar.

Los desarrollos iniciales relacionaban los parámetros estadísticos característicos de las curvas de respuesta o las curvas de distribución del efluente en las columnas cromatográficas con las variables de operación y los parámetros cinéticos del sistema estudiado.

Las primeras contribuciones teóricas consideraron la dispersión axial como el mecanismo cinético principal responsable de la transferencia de materia (Lapidus y Amundson, 1952; Klinkenberg y Sjenitzer, 1956). La inclusión de otro parámetro causante del comportamiento no ideal,

el coeficiente de transferencia de materia externo (Van Deemter *et al.*, 1956), permitió una explicación y una predicción más exacta del comportamiento cromatográfico. Levenspiel y Smith (1957) determinaron el coeficiente de dispersión axial a partir de la caracterización de la curva normalizada de respuesta a un impulso mediante el uso del número adimensional de Peclet. Para la resolución de las ecuaciones correspondientes al balance de materia en la columna se han utilizado, entre otras técnicas, la transformación al dominio de Laplace. La inversión de la solución para obtener una expresión analítica en el dominio del tiempo es complicada o, en la mayoría de los casos, inviable. Es factible, sin embargo, la obtención de expresiones para los momentos cromatográficos a partir de la solución en el dominio de Laplace. Estas expresiones relacionan los parámetros cinéticos y termodinámicos propuestos en el modelo resuelto (Van der Laan, 1957) con la definición estadística de los momentos de una curva de distribución. A continuación se muestran las expresiones a partir de las cuales se calculan el primer momento (μ) y el segundo momento central (σ^2):

$$\mu = \frac{\int_{t=0}^{t=\infty} t C(t) dt}{\int_{t=0}^{t=\infty} C(t) dt} \quad [3.1]$$

$$\sigma^2 = \frac{\int_{t=0}^{t=\infty} (t - \mu)^2 C(t) dt}{\int_{t=0}^{t=\infty} C(t) dt} \quad [3.2]$$

donde $C(t)$ es la concentración a la salida de la columna.

A partir de la metodología anterior y en base al establecimiento de los balances de materia en la columna y en una partícula, Kubin (1965a; 1965b) y Kucera (1965) desarrollaron el método de los momentos para un modelo en el que las resistencias a la transferencia de materia son la dispersión axial a lo largo del eje de la columna, la difusión a través de la capa límite que rodea a las partículas de adsorbente y la difusión de las moléculas de adsorbato en el interior de las mismas hasta unirse a los sitios de adsorción. Los parámetros cinéticos que caracterizan los citados mecanismos de transporte son, respectivamente, los coeficientes de dispersión axial, D_L , de transferencia de materia externa, k_f , y de difusión en los poros, D_p . Un modelo más general, que incluye la difusión del adsorbato a través de sólidos con estructuras porosas bidispersas, fue desarrollado por Haynes y Sarma (1973). De esta forma se obtienen expresiones para los momentos de las curvas de respuesta que explican adecuadamente la mayoría de los sistemas cromatográficos. Previamente se habían propuesto modelos que incluían difusión en macro- y microporos aunque sólo consideraban que la

adsorción se producía en los microporos (Hashimoto y Smith, 1973).

Shah y Ruthven (1977) modificaron ligeramente el modelo de Haynes y Sarma refiriendo las difusividades en micro- y macroporos en base al volumen del cristal y al área superficial libre respectivamente. De esta forma, el análisis de momentos se realiza a partir de las siguientes expresiones:

$$\mu = \frac{L}{v} \left[1 + \frac{(1 - \epsilon)}{\epsilon} k \right] \quad [3.3]$$

donde L es la longitud de la columna, v la velocidad intersticial de la fase móvil y k es una constante de equilibrio aparente que puede expresarse a partir de la constante del equilibrio de adsorción, K_A , como se indica a continuación:

$$k = \epsilon_p + (1 - \epsilon_p) K_A \quad [3.4]$$

La porosidad externa del lecho (referida al espacio interparticular) y la interna de las partículas (referida al volumen total ocupado por los poros) vienen representadas por ϵ y ϵ_p respectivamente.

La relación entre el segundo momento y los parámetros cinéticos que caracterizan el sistema puede expresarse mediante la ecuación 3.5:

$$\begin{aligned} \sigma^2 = & \left(\frac{2L}{v} \right) \left(\frac{D_L}{v^2} \right) \left[1 + \left(\frac{1 - \epsilon}{\epsilon} \right) \epsilon_p + \left(\frac{1 - \epsilon}{\epsilon} \right) (1 - \epsilon_p) K_A \right]^2 + \\ & + \frac{2}{3} \left(\frac{L}{v} \right) \left(\frac{R}{k_r} \right) \left(\frac{1 - \epsilon}{\epsilon} \right) \left[\epsilon_p + (1 - \epsilon_p) K_A \right]^2 + \\ & + \frac{2}{15} \left(\frac{L}{v} \right) \left(\frac{R^2}{\epsilon_p D_p} \right) \left(\frac{1 - \epsilon}{\epsilon} \right) \left[\epsilon_p + (1 - \epsilon_p) K_A \right]^2 + \\ & + \frac{2}{15} \left(\frac{L}{v} \right) \left(\frac{r_c^2}{D_c} \right) \left(\frac{1 - \epsilon}{\epsilon} \right) (1 - \epsilon_p) K_A \end{aligned} \quad [3.5]$$

siendo R el radio de las partículas, r_c el radio de los cristales que forman cada partícula y D_c el coeficiente de difusión intracrystalino. Relacionando las expresiones correspondientes al primer y segundo momento central, se obtiene:

$$\frac{\sigma^2}{2 \mu^2} = \frac{D_L}{v L} + \left(\frac{v}{L} \right) \left(\frac{\epsilon}{1 - \epsilon} \right) \left(\frac{R^2}{15 \epsilon_p D_p} + \frac{R}{3 k_r} + \frac{r_c^2}{15 k D_c} \right) \left(1 + \frac{\epsilon}{(1 - \epsilon) k} \right)^{-2} \quad [3.6]$$

El término que tiene en cuenta la resistencia a la transferencia de materia en el interior del

crystal adquiere importancia en el caso de adsorbentes o catalizadores formados por agregados o compactación de cristales, situación habitual cuando se trabaja, por ejemplo, con zeolitas. Sin embargo, puede eliminarse cuando el sólido utilizado carece de microporos. Por otra parte, los otros dos términos, correspondientes al transporte de materia a través de la capa límite externa que rodea a las partículas y el producido en el interior de los macroporos[†] tienen órdenes de magnitud diferentes (Wakao y Funazkri, 1978). Mientras que el coeficiente de difusión externa tiene valores de, aproximadamente, 10^{-6} m/s, el de difusión en los poros se encuentra alrededor de 10^{-11} m²/s, de lo cual se deduce:

$$\frac{R^2}{15 \epsilon_p D_p} \gg \frac{R}{3 k_f} \quad [3.7]$$

Con estas consideraciones, la ecuación 3.6 puede simplificarse para dar la siguiente expresión:

$$\frac{\sigma^2}{2 \mu^2} = \frac{D_L}{v L} + \left(\frac{v}{L} \right) \left(\frac{\epsilon}{1 - \epsilon} \right) \left(\frac{R^2}{15 \epsilon_p D_p} \right) \left(1 + \frac{\epsilon}{(1 - \epsilon) k} \right)^{-2} \quad [3.8]$$

Por otro lado, a partir de la teoría de platos (Martin y Synge, 1941) se puede obtener una relación entre la *altura equivalente de un plato teórico*, AEPT, y el resultado del desarrollo del análisis de momentos, basado en las teorías de velocidad a partir de las ecuaciones de balances de materia:

$$AEPT = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L \quad [3.9]$$

por lo que comparando con la ecuación 3.8, se tiene:

$$AEPT = \frac{2 D_L}{v} + 2 v \left(\frac{\epsilon}{1 - \epsilon} \right) \left(\frac{R^2}{15 \epsilon_p D_p} \right) \left(1 + \frac{\epsilon}{(1 - \epsilon) k} \right)^{-2} \quad [3.10]$$

A partir de esta última expresión se deduce que para especies que no se adsorban ($k \rightarrow 0$) o que se difundan hacia los sitios de adsorción muy rápidamente ($D_p \rightarrow \infty$), la AEPT viene dada, simplemente, por $(2 \cdot D_L/v)$, siendo un valor constante para cada sistema, esencialmente independiente de la temperatura o de la velocidad del fluido, especialmente a bajos valores del número de Reynolds (Bischoff, 1960).

La posible existencia de asimetría en los picos y la presencia de colas en los mismos así como

[†] En este caso, el término macroporo engloba también a los mesoporos que, según la recomendación de la IUPAC (Sing *et al.*, 1985), comprenden los poros cuyo tamaño se encuentra en el intervalo 2 - 50 nm.

de ruido presente en la señal, hace inviable la utilización de momentos de orden mayor a dos. Incluso en estos últimos, los problemas descritos pueden afectar significativamente a su determinación. Se han descrito algunas modificaciones y correcciones al método de los momentos para poder disminuir el efecto mencionado. Sin duda, el más utilizado de ellos es el método de los momentos con peso (Ostergaard y Michelsen, 1969; Anderssen y White, 1971; Ramachandran y Smith, 1978; Wolf *et al.*, 1979). Este método hace uso de la relación entre los momentos ordinarios y la transformada de Laplace. El primer y segundo momento central con peso, μ_p y σ_p^2 , se definen como:

$$\mu_p(s) = \frac{\int_{t=0}^{t=\infty} t e^{-st} C(t) dt}{\int_{t=0}^{t=\infty} e^{-st} C(t) dt} \quad [3.11]$$

$$\sigma_p^2(s) = \frac{\int_{t=0}^{t=\infty} (t - \mu_p)^2 e^{-st} C(t) dt}{\int_{t=0}^{t=\infty} e^{-st} C(t) dt} \quad [3.12]$$

siendo s un parámetro arbitrario de la transformación con unidades de inversa del tiempo. Para $s = 0$, los momentos con peso coinciden con los ordinarios. Para $s > 0$ el término (e^{-st}) actúa como un factor de peso que hace disminuir la contribución al valor de μ o σ^2 de los datos de concentración a tiempos elevados, esto es, situados en la zona de caída del pico donde la asimetría es grande. El valor de s se determina como aquél que minimiza la varianza de la curva de distribución (Anderssen y White, 1971).

También se han descrito procedimientos para aplicar el método de los momentos ordinarios a picos con asimetría mediante el truncamiento de los datos, es decir, la elección de un punto de la curva a partir del cual no se integra la curva de respuesta (Skopp, 1984). Este método ha dado resultados aceptables solo en determinadas ocasiones ya que para picos muy asimétricos el error obtenido es elevado y, además, la frecuencia de recogida de datos y el espaciado, regular o no, entre ellos influye en la determinación del punto de truncamiento.

El método de los momentos permite un análisis matemático sencillo y rápido de las respuestas obtenidas experimentalmente a partir de una perturbación en impulso introducida a un sistema cromatográfico. Este análisis permite estimar la constante del equilibrio de adsorción correspondiente a la ley de Henry, es decir, suponiendo la isoterma de tipo lineal, lo cual, debido a las bajas concentraciones que implican los impulsos de adsorbato, suele ser una aproximación inicial oportuna.

Una vez se hayan determinado los valores de la constante de equilibrio para cada temperatura ensayada, mediante la aplicación de la ecuación de Van't Hoff puede obtenerse la variación de entalpía ocurrida en el proceso de adsorción, suponiendo aquella constante:

$$K_A = K_0 \cdot \exp\left(-\frac{\Delta H^0}{RT}\right) \quad [3.13]$$

y la entropía correspondiente, por la siguiente expresión:

$$\Delta S^0 = R \ln K_A - \frac{\Delta H^0}{T} \quad [3.14]$$

Además, a partir del segundo momento central puede obtenerse el valor del coeficiente de difusión en los poros. Es necesario estudiar los resultados que se obtengan mediante esta técnica con *visión especialmente crítica, analizando hasta que punto las simplificaciones llevadas a cabo tienen un fundamento razonable*. En cualquier caso, los parámetros cinéticos y termodinámicos, así calculados, servirán de punto de partida para los análisis más rigurosos desarrollados para los procesos de adsorción en tanque agitado y lecho fijo que se describirán en los apartados siguientes.

3.3.- ADSORCIÓN EN TANQUE AGITADO DISCONTINUO

Para realizar el diseño de procesos de purificación por adsorción en sólidos porosos, mediante cualquiera de los mecanismos existentes, es necesario conocer las etapas de transferencia de materia que determinan la velocidad de dicho proceso. Esto implica la determinación de los parámetros cinéticos y termodinámicos relacionados con los procesos de transporte de materia externo hacia las partículas adsorbentes y con los procesos difusionales y de equilibrio que ocurren en el interior de los poros. Los dispositivos experimentales basados en tanque agitado discontinuo permiten el estudio y determinación de dichos parámetros de forma sencilla ya que en ellos es posible eliminar el control de la transferencia de materia externa. Además, en estos sistemas no existen otros mecanismos no ideales como los de dispersión axial asociados al flujo a lo largo de columnas de relleno.

3.3.1.- Introducción

Los modelos matemáticos desarrollados para representar el comportamiento de los sistemas de adsorción en tanque agitado, buscan la obtención, numérica o analítica, de la disminución de la concentración del adsorbato o adsorbatos con el tiempo en función de una serie de parámetros empíricos o no empíricos.

Los modelos más sencillos suelen considerar isoterma de tipo lineal y una sólo resistencia a la

transferencia de materia, bien sea la difusión interna (Huang y Li, 1973) o la externa (Crank, 1975). Komiyama y Smith (1974a) y Furusawa y Smith (1974) dan cuenta de una difusividad interna efectiva mucho mayor de la esperada para disoluciones de benzaldehído, atribuyéndola a la existencia de una difusión superficial en paralelo a la difusividad molecular en el interior de los poros. La determinación de la difusividad superficial se pudo hacer en términos del calor de adsorción y la aplicación de la isoterma de Freundlich (Komiyama y Smith, 1974b). Este último mecanismo es significativo si la interacción entre adsorbato y adsorbente es muy fuerte (Krishna y Wesselingh, 1997) o existe control a la transferencia de materia en los microporos (Ruthven, 1984), siendo la contribución al flujo del mismo orden de magnitud que la debida al mecanismo de Knudsen (Doong y Yang, 1986). También se han descrito modelos en los que se diferencia la difusión en microporos y en macroporos correspondiente a sólidos con distribución bimodal de tamaños de poro (Ruckenstein *et al.*, 1971).

Otros acercamientos al problema, pese a incluir la isoterma no lineal, no contemplaban la acumulación de adsorbato en la fase líquida en el interior del poro (Suzuki y Kawazoe, 1974; Hashimoto *et al.*, 1975). Neretnieks (1976) incluye la utilización de isoterma no lineal y la resistencia a la transferencia de materia externa e interna, diferenciando la difusión superficial y la difusión molecular efectiva. La resolución numérica se hace en base a diferentes casos límite en los que se pueden realizar determinadas simplificaciones, por lo que es necesario conocer, a priori, si las condiciones experimentales las cumplen o no.

Con el fin de abordar de forma más sencilla el problema matemático se han propuesto ecuaciones empíricas que describen, en determinadas condiciones, el perfil de concentración de adsorbato en la fase líquida del interior de los poros. La aproximación más sencilla corresponde a la consideración de la fuerza impulsora lineal (Glueckauf y Coates, 1947), por la que el transporte de materia a través del interior de la partícula es proporcional a la diferencia entre la concentración en el borde exterior y la concentración media en toda la partícula. Otros tratamientos posteriores consideran un perfil parabólico (Rice, 1982), existiendo otras expresiones como polinomios de cuarto grado (Do y Rice, 1986) o funciones exponenciales (Do y Mayfield, 1987) que describen la distribución del adsorbato en función del radio de la partícula.

La aplicación de modelos no empíricos a la adsorción de biomoléculas en sistemas de tanque agitado es reciente. Despreciando la contribución de la difusión interna y aplicando la isoterma de Langmuir, se realizó el estudio de la adsorción de fibrinógeno y albúmina (Aptel *et al.*, 1988). Por otro lado, eliminando la transferencia de materia externa, se ha aplicado un modelo a la adsorción de seroalbúmina bovina mediante intercambio iónico con isoterma no lineal (Yoshida *et al.*, 1994). Los modelos que incluyen las dos resistencias a la transferencia de materia se han resuelto, en algún caso,

restringiendo su uso a la zona de la isoterma donde el comportamiento es lineal (Membrez *et al.*, 1996), resolviendo por transformadas de Laplace las ecuaciones del balance de materia. Modelos completos, que cuenten con la difusión externa e interna y un comportamiento no lineal de la isoterma, se han aplicado a aminoácidos y penicilina G (Grzegorcyk y Carta, 1996) o a la adsorción de cefalosporina C (Casillas *et al.*, 1993).

3.3.2.- Modelo

El proceso de adsorción de α -amilasa sobre sólidos porosos mediante interacción hidrofóbica e intercambio iónico en un tanque agitado en operación discontinua ha sido modelado matemáticamente de acuerdo al planteamiento que a continuación se describe. En dicho modelo se han tenido en cuenta las etapas de difusión externa, difusión interna y adsorción superficial como responsables de la velocidad global de transferencia de materia. Pese a ello, la eliminación del control de la etapa de difusión externa y la suposición de una velocidad de adsorción suficientemente elevada, permitirá obtener valores más exactos del coeficiente de difusión en los poros a partir de los experimentos realizados. Esta situación se consigue aumentando, por agitación, la velocidad relativa entre las partículas de adsorbente y la disolución de adsorción en el tanque. Para obtener unos mejores resultados, es aconsejable que la densidad del sólido no sea demasiado diferente a la del fluido en el que se encuentra.

Establecimiento de hipótesis

Para el planteamiento y posterior resolución del modelo matemático que describe el proceso de adsorción en tanque agitado discontinuo se han establecido las siguientes hipótesis:

- i) Las partículas de adsorbente son esféricas, de igual diámetro y densidad. Los sitios de adsorción son iguales y se encuentran homogéneamente distribuidos por la superficie de la partícula.
- ii) La velocidad de transporte de materia viene determinada por la existencia de dos procesos en serie. Una etapa de difusión externa en la que las moléculas de adsorbato atraviesan la capa límite que rodea a las partículas y otra de difusión interna que corresponde a la difusión del adsorbato por el interior de los poros. La velocidad de cada uno de estos procesos viene caracterizada por el coeficiente de transferencia de materia externo, k_f , y el coeficiente de difusión en los poros, D_p , respectivamente.
- iii) El proceso es isoterma.

- iv) La adsorción del adsorbato sobre los sitios de adsorción es instantánea y reversible y la velocidad con que se realiza es mucho mayor que la correspondiente a las etapas de difusión previas.
- v) El equilibrio de adsorción se establece entre la concentración de adsorbato en la fase líquida del interior de los poros, c , y la concentración de adsorbato adsorbida en la superficie interna, q . Dicho equilibrio viene descrito mediante la isoterma de adsorción:

$$q = f(c)$$

- vi) El coeficiente de difusión en los poros es independiente de la concentración.

Balance de materia en la fase líquida

La disminución de la concentración de adsorbato en la fase líquida viene dada por el flujo que se difunde a través de la capa límite que rodea a las partículas esféricas de adsorbente, pudiendo expresarse como:

$$V \frac{dC}{dt} = k_f \left(\frac{3v_p}{R} \right) \epsilon_p (C - c|_{r=R}) \quad [3.15]$$

donde V es el volumen de disolución en el tanque, v_p el volumen de poros por unidad de masa de adsorbente, C la concentración de adsorbato en el seno del líquido del tanque y c la concentración en la fase líquida del interior de los poros..

Balance de materia en una sección radial de la partícula

Suponiendo que el mecanismo de transporte en el interior del poro es mediante difusión en la fase líquida y que el coeficiente de difusión efectivo no varía con la concentración, para una partícula esférica, se tiene:

$$\epsilon_p \frac{\partial c}{\partial t} + (1 - \epsilon_p) \frac{\partial q}{\partial t} = \epsilon_p D_p \left(\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right) \quad [3.16]$$

donde $q = f(c)$ es la isoterma de adsorción.

Así, puede escribirse:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \frac{dq}{dc} \frac{\partial c}{\partial t} \quad [3.17]$$

Condiciones de contorno e iniciales

El flujo de adsorbato que atraviesa la superficie exterior de la partícula deberá ser igual al flujo de adsorbato transportado por difusión a través del interior de los poros:

$$-D_p \varepsilon_p \left(\frac{\partial c}{\partial r} \Big|_{r=R} \right) = k_f (C - c|_{r=R}) \quad [3.18]$$

En el centro de la partícula,

$$\frac{\partial c}{\partial r} \Big|_{r=0} = 0 \quad [3.19]$$

Las condiciones iniciales seleccionadas son:

$$\begin{array}{lll} c = 0 & t = 0 & 0 \leq r \leq R \\ q = 0 & t = 0 & 0 \leq r \leq R \\ C = C_0 & t = 0 & \end{array} \quad [3.20]$$

siendo C_0 la concentración inicial de adsorbato en la disolución.

3.4.- ADSORCIÓN EN LECHO FIJO

Los procesos de purificación a escala industrial operan, en la práctica totalidad de los casos, en lecho fijo. Por ello, es fundamental contar con un modelo matemático que describa dicha operación para poder diseñar y posteriormente optimar el funcionamiento del proceso. Tras el modelado matemático de la adsorción en tanque agitado discontinuo, el modelo de lecho incluye el flujo de fase fluida en la dirección axial de la columna. Esto hace que, a los modelos planteados para la transferencia de materia en las partículas de adsorbente, sea necesario acoplar modelos para el flujo mencionado. A continuación se revisarán los avances más significativos que se han llevado a cabo el desarrollo de modelos para la adsorción en lecho fijo.

3.4.1.- Introducción

El desarrollo y planteamiento de los modelos matemáticos que se encuentran descritos en la bibliografía ha estado condicionado, fundamentalmente, por las resistencias a la transferencia de materia que, se consideren, controlan la velocidad del proceso, el tipo de isoterma de equilibrio y el modelo de flujo postulado a lo largo de la columna. Otro factor importante son las simplificaciones realizadas o las condiciones de contorno e iniciales que se planteen para su resolución.

La aparición de una ecuación correspondiente al balance de materia en la columna, junto con

la procedente del balance de materia en la partícula, complica el tratamiento matemático del problema en relación al modelo de tanque agitado. Desde los pioneros trabajos de Wilson (1940), posteriormente desarrollados por DeVault (1947) y Glueckauf (1949) en los que no se consideraba resistencia a la transferencia de materia, se han planteado numerosos modelos y soluciones en base a diferentes hipótesis para los sistemas de adsorción en lecho fijo. Los más sencillos consideran una sola resistencia y no contemplan la dispersión axial del flujo (Rosen, 1952; Rosen, 1954; Tien y Todos, 1960; Masamune y Smith, 1964), en ellos, la aplicación de una isoterma de tipo lineal permite la resolución analítica del sistema de ecuaciones. La inclusión del coeficiente de dispersión axial hace más realista el modelo a la vez que hace más complejo el tratamiento matemático necesario para su resolución (Deisler y Wilhem, 1953; Vermeulen, 1953; Rasmuson y Neretnieks, 1980; Rasmuson, 1981).

Las aproximaciones de perfil parabólico (Liau *et al.*, 1979; Rice, 1982) o de fuerza impulsora lineal (Cooney, 1983; Carta, 1983; Sheng y Costa, 1997) comentadas en el apartado 3.3.1 también se han aplicado a la resolución de sistemas en lecho fijo. A ellas se une la de considerar el perfil de concentración en la partícula como una distribución pseudo logarítmico-normal (Xiu *et al.*, 1997). También se han incluido, en ocasiones, la separación de las contribuciones en micro- y macroporos a la difusión interna en sólidos porosos bimodales (Garg y Ruthven, 1973) o la difusión superficial (Rasmuson y Neretnieks, 1980; Do y Rice, 1987). También se han llevado a cabo simplificaciones del problema relacionadas con la isoterma de adsorción, considerando un valor medio de la cantidad de soluto adsorbida en la partícula (Hasanain *et al.*, 1983) o aproximando la isoterma no lineal a una de forma rectangular (Yoshida *et al.*, 1984). Otras revisiones detalladas acerca del desarrollo de los modelos para la adsorción en lecho fijo se encuentran en la bibliografía (Mansour *et al.*, 1982; McKay, 1984).

La mayoría de los modelos comentados han servido para la explicación del comportamiento de la adsorción en lecho fijo para sistemas sólido-gas o sólido-líquido en condiciones de concentración muy baja). El desarrollo y aplicación de modelos cinéticos a sistemas líquidos en los que intervengan biomoléculas o biopolímeros es poco abundante. Para cromatografía de afinidad se han descrito modelos de diferente complejidad, desde modelos sencillos usados como aproximación al problema (Arnold *et al.*, 1985; Chase, 1984) a modelos más completos (Arve y Liapis, 1988; Sridhar, 1996; Niemeyer *et al.*, 1996). Pese a ello, la mayoría de los trabajos en este campo han sido teóricos y su verificación frente a resultados experimentales es muy escasa. Modelos similares se han utilizado para la adsorción de proteínas sobre resinas de intercambio iónico (Skidmore *et al.*, 1990) con resultados no muy satisfactorios. En el presente trabajo se aplicará un modelo matemático (Aracil *et al.*, 1993) que se ha utilizado con éxito en el caso de la adsorción de cefalosporina C sobre resinas hidrofóbicas.

3.4.2.- Modelo

En el planteamiento del presente modelo que describe la operación de adsorción de α -amilasa en un lecho fijo se ha tenido en consideración la difusión en la capa límite que rodea a las partículas, la difusión en el interior de los poros y el proceso de adsorción de la proteína sobre los sitios de adsorción. Para tener en cuenta la existencia de un flujo no ideal, se ha introducido el coeficiente de dispersión axial para explicar la desviación del flujo pistón ideal. El modelo, además, se basa en las siguientes suposiciones:

Establecimiento de hipótesis

El planteamiento y formulación del modelo matemático de adsorción en un lecho fijo se realiza en base a las siguientes hipótesis:

- i) El sistema opera en condiciones isotermas.
- ii) El equilibrio de adsorción se establece entre la concentración de adsorbato en la fase líquida del interior de los poros, c , y la concentración de adsorbato adsorbida en la superficie interna, q . Dicho equilibrio viene descrito mediante la isoterma de adsorción:

$$q = f(c)$$
- iii) Se consideran dos resistencias en serie al transporte de materia. Una etapa de difusión externa en la que las moléculas de adsorbato atraviesan la capa límite que rodea a las partículas y otra de difusión interna que corresponde a la difusión del adsorbato por el interior de los poros. La velocidad de cada uno de estos procesos viene caracterizada por el coeficiente de transferencia de materia externo, k_f , y el coeficiente de difusión en los poros, D_p , respectivamente.
- iv) La velocidad de la fase líquida en la columna y los parámetros de transferencia de materia son independientes de la concentración en la fase líquida.
- v) El flujo de la fase líquida a lo largo de la columna se considera no ideal, incorporando un término de dispersión axial.
- vi) Las partículas de adsorbente son esféricas y de tamaño y densidad uniforme.

Balance de materia en una partícula

En base a la suposición de la forma esférica de las partículas y de la existencia de un proceso de difusión interna, el balance diferencial en una sección radial de las partículas, puede escribirse

como:

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \left(\frac{1 - \varepsilon_p}{\varepsilon_p} \right) \frac{\partial q}{\partial t} = D_p \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial c}{\partial r} \right) \quad [3.21]$$

Se obtiene una ecuación diferencial en derivadas parciales de tipo parabólica. Asumiendo que se produce un equilibrio instantáneo entre el soluto de la fase líquida y el que se encuentra adsorbido, se puede escribir la siguiente relación:

$$\frac{\partial q}{\partial c} = \frac{\partial c}{\partial t} \frac{dq}{dc} \quad [3.22]$$

Introduciendo la expresión 3.22 en la ecuación 3.21, esta quedará de la siguiente forma:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{1}{1 + \left(\frac{1 - \varepsilon_p}{\varepsilon_p} \right) \frac{dq}{dc}} D_p \left(\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right) \quad [3.23]$$

Balance de materia la columna

Suponiendo un flujo no ideal, con dispersión axial, el balance de adsorbato en una sección diferencial del lecho se expresa de la siguiente manera:

$$-D_L \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} + v \frac{\partial C}{\partial z} + \frac{\partial C}{\partial t} + \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{3 k_f}{R} \frac{\partial q}{\partial t} = 0 \quad [3.24]$$

La velocidad de adsorción puede expresarse mediante una relación del tipo:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = f(q, c) \quad [3.25]$$

Por tratarse de un modelo de transferencia de materia homogéneo en el que se consideran dos resistencias al transporte, la ecuación 3.24 puede reescribirse como:

$$-D_L \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} + v \frac{\partial C}{\partial z} + \frac{\partial C}{\partial t} + \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{3 k_f}{R} (C - c|_{r=R}) = 0 \quad [3.26]$$

Condiciones de contorno

Por simetría, en el centro de la partícula:

$$\left. \frac{\partial c}{\partial r} \right|_{r=0} = 0 \quad [3.27]$$

En la superficie de la partícula, el flujo de adsorbato que se difunde a través de los poros es igual al que entra a través de la capa límite externa:

$$\varepsilon_p D_p \frac{\partial c}{\partial r} = k_f (C - c|_{r=R}) \quad [3.28]$$

La ecuación diferencial 3.26 requiere las siguientes condiciones de contorno a la entrada y a la salida de la columna respectivamente (Danckwerts, 1953):

$$-D_L \frac{\partial C}{\partial z} \Big|_{z=0} = v (C_0 - C|_{z=0}) \quad [3.29]$$

$$\frac{\partial C}{\partial z} \Big|_{z=L} = 0 \quad [3.30]$$

Condiciones iniciales

$$\begin{array}{lll} C = 0 & 0 \leq z \leq L & t \leq 0 \\ C = C_0 & 0 \leq z & t > 0 \\ c = 0 & 0 \leq z \leq L & t \leq 0 \\ q = 0 & 0 \leq z \leq L & t \leq 0 \end{array} \quad [3.31]$$

3.5.- BIBLIOGRAFÍA

- Anderssen, A.S. y White, E.T. (1971). "Parameter estimation by the weighted moments method", *Chem. Eng. Sci.*, **26**, 1203-1221.
- Aptel, J.D.; Voegel, J.C. y Schmitt, A. (1988). "Adsorption kinetics of proteins onto solid surfaces in the limit of the interfacial interaction control", *Colloids and Surfaces*, **29**, 359-371.
- Aracil, J.; Martínez, M. y Casillas, J.L. (1992). "Downstream: new trends and industrial applications" en: *Profiles on biotechnology* (T.G. Villa y J. Abalde Eds.), Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 523-538.
- Aracil, J.; Casillas, J.L.; Martínez, M. y López-Gómez, J. (1993). "Modelling and solving fixed-bed adsorption", *Math. Meth. Appl. Sci.*, **16**, 533-544.
- Aracil, J. y Martínez, M. (1993). "Purificación de bioproductos, metodología del cambio de escala", *Rev. Real Acad. Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, **LXXXVII** (4), 675- 680.
- Arnold, F.H.; Blanch, H.W. y Wilke, C.R. (1985). "Analysis of affinity separations I: predicting the performance of affinity adsorbers", *Chem. Eng. J.*, **30**, B9-B23.

- Arve, B. H. y Liapis, A. I. (1988). "Biospecific adsorption in fixed and periodic countercurrent beds", *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 616-627.
- Bischoff, K.B. (1960). "Notes on the diffusion-type model for longitudinal mixing in flow", *Chem. Eng. Sci.*, **12** (1), 69-70.
- Carta, G. (1993). "The linear driving force approximation for cyclic mass transfer in spherical particles", *Chem. Eng. Sci.*, **48** (3), 622-625.
- Casillas, J.L.; Martínez, M.; Addo-Yobo, F. y Aracil, J. (1993). "Modelling of the adsorption of cephalosporin C on modified resins in a stirred tank", *Chem. Eng. J.*, **52**, B71-B75.
- Chase, H.A. (1984). "Prediction of the performance of preparative affinity chromatography", *J. Chromatogr.*, **297**, 179-202.
- Cooney, D.O. (1993). "Comparison of simple adsorber breakthrough curve method with exact solution", *AIChE J.*, **39** (2), 355-358.
- Crank, J. (1975), en: *Mathematics of diffusion* (2ª ed.), Clarendon Press, Oxford.
- Danckwerts, P.V. (1953). "Continuous flow systems. Distribution of residence time", *Chem. Eng. Sci.*, **2**, 1-13.
- Deisler, P.F. y Wilhelm, R.H. (1953). "Diffusion in beds of porous solids", *Ind. Eng. Chem.*, **45** (6), 1219-1226.
- DeVault, D. (1943). "The theory of chromatography", *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 532-540.
- Do, D.D. y Mayfield, P.L.J. (1987). "A new simplified model for adsorption in a single particle", *AIChE J.*, **33** (8), 1397-1400.
- Do, D.D. y Rice, R.G. (1986). "Validity of the parabolic profile assumption in adsorption studies", *AIChE J.*, **32** (1), 149-154.
- Do, D.D. y Rice, R.G. (1987). "On the relative importance of pore and surface diffusion in non-equilibrium adsorption rate processes", *Chem. Eng. Sci.*, **42** (10), 2269-2284.
- Doong, S.J. y Yang, R.T. (1986). "Bulk separation of multicomponent gas mixtures by pressure swing adsorption: pore/surface diffusion and equilibrium models", *AIChE J.*, **32**, 397-410.
- Furusawa, T. y Smith, J.M. (1974). "Intraparticle mass transport in slurries by dynamic adsorption studies", *AIChE J.*, **20** (1), 88-93.
- Garg, D.R. y Ruthven, D.M. (1973). "Theoretical prediction curves for molecular sieve adsorption columns - I. Asymptotic solutions", *Chem. Eng. Sci.*, **28**, 791-798.

- Glueckauf, E. (1949). "Theory of chromatography. VII. The general theory of two solutes following non-linear isotherms", *Disc. Faraday Soc.*, **7**, 12-25.
- Glueckauf, E. y Coates, J.I. (1947). "Theory of chromatography, part 4. The influence of incomplete equilibrium on the front boundary of chromatogram and on the effectiveness of separation", *J. Chem. Soc.*, 1315-1321.
- Grzegorzczuk, D.S. y Carta, G. (1996). "Adsorption of amino acids on porous polymeric adsorbents - II. Intraparticle mass transfer", *Chem. Eng. Sci.*, **51** (5), 819-826.
- Hasanain, M.A.; Hines, A.L. y Cooney, D.O. (1983). "Adsorption kinetics for systems that exhibits non-linear equilibrium isotherms", *AIChE Symp. Ser.*, **79** (230), 60-66.
- Hashimoto, K.; Minka, K. y Nagata, S. (1975). "Intraparticle diffusivities in liquid-phase adsorption with nonlinear isotherms", *J. Chem. Eng. Japan*, **8** (5), 367-373.
- Hashimoto, N. y Smith, J.M. (1973). "Macropore diffusion in molecular sieve pellets by chromatography", *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, **12** (3), 353-359.
- Haynes, H.W. y Sarma, P.N. (1973). "A model for the application of gas chromatography to measurements of diffusion in bidisperse structured catalysts", *AIChE J.*, **19** (5), 1043-1046.
- Huang, T.C. y Li, K.Y. (1973). "Ion-exchange kinetics for calcium radiotracer in a batch system", *Ind. Eng. Chem., Fundam.*, **12** (1), 50-55.
- Klinkenberg, A. y Sjenitzer, F. (1956). "Holding-time distributions of the Gaussian type", *Chem. Eng. Sci.*, **5**, 258-270.
- Komiyama, H. y Smith, J.M. (1974a). "Intraparticle mass transport in liquid-filled pores", *AIChE J.*, **20** (4), 728-734.
- Komiyama, H. y Smith, J.M. (1974b). "Surface diffusion in liquid-filled pores", *AIChE J.*, **20** (6), 1110-1117.
- Krishna, R. y Wesselingh, J.A. (1997). "The Maxwell-Stefan approach to mass transfer", *Chem. Eng. Sci.*, **52** (6), 861-911.
- Kubín, M. (1965a). "Beitrag zur theorie der chromatographie", *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **30**, 1104-1118.
- Kubín, M. (1965b). "Beitrag zur theorie der chromatographie II. Einfluss der diffusion ausserhalb und der adsorption innerhalb des sorbens-korns", *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **30**, 2900-2907.
- Kucera, E. (1965). "Contribution to the theory of chromatography. Linear non-equilibrium elution chromatography", *J. Chromatogr.*, **19**, 237-248.

- Lapidus, L. y Amundson, N.R. (1952). "Mathematics of adsorption in beds. VI. The effect of longitudinal diffusion in ion exchange and chromatographic columns", *J. Phys. Chem.*, **56** (8), 984-988.
- Levenspiel, O. y Smith, W.K. (1957a). "Notes on the diffusion-type model for the longitudinal mixing in flow", *Chem. Eng. Sci.*, **6**, 187-191.
- Levenspiel, O. y Smith, W.K. (1957b). "Notes on the diffusion-type model for the longitudinal mixing of fluids in flow", *Chem. Eng. Sci.*, **6**, 227-233.
- Liaw, C.H.; Wang, J.S.P.; Greenkorn, R.A. y Chao, K.C. (1979). "Kinetics of fixed-bed adsorption: A new solution", *AIChE J.*, **25** (2), 376-381.
- Mansour, A.; von Rosenberg, D.U. y Sylvester, N.D. (1982). "Numerical solution of liquid-phase multicomponent adsorption in fixed beds", *AIChE J.*, **28** (5), 765-771.
- Martin, A.J.P. y Synge, R.L.M. (1941). "A new form of chromatogram employing two liquid phases", *Biochem. J.*, **35**, 1358-1368.
- Masamune, S. y Smith, J.M. (1964). "Transient mass transfer in a fixed bed", *Ind. Eng. Chem., Fundam.*, **3**, 179-181.
- McKay, G. (1984). "Mass transfer processes during the adsorption of solutes in aqueous solutions in batch and fixed bed adsorbers", *Chem. Eng. Res. Des.*, **62**, 235-246.
- Membrez, J.; Infelta, P.P. y Renken, A. (1996). "Use of the Laplace transform technique for simple kinetic parameters evaluation. Application to the adsorption of a protein on porous beads", *Chem. Eng. Sci.*, **51** (19), 4489-4498.
- Neretnieks, I. (1976). "Adsorption in finite bath and countercurrent flow with systems having a nonlinear isotherm", *Chem. Eng. Sci.*, **31**, 107-114.
- Niemeyer, B.; Feilenreiter, T. y Tiltcher, H. (1996). "Theoretical studies on biospecific adsorption for large-scale affinity separations", *Chem. Eng. Sci.*, **51** (24), 5263-5271.
- Ostergaard, K. y Michelsen, M.L. (1969). "On the use of imperfect tracer pulse method for determination of hold-up and axial mixing", *Can. J. Chem. Eng.*, **47**, 107-112.
- Ramachandran, P.A. y Smith, J.M. (1978). "Transport rates by moment analysis of dynamic data", *Ind. Eng. Chem., Fundam.*, **17** (3), 148-160.
- Rasmuson, A. (1981). "Exact solution of a model for diffusion in particles and longitudinal dispersion in a packed bed", *AIChE J.*, **27**, 1032-1035.
- Rasmuson, A. y Neretnieks, I. (1980). "Exact solution of a model for diffusion in particles and

- longitudinal dispersion in packed beds”, *AICHE J.*, **26** (4), 686-690.
- Rice, R.G. (1982). “Approximate solutions for batch, packed tube and radial flow adsorbers - Comparison with experiment”, *Chem. Eng. Sci.*, **37** (1), 83-91.
 - Rosen, J.B. (1952). “Kinetics of a fixed bed system for solid diffusion into spherical particles”, *J. Chem. Phys.*, **20**, 387.
 - Rosen, J.B. (1954). “General numerical solution for solid diffusion in fixed beds”, *Ind. Eng. Chem.*, **46** (8), 1590-1594.
 - Ruckenstein, E.; Vaidyanathan, A.S. y Youngquist, G.R. (1971). “Sorption by solids with bidisperse pore structures”, *Chem. Eng. Sci.*, **26**, 1305-1318.
 - Ruthven, D.M. (1984), en: *Principles of adsorption and adsorption processes*, John Wiley & Sons, Nueva York.
 - Shah, D.B. y Ruthven, D.M. (1977). “Measurement of zeolitic diffusivities and equilibrium isotherms by chromatography”, *AICHE J.*, **23** (6), 804-809.
 - Sheng, P. y Costa, C.A.V. (1997). “Modified linear driving force approximations for cyclic adsorption-desorption processes”, *Chem. Eng. Sci.*, **52** (9), 1493-1499.
 - Sing, K.S.W.; Everett, D.H.; Haul, R.A.W.; Moscou, L.; Pierotti, R.A.; Rouquérol, J. y Siemieniewska, T. (1985). “Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity”, *Pure & Appl. Chem.*, **57** (4), 603-619.
 - Skidmore, G.L.; Horstman, B.J. y Chase, H.A. (1990). “Modelling single-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose FF”, *J. Chromatogr.*, **498**, 113-128.
 - Sridhar, P. (1996). “Modelling of affinity separation by batch and fixed bed adsorption - A comparative study”, *Chem. Eng. Technol.*, **19**, 357-363.
 - Suzuki, M. y Kawazoe, K. (1974). “Batch measurements of adsorption rates in agitated tank”, *J. Chem. Eng. Japan*, **7** (5), 346-350.
 - Tien, C. y Thodos, G. (1959). “Ion exchange kinetics for systems of nonlinear equilibrium relationships”, *AICHE J.*, **5** (3), 373-378.
 - Van Deemter, J.J.; Zuiderweg, F.J. y Klinkenberg, A. (1956). “Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography”, *Chem. Eng. Sci.*, **5**, 271-289.
 - Van der Laan, E.T. (1958). “Notes on the diffusion-type model for the longitudinal mixing in flow (O.Levenspiel and W.K.Smith)”, *Chem. Eng. Sci.*, **7**, 187-191.

- Vermeulen, T. (1953). "Theory for irreversible and constant-pattern solid diffusion", *Ind. Eng. Chem.*, **45** (8), 1664-1670.
- Wakao, N. y Funazkri, T. (1978). "Effect of fluid dispersion coefficients on particle-to-fluid mass transfer coefficients in packed beds", *Chem. Eng. Sci.*, **33**, 1375-1384.
- Wilson, J.N. (1940). "A theory of chromatography", *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 1583-1591.
- Wolf, H.J.; Radeke, K.H. y Gelbin, D. (1979). "Heat and mass transfer in packed beds - IV. Use of weighted moments to determine axial dispersion coefficients", *Chem. Eng. Sci.*, **34**, 101-107.
- Xiu, G.H.; Nitta, T.; Li, P. y Jin, G. (1997). "Breakthrough curves for fixed-bed adsorbers: Quasi-lognormal distribution approximation", *AIChE J.*, **43** (4), 979-985.
- Yoshida, H.; Kataoka, T. y Ruthven, D.M. (1984). "Analytical solution of the breakthrough curve for rectangular isotherm systems", *Chem. Eng. Sci.*, **39** (10), 1489-1497.
- Yoshida, H.; Yoshikawa, M. y Kataoka, T. (1994). "Parallel transport of BSA by surface and pore diffusion in strongly basic chitosan", *AIChE J.*, **40** (12), 2034-2044.

4. CARACTERIZACIÓN Y MÉTODOS DE ANÁLISIS

4.1.- CARACTERIZACIÓN DEL ADSORBATO

En este apartado se describen los métodos utilizados para caracterizar las diferentes fuentes de α -amilasa utilizadas así como los resultados obtenidos con las mismas.

Debido a que la α -amilasa es una enzima industrial de gran consumo, se procedió a la comparación entre las fabricadas por las compañías productoras más importantes. A partir de todos los datos de que se disponía previamente (bibliográficos y de los fabricantes) y de los obtenidos a partir de los ensayos de caracterización llevados a cabo, se seleccionará la enzima comercial con la que se va a desarrollar el estudio en el presente trabajo de investigación.

En la tabla 4.1 se muestran las diferentes α -amilasas de *Aspergillus oryzae* comerciales analizadas en el presente trabajo y donadas directamente por cada una de las compañías que las producen.

La α -amilasa de *A. oryzae* seleccionada para el estudio de su comportamiento cromatográfico ha sido la procedente de Fungamyl 1600 BG type WF (Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dinamarca).

Tabla 4.1: α -amilasas de *A. oryzae* utilizadas.

| Denominación | Fabricante [†] | Actividad [‡] |
|----------------------------|-------------------------|------------------------|
| Brewers Fermex | Gist-brocades | - |
| Rapidase PFP | " | 45 000 SKBU/g |
| Rapidase PS | " | 25 000 SKBU/g |
| Amylase P500 | " | 113 500 SKBU/g |
| Grindamyl A5000 | Grindsted | 50 000 SKBU/g |
| Grindamyl S100 | " | 2 000 SKBU/g |
| Grindamyl S250 | " | 500 SKBU/g |
| Fungamyl 1600 | Novo Nordisk | 1 600 FAU/g |
| α -Amylase type X-A | Sigma | 27 000 BU/g |
| Sanzyme SP 6300 | Sankyo | 93 600 SKBU/g |
| Sanzyme SP 3500 | " | 51 500 SKBU/g |
| Sanzyme A 7000 | " | 8 543 SKBU/g |

4.1.1.- Determinación de la cantidad de proteína total:

Los preparados comerciales de α -amilasa contienen una serie de sustancias que acompañan a la enzima (sales, nutrientes y otros productos del caldo de fermentación, estabilizantes, otras proteínas, etc.). La información sobre la composición de estos productos, habitualmente, no está disponible por parte de las empresas productoras. Los ensayos generales para la determinación de la concentración de

[†] La referencia completa de cada fabricante es:

- Gist-brocades NV. Delft, Holanda.
- Grindsted Products. Brabrand, Dinamarca.
- Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dinamarca.
- Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EE.UU.
- Sankyo Co., Ltd. Tokyo, Japón.

[‡] Las diferentes unidades se definen:

- FAU (unidad de amilasa fúngica): 1 FAU corresponde a la cantidad de enzima que descompone 5.26 g de almidón por hora a 37 °C y pH 4.7 (Novo Nordisk. Analytical Method AF 216).
- SKBU: 10 SKBU \approx 1 FAU
- BU: 1 BU libera 1.0 mg de maltosa a partir de almidón en 3 minutos a pH 6.9 y 20 °C (Bernfeld, 1955).

proteína en una disolución suelen estar interferidos, en mayor o menor grado, por las diferentes sustancias que acompañen a las proteínas. Por esta razón y con objeto de conocer la concentración de proteína en cada uno de los preparados comerciales de α -amilasa con los que se ha trabajado, se ha medido a través de dos procedimientos basados en principios diferentes para poder realizar comparaciones y obtener mejores conclusiones.

Método de absorbancia en ultravioleta

Existen diferentes métodos de determinación de la concentración de proteína en una disolución que hacen uso de la absorbancia de la misma en diferentes bandas de la región ultravioleta. El método de Warburg y Christian (1941) requiere la medición de la absorbancia a 260 y a 280 nm. La concentración total de proteína en el medio analizado puede determinarse mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de Proteína [mg/ml]} = 1.55 \cdot A_{280} - 0.76 \cdot A_{260}$$

Esta correlación ha sido estimada en base a la absorbancia de una proteína utilizada como patrón de calibración (enolasa de levadura cristalizada). Sin embargo, aunque la mayoría de las proteínas tienen una absorbancia a 280 nm en el intervalo 0.5 - 2.0 para una concentración de 1.0 mg/ml, existen algunas que se encuentran fuera del mismo (Dawson *et al.*, 1993).

Método de Bradford

Este método (Bradford, 1976) se basa en el cambio diferencial de color de un colorante en presencia de concentraciones variables de proteína. El reactivo de tinción, Coomassie[®] Brilliant Blue G-250, es capaz de unirse a las proteínas formando un complejo de coordinación. El ensayo se basa en que dicho reactivo, en disolución ácida, desplaza su máximo de absorbancia desde 465 nm hasta 595 nm cuando pasa a encontrarse unido a una proteína (por desplazamiento de su pK_a). Se ha observado (Spector, 1978) que el coeficiente de extinción molar del complejo colorante-albúmina es constante sobre un amplio intervalo de concentración, por lo que se puede aplicar la ley de Beer para la determinación de la concentración total de proteína en una disolución. La concentración se determina por comparación con el resultado obtenido para una proteína de concentración conocida mediante una recta de calibrado adecuada.

Este ensayo presenta una serie de ventajas respecto a otros métodos clásicos de como son el método de Biuret o el de Lowry (Scopes, 1987). En primer lugar, necesita una menor cantidad de muestra, siendo más rápido y sensible que los citados y, al menos, tan exacto como el método de Lowry. En segundo lugar, ante la presencia de determinadas sustancias, se producen menos interferencias que con los otros métodos citados.

En el presente trabajo, el procedimiento operativo utilizado para la realización de este ensayo está basado en el descrito por Bradford (1976). El calibrado del presente ensayo se ha realizado con seroalbúmina bovina cristalizada y liofilizada. La disolución del reactivo de tinción y la proteína patrón, Bio-Rad Protein Assay Kit II, fueron suministradas por Bio-Rad Laboratories (Munich, Alemania).

4.1.2.- Cristalización de α -amilasa

Los resultados obtenidos a partir de los análisis de cantidad de proteína y electroforesis realizados sobre la α -amilasa comercial hicieron necesaria la obtención de muestra con alta pureza a fin de eliminar las posibles influencias que las impurezas pudiesen provocar durante el proceso de adsorción de α -amilasa.

Con objeto de obtener las cantidades necesarias de α -amilasa con la pureza requerida para el desarrollo del presente trabajo de investigación, se decidió llevar a cabo la purificación del preparado comercial Fungamyl 1600 BG type WF. El procedimiento seguido (Akabori *et al.*, 1954) comprende unas etapas de extracción de la enzima, consistentes en la precipitación de la misma mediante la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seguido de una etapa de precipitación selectiva con lactato de 6,9-diamino-2-etoxiacridina monohidrato (rivanol) y posterior cristalización con acetona. Los cristales de α -amilasa se disuelven y se recristalizan 3 veces en acetona y, por último, se liofilizan. Todo el proceso se ha realizado en cámara termostaticada a 4 °C. Las etapas de filtración descritas en la metodología (Akabori *et al.*, 1954) han sido sustituidas por centrifugación refrigerada a 12000 x g.

A continuación se detallan los materiales utilizados para la cristalización de α -amilasa: acetato sódico, acetato cálcico y rivanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.), hidróxido sódico (Merck, Darmstadt, Alemania), ácido acético (Panreac Química, Barcelona, España), caolín, acetona y sulfato amónico (Fluka Chemie, Neu-Ulm, Alemania). Las bolsas de diálisis, Dialysis Tubing - Visking nº 5 (Medicell International Ltd, Londres, Gran Bretaña), tienen un corte de masa molecular entre 12000 y 14000. Se ha usado una centrífuga refrigerada Sorvall Superspeed RC2-B con rotor SS-34 (DuPont de Nemours, Herts, Gran Bretaña).

4.1.3.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico, SDS, es uno de los métodos electroforéticos más comúnmente utilizados con fines analíticos y de caracterización de polipéptidos. Esta técnica permite la separación de las proteínas de una mezcla en función de su masa molecular. Las moléculas del detergente dodecil sulfato sódico se unen fuertemente a las de proteína de tal forma que sólo un 0.1% de aquel es suficiente para saturar la cadena polipeptídica, quedando

aproximadamente una molécula de detergente por cada 2 residuos de aminoácido (1.4 gramos de SDS por gramo de proteína). Cada molécula de SDS tiene una carga negativa por lo que una proteína saturada por ellas soportará un gran exceso de carga neta negativa. En la práctica, debido a dicho exceso, se puede considerar que todas las proteínas adquieren una relación carga/tamaño virtualmente idéntica, independientemente de la carga neta que tuviese en condiciones nativas, muy pequeña en comparación con las procedentes de su unión al dodecil sulfato sódico.

Por otro lado la placa de gel presenta un gradiente de concentración de poliacrilamida, siendo mayor en la parte inferior (cercana al ánodo) y menor en la superior (cercana al cátodo). Bajo la acción del campo eléctrico, las proteínas cargadas negativamente se mueven hacia el ánodo. Las moléculas de menor tamaño y mayor movilidad avanzarán a través del gel, alcanzando las zonas de mayor concentración, donde la porosidad es menor y la difusión de las moléculas de mayor tamaño se ve impedida. Al cesar la aplicación del campo eléctrico sobre el gel, se habrá logrado la separación de las diferentes proteínas que componían la muestra y que se habían aplicado en un punto de la zona cercana al cátodo, habiendo avanzado más las de menor tamaño molecular. En estas condiciones existe una relación lineal entre el factor de retención y el logaritmo de la masa molecular de la proteína. Esta se determina por comparación con una recta de calibrado realizada con una mezcla de proteínas de masa molecular conocida.

El procedimiento operativo (Pharmacia Biotech [a]) consiste en la adición de un tampón (15 μ l) con SDS y β -mercaptoetanol a la disolución de proteínas (5 μ l) que se desea analizar. Posteriormente se hierve la mezcla para desnaturalizar la proteína y que el SDS se una a la cadena polipeptídica. A continuación se aplican 10 μ l de la muestra en un extremo del gel de poliacrilamida, se añade el tampón y se aplica el campo eléctrico durante un tiempo determinado. Para detectar las bandas correspondientes a cada proteína separada, es necesario realizar la tinción de las mismas mediante un procedimiento (Pharmacia Biotech [b]) en el que se utiliza Coomassie.

En el presente trabajo, se ha utilizado un PhastSystem^{MR} (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) como equipo experimental compacto, con unidad de desarrollo y fuente de alimentación y unidad de tinción y lavado. Las placas de gel, PhastGel[®] Gradient 8-25 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) contenían un gradiente de poliacrilamida del 8 al 25%. Se utilizó un sistema de tampón discontinuo PhastGel[®] SDS Buffer Strips a pH 8.1 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Las proteínas utilizadas como marcadores para el calibrado del sistema y su masa molecular han sido: fosforilasa B (94000), seroalbúmina bovina (67000), ovoalbúmina (43000), anhidrasa carbónica (30000), inhibidor de la tripsina de soja (20100) y lactoalbúmina (14400), todas ellas suministradas por Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia). Coomassie Brilliant Blue R-250, β -mercaptoetanol, glicerol, ácido acético y dodecil sulfato sódico fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.).

4.1.4.- Espectroscopía de absorción ultravioleta

Las cadenas laterales aromáticas de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano, son las principales responsables de la absorbancia de las proteínas en la región ultravioleta. Las propiedades espectrales de estas cadenas laterales son muy sensibles al entorno que las rodea, desplazándose el máximo de absorbancia en función del medio en que se encuentren. El resto de aminoácidos con absorción en esta región del espectro no presentan una sensibilidad tan acusada. Debido al alto número de residuos, los aminoácidos aromáticos de una proteína se encuentran rodeados de una multitud de *microentornos* diferentes, por ello, el valor obtenido para la absorbancia en ultravioleta de una cadena polipeptídica refleja un valor medio del comportamiento espectral de cada uno de dichos grupos aromáticos.

Tabla 4.2: Propiedades espectroscópicas de los aminoácidos aromáticos a pH neutro (Creighton, 1993).

| | λ_{\max} (nm) | Absorbancia molar ($M^{-1}\cdot cm^{-1}$) |
|--------------|--------------------------|--|
| Fenilalanina | 257.4 | 197 |
| Tirosina | 274.6 | 1420 |
| Triptófano | 279.8 | 5600 |

Además este método puede ser de gran utilidad para el seguimiento y determinación de la concentración de proteína en los diferentes procesos de adsorción que se van a llevar a cabo ya que, realizando el calibrado adecuado, la concentración de proteína en disolución está relacionada proporcionalmente con la absorbancia a determinada longitud de onda.

La caracterización mediante la obtención del espectro ultravioleta se ha realizado con un espectrofotómetro de matriz de diodos modelo 8452A (Hewlett-Packard, Avondale, PE, EE.UU.).

4.2.- CARACTERIZACIÓN DE LOS ADSORBENTES

El conocimiento de las características fisicoquímicas de los sólidos porosos utilizados como adsorbentes es fundamental para comprender y, en su caso, explicar la interacción de este con el adsorbato en los diferentes procesos de adsorción. Por otro lado, los modelos fenomenológicos desarrollados incluyen algunos parámetros físicos de las resinas, como son la porosidad y la densidad de las mismas, por lo que es necesaria su caracterización.

En la tabla 4.3 se muestra la información, suministrada por el fabricante, sobre las propiedades fisicoquímicas de ambos adsorbentes. Debido a que esos datos no son suficientes o no están

suficientemente definidos de acuerdo con las necesidades planteadas anteriormente, se ha completado la caracterización mediante los ensayos que se describen a continuación.

Tabla 4.3: Propiedades fisicoquímicas comerciales de los adsorbentes de HIC e IEC.

| | Duolite XAD-761 (HIC) | Duolite A-568 (IEC) |
|-----------------------------|--|---|
| Matriz | Copolímero de fenol-formaldehído entrecruzado policondensado | |
| Grupo funcional | Hidroxilo fenólico (principal) Metilo | Amina terciaria |
| Densidad aparente [mg/ml] | 1.11 | 1.12 (forma básica) |
| Retención de humedad [%] | 60 - 65 | 57 - 65 |
| Radio de poro [nm] | 20 - 30 | 15 - 25 |
| Hinchamiento reversible [%] | 7 | 7 |
| Capacidad de intercambio | — | 1.2 eq/l (base húmeda) 5 eq/kg (base seca) |

En el presente trabajo de investigación se ha estudiado la adsorción de una proteína, la α -amilasa de *A. oryzae*, mediante dos mecanismos diferentes: interacción hidrofóbica (HIC) e intercambio iónico (IEC). Los adsorbentes utilizados han sido, respectivamente para cada uno de ellos, Duolite XAD-761 y Duolite A-568 (Rohm and Haas Co., Filadelfia, PA, EE.UU.). Los dos adsorbentes seleccionados tienen la misma matriz, diferenciándose fundamentalmente en los ligandos de que están recubiertos, confiriéndoles un carácter hidrofóbico o de intercambiador de aniones. Así, se podrán estudiar de forma más independiente el comportamiento en el proceso de adsorción debido a cada uno de los mecanismos mencionados.

4.2.1.- Adsorción en fase gaseosa

La adsorción de gases es una técnica ampliamente empleada para la caracterización de una gran variedad de tipos de sólidos porosos. En particular, la aplicación de estudios de fisisorción (adsorción física) es adecuada para determinar el área superficial, el volumen de poro y la distribución de tamaños de poro de catalizadores, adsorbentes, pigmentos, áridos y otros materiales. Para el presente trabajo se ha utilizado la adsorción de nitrógeno como técnica de caracterización de los adsorbentes porosos.

El equipo empleado para la caracterización de las resinas porosas por adsorción de nitrógeno ha sido un ASAP 2000 (Micromeritics Instrument Corp., Norcross, GA, EE.UU.).

Área superficial (Área BET)

La determinación del área superficial mediante esta técnica se basa en el conocimiento de la cantidad de gas necesario para formar una monocapa completa de moléculas del mismo adsorbidas a la superficie del sólido. A continuación se expone, de forma resumida, el procedimiento experimental:

Una cantidad conocida del sólido poroso que se desea analizar se desgasifica sometiéndola a calentamiento y vacío en una bureta de gases. La isoterma de adsorción se construye punto a punto registrando la presión de equilibrio que se alcanza tras la introducción en la bureta de cantidades conocidas de nitrógeno. Paralelamente, se debe realizar un ensayo en blanco para corregir la cantidad de gas que se adsorbe a las paredes del sistema.

La determinación del área superficial se lleva a cabo mediante el método estándar de Brunauer-Emmett-Teller (BET) a partir de los datos de la isoterma de fisisorción (Sing *et al.*, 1985):

$$\frac{p}{n^a (p^0 - p)} = \frac{1}{n_m^a C} + \frac{C - 1}{n_m^a C} \frac{p}{p^0} \quad [4.1]$$

donde n^a es la cantidad de gas adsorbida a la presión relativa p/p^0 , n_m^a representa la capacidad de la monocapa y C es una constante que depende exponencialmente de las entalpías de adsorción y licuefacción. De la pendiente de la representación lineal de $p/(n^a \cdot (p^0 - p))$ frente a p/p^0 (representación BET) se obtiene el valor de n_m^a . El intervalo de linealidad está restringido a una zona limitada de la isoterma, normalmente para valores de presión relativa inferiores a 0.3. Así, el área superficial (área BET) puede calcularse a partir de la siguiente ecuación:

$$A_{\text{BET}} = n_m^a \cdot L \cdot a_m \quad [4.2]$$

siendo a_m el área media ocupada por cada molécula adsorbida en la monocapa completa (su valor para N_2 a 77 K es 0.162 nm^2) y L es la constante de Avogadro.

Distribución de tamaño de poro

A valores altos de presión relativa (p/p^0), la forma de la isoterma de adsorción se curva hacia arriba debido al progresivo llenado los mesoporos del sólido mediante el proceso de condensación capilar. Cuando los mesoporos se llenan por completo, la isoterma se estabiliza alcanzando una línea horizontal. El volumen total de mesoporos puede derivarse de la cantidad de vapor adsorbido cuando la isoterma se encuentra en la zona estabilizada mencionada (es decir, cuando p/p^0 tiende a la unidad) y, por tanto, los poros se han llenado con el adsorbato condensado en estado líquido.

En base a la ecuación de Kelvin para la variación de la presión de vapor con la curvatura superficial del menisco de un líquido en un cilindro capilar cerrado por un extremo (Rouquérol *et al.*, 1994) y con los datos de fisisorción de nitrógeno en el adsorbente poroso se puede determinar el

volumen de poro asociado a cada valor del radio del mismo, r_p :

$$r_p = \frac{2 \sigma V_m \cos \theta}{RT \ln(p / p^0)} + t \quad [4.3]$$

donde σ y V_m son la tensión superficial y el volumen molar del líquido condensado respectivamente (para el nitrógeno líquido a 77.4 K, $\sigma = 8.72 \cdot 10^{-3}$ N/m, $V_m = 34.68$ cm³/mol y $\theta = 0^\circ$). El parámetro t es un factor de corrección que representa el espesor de la capa ya adsorbida en las paredes del poro (espesor de la multicapa).

El tamaño de los poros de mayor tamaño que pueden medirse mediante este método está limitado por la gran variación del radio del menisco del líquido con la presión cuando la presión reducida se acerca a la unidad (Satterfield, 1980). Por lo tanto, el método puede aplicarse a poros de hasta 60 nm de diámetro, produciendo errores significativos del volumen de poro en la zona de la distribución cercana a ese límite superior. Para determinar la distribución de tamaños correspondiente a poros del orden de 60 nm y mayores, se deberá recurrir a la porosimetría de mercurio.

4.2.2.- Porosimetría de mercurio

La porosimetría de mercurio es una técnica muy empleada para la determinación de la distribución del tamaño de poro así como de la porosidad y densidad de sólidos porosos.

En el presente trabajo se han caracterizado ambos adsorbentes porosos mediante esta técnica utilizando un equipo Micromeritics Pore Sizer 9310 (Micromeritics Instrument Corp., Norcross, GA, EE.UU.).

Distribución de tamaño de poro

Este método de caracterización se base en el comportamiento, en el interior de tubos capilares, de líquidos que no mojan. Cuando el ángulo de contacto, θ , entre el líquido y la superficie del sólido tiene un valor comprendido entre 90° y 180° , la tensión superficial del líquido, σ , se opone a la entrada del mismo en el interior del capilar. Para forzar su intrusión, es necesario aplicar suficiente presión hidrostática externa. En situación de equilibrio y para poros cilíndricos, la fuerza que se opone a la entrada del líquido y la fuerza debida a la presión externa aplicada se igualan, obteniéndose la siguiente relación (Smith, 1981) entre el radio de poro, r_p y la presión ejercida, P :

$$r_p = - \frac{2 \sigma \cos \theta}{P} \quad [4.4]$$

De acuerdo con la bibliografía (Rootare y Prenzlów, 1967), el valor más exacto para la tensión superficial del mercurio es de 0.485 N m⁻¹. El ángulo de contacto varía en función del material y su

valor oscila entre 120 y 150°. En el presente trabajo se ha utilizado un valor de 130° (Allen, 1990).

La aplicación de este principio fue desarrollada experimental y técnicamente por Ritter y Drake (1945). Para realizar experimentalmente este ensayo, se introduce una cantidad conocida del sólido poroso en un recipiente cerrado y se somete a vacío para eliminar el aire ocluido en los poros. Entonces, se añade un volumen conocido de mercurio de forma que cubra la muestra por completo. A continuación el sistema se somete a presiones progresivamente crecientes, midiendo, para cada valor de presión, la disminución del nivel de mercurio en la celda calibrada, correspondiente al volumen de mercurio que ha penetrado en los poros de la muestra. De acuerdo con la ecuación anterior, se determina el radio de poro para cada valor de presión externa. La distribución de tamaños de poro, $\Delta V/\Delta r_p$ frente a r_p , se obtiene teniendo en cuenta que el volumen de mercurio introducido en los poros, ΔV , en el intervalo de presiones P y $(P+\Delta P)$ coincide con el volumen de los poros cuyo radio está comprendido entre r_p y $(r_p-\Delta r_p)$. El volumen total ocupado por los poros viene dado por el valor final del volumen de mercurio que se ha introducido en los poros.

El tamaño mínimo de poros que puede medirse mediante la técnica de intrusión de mercurio viene impuesto por la presión máxima a la que el porosímetro es capaz de trabajar. Este valor es de, aproximadamente, de 350 MPa que se corresponde con un tamaño de poro de alrededor de 4 nm.

La densidad aparente, ρ_a , es aquella que tiene en cuenta el volumen ocupado por los poros y se determina midiendo la diferencia, previa a la aplicación de presión, entre el volumen ocupado por el mercurio en presencia y ausencia del sólido poroso. La densidad real, ρ_r , solo tiene en cuenta el material sólido del que están hechas las partículas:

$$\frac{1}{\rho_r} = \frac{1}{\rho_a} - v_p \quad [4.5]$$

siendo v_p el volumen de poro por unidad de masa de adsorbente.

La porosidad interna de las partículas sólidas puede ahora calcularse, a partir de su definición, mediante los datos experimentales obtenidos:

$$\varepsilon_p = \frac{v_p}{v_p + \frac{1}{\rho_a}} \quad [4.6]$$

Área superficial

Existen tratamientos matemáticos para estimar el área superficial del sólido poroso a partir de los datos obtenidos mediante porosimetría de mercurio basados en modelos que suponen geometrías específicas para describir los poros. El más sencillo de ellos es el que supone una distribución de poros

cilíndricos (Allen, 1990), aunque se ha descrito alguna en la que no es necesario considerar ninguna geometría determinada para la forma de los poros (Rootare y Prenslow, 1967). Se considera que el trabajo necesario para forzar la introducción del mercurio, por la acción de la presión, es proporcional a la superficie cubierta, de la siguiente manera:

$$dW = \sigma \cos\theta dS = -P dV \quad [4.7]$$

donde W es el trabajo realizado y S el área cubierta tras la aplicación del trabajo. Integrando en todo el intervalo de presiones se obtiene:

$$S = -\frac{1}{\sigma \cos\theta} \int_{V_0}^V P dV \quad [4.8]$$

o bien:

$$S_g = -\frac{1}{m \sigma \cos\theta} \int_{V_0}^V P dV \quad [4.9]$$

siendo S_g el área superficial específica y m la masa del sólido utilizada en el análisis.

4.2.3.- Absorción de líquido

Uno de los procedimientos más simples para la determinación del volumen de poros consiste en poner en contacto al sólido poroso con un líquido que lo moje, de tal manera que llene el espacio interno de la partícula formado por los poros (Anderson y Pratt, 1985). El procedimiento operativo seguido en el presente trabajo para cada uno de los adsorbentes utilizados se describe a continuación.

Se pesan, exactamente, alrededor de 5 gramos de sólido y, en un recipiente adecuado, se recubren con agua destilada en exceso durante 15 minutos. Posteriormente se centrifuga a 2100 rpm durante 40 minutos, se separa el agua en exceso y se pesa el sólido mojado. El volumen de fluido que se ha introducido en los poros se calcula mediante diferencia de peso entre el sólido húmedo y el seco, conocida la densidad del líquido.

4.2.4.- Distribución del tamaño de partícula por dispersión de luz

Una de las técnicas de determinación de la distribución de tamaños de partículas más importante y habitualmente utilizada es aquella que implica los diferentes métodos basados en la dispersión de luz.

Cuando un haz de radiación se ve interrumpido por la presencia de una partícula, sufre una dispersión que proporciona información acerca de dicha partícula. La distribución radial de la

intensidad de la radiación dispersada es función del tamaño, la forma y el índice de refracción de la partícula, de la longitud de onda de la radiación incidente y del índice de refracción relativo entre la partícula y el medio que la rodea (Allen, 1990). En base a estos principios existen dos tipos de analizadores que difieren en cuanto a la disposición de sus componentes principales; unos con el detector situado en ángulo recto respecto a la dirección del haz de luz incidente y otros con el detector enfrente al mismo en la misma dirección. El primero de ellos es muy sensible a cambios en el tamaño de partícula pero la dispersión, detectada a 90°, depende muy acusadamente del índice de refracción de la misma. En el segundo tipo de equipos, este último efecto es muy débil, aunque el tamaño mínimo de las partículas que puede detectar es algo más elevado que en el primer caso. Otras ventajas que presenta el sistema de detección situado en la misma dirección que el haz incidente son las que a continuación se indican (Allen, 1990):

- el tamaño medio puede determinarse sin necesidad de diagramas teóricos de dispersión.
- es independiente de la concentración en un amplio intervalo.
- no es demasiado sensible a la forma de las partículas.
- se puede hacer uso de las teorías establecidas sobre el efecto (Rayleigh-Gans, Fraunhofer).
- puede determinarse la dispersión de la distribución.

La cantidad de luz dispersada por partículas de menor tamaño que la longitud de onda de la radiación incidente es directamente proporcional a su volumen y para partículas mayores dicha cantidad está relacionada con el área transversal de la partícula proyectada en el haz de luz. Si la fuente de emisión es un láser, en lugar de una lámpara de luz blanca, el aumento de la intensidad hace que la determinación sea mucho más precisa y permita medir distribuciones de partículas de mucho menor tamaño (hasta de 0.05 μm dependiendo del sistema de detección).

La distribución de tamaños de partículas mediante dispersión de láser se ha llevado a cabo en un equipo MasterSizer X[®] 6023 (Malvern Instruments Ltd. Worcestershire, Gran Bretaña).

4.3.- MÉTODOS DE ANÁLISIS

A continuación se describen los métodos utilizados para el seguimiento de la α -amilasa en los procesos de adsorción llevados a cabo en el presente trabajo. El principal de ellos ha sido el seguimiento y determinación de la concentración de α -amilasa mediante absorción ultravioleta a 280 nm. La razón de esta elección ha sido la sencillez, rapidez, exactitud y bajo coste del procedimiento. Además, esta técnica ha mostrado ser altamente reproducible y repetitiva. La medida de la actividad hidrolítica de la α -amilasa se ha utilizado para comprobar la variación de la función enzimática durante el desarrollo de los procesos de adsorción y determinar la influencia del proceso en la desnaturalización, si esta se produjese, de la proteína.

4.3.1.- Absorbancia en ultravioleta

La relación entre la absorbancia, A, y la concentración molar, c, viene dada por la ley de Lambert-Beer:

$$\varepsilon = \frac{A}{c d} \quad [4.10]$$

siendo d el espesor de muestra que tiene que atravesar la luz y ε el coeficiente de extinción molar, el cual es un valor característico de la sustancia que también depende de la longitud de onda (Perkampus, 1992). Los espectrofotómetros suelen producir gráficos que relacionan la longitud de onda frente a la absorbancia, la cual se define mediante la siguiente relación:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad [4.11]$$

donde I_0 e I son la intensidad de la luz monocromática incidente y transmitida respectivamente.

Según lo descrito en el apartado 4.1.3, las disoluciones de proteína absorben en la región ultravioleta debido, principalmente, a la existencia de grupos aromáticos en los residuos de fenilalanina, tirosina y triptófano que forman la cadena polipeptídica. En concreto, la α -amilasa presenta un máximo de absorbancia a 280 nm por lo que se ha utilizado este valor para realizar el seguimiento y medida de la concentración de α -amilasa en cada uno de los experimentos que así lo requerían en el presente trabajo de investigación. En la figura 4.3 se muestra la relación existente entre la concentración de α -amilasa y la absorbancia correspondiente a 280 nm.

4.3.2.- Actividad de α -amilasa

La α -amilasa es una enzima amilolítica que cataliza la hidrólisis de los enlaces α -1,4 entre las subunidades de α -D-glucosa que forman el almidón, siendo maltosa y dextrinas los productos finales de la reacción.

Cuando se planifica y realiza un proceso de purificación de una proteína con actividad enzimática, un objetivo prioritario junto con la eficacia del proceso y el grado de pureza definido por las especificaciones del producto final, es el de mantener la actividad catalítica que presenta para una o varias reacciones determinadas.

Los métodos de medida de la actividad enzimática de una proteína suponen la puesta en contacto de la misma con el sustrato en unas condiciones de pH, temperatura, fuerza iónica y composición del medio de reacción durante un tiempo determinado. Para cada enzima o tipo de enzimas pueden describirse diferentes definiciones de actividad con distintos procedimientos para determinarla. Las diferencias entre cada uno de los métodos de determinación de la actividad

consisten, principalmente, en:

- Condiciones y composición del medio reacción
- Tiempo de reacción
- Referencia al sustrato consumido o al producto formado
- *Método de análisis para la detección y cuantificación del sustrato o del producto*

Dependiendo de la definición de actividad, el ensayo correspondiente para su determinación varía. Las equivalencias entre las diferentes unidades de actividad son difíciles de establecer o incluso pueden no llegar a deducirse o establecerse. Por otro lado, este tipo de ensayos son de difícil estandarización debido a la baja reproducibilidad que existe al realizarla con medios y equipos diferentes. Por ello, los análisis de actividad deberán servir como herramienta comparativa de la pérdida o no de la actividad catalítica de la enzima objeto de ensayo.

De los numerosos ensayos de actividad descritos para la α -amilasa, en el presente trabajo se ha utilizado un método simple, exacto y rápido (Bernfeld, 1955) en el que la actividad se define de la siguiente manera: "Una unidad libera 1.0 mg de maltosa a partir de almidón en 3 minutos a pH 6.9 y 20°C". El procedimiento consiste en añadir un volumen determinado de disolución de enzima sobre una disolución de almidón de concentración conocida. La mezcla se incuba durante 3 minutos a 20°C, transcurridos los cuales se detiene la reacción mediante inmersión en agua hirviendo. A continuación se añade un reactivo que colorea la muestra en función de la maltosa producida en el medio y tras enfriamiento del conjunto, se diluye con agua. Para cada ensayo se deberá realizar el correspondiente análisis en blanco (sin enzima), determinando la cantidad de maltosa producida, y por tanto la actividad, por comparación de la absorbancia medida a 540 nm con los resultados obtenidos para una recta de calibrado realizada con diferentes concentraciones de maltosa conocidas.

4.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se muestran los resultados experimentales obtenidos a partir de los ensayos de caracterización del adsorbato, α -amilasa, y los adsorbentes de interacción hidrofóbica e intercambio iónico, Duolite XAD-761 y Duolite A-568 respectivamente, mediante las técnicas descritas a lo largo de los apartados precedentes.

4.4.1.- Caracterización del adsorbato

Cantidad de proteína

Se ha llevado a cabo la medida de la concentración de proteína total mediante absorción

ultravioleta a 260 y 280 nm y por el método de Bradford. Se observa disparidad en los resultados obtenidos por ambos métodos para cada una de las proteínas ensayadas. Las enzimas comerciales suelen contener sustancias que pueden interferir en ambos métodos. La pureza de la α -amilasa purificada a partir de Fungamyl 1600 BG mediante el método de cristalización descrito en el apartado 4.1.2 es con los dos métodos descritos, 2.8 y 2.6 veces la obtenida para el preparado comercial de partida, obteniéndose valores superiores al 100%. Esta circunstancia puede ser debida a que el valor del coeficiente de extinción molar de la α -amilasa no tiene necesariamente que ser similar al de las proteínas utilizadas en las correlaciones de absorbancias en la región ultravioleta ni su respuesta en el método de Bradford igual a la de la seroalbúmina bovina del calibrado correspondiente. Sin embargo, el factor de concentración, definido como el cociente entre la concentración de la enzima purificada y la de la α -amilasa de partida, son muy próximos para ambos métodos. Esto puede indicar que, en el proceso de cristalización, la concentración de α -amilasa se ha multiplicado por un factor de, aproximadamente, 2.7.

Espectroscopía ultravioleta

La caracterización de la α -amilasa mediante espectroscopía de absorción ultravioleta puede observarse en la figura 4.2. El espectro de absorción de la α -amilasa en la región ultravioleta presenta un máximo de absorbancia a 280 nm que, prácticamente, no se desplaza en un amplio intervalo de concentración. La otra región de alta absorbancia sitúa su máximo a una longitud de onda alrededor de 210 nm, desplazándose hacia valores mayores según aumenta la concentración de la muestra. La absorción de luz ultravioleta en esta banda del espectro se debe a la presencia del enlace peptídico de las proteínas.

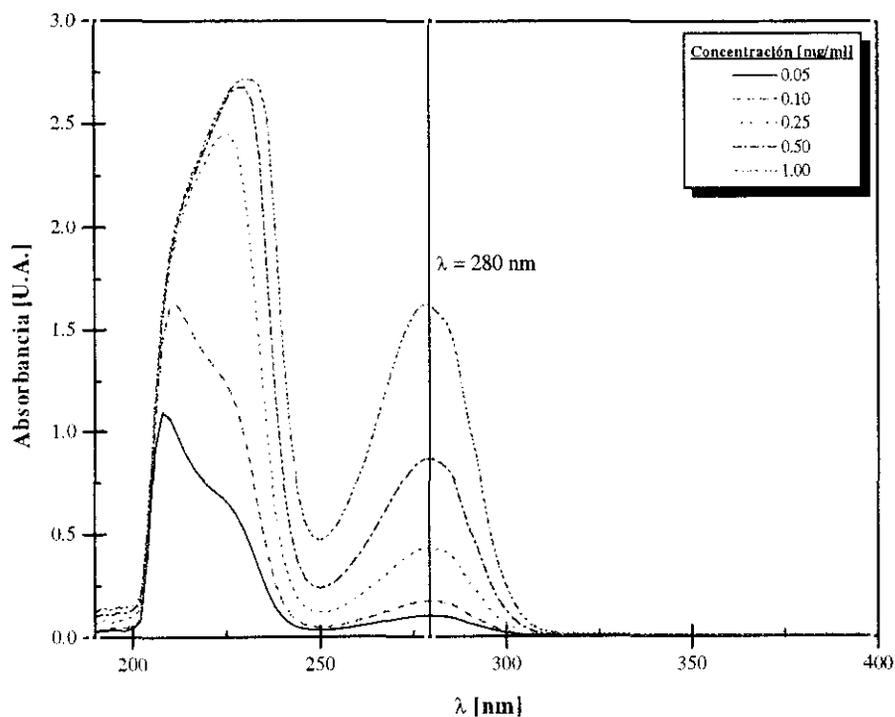


Figura 4.2: Espectro de absorción UV de la α -amilasa a diferentes concentraciones en tampón Tris/HCl 0.05M, pH 7.0 y fuerza iónica 0.60.

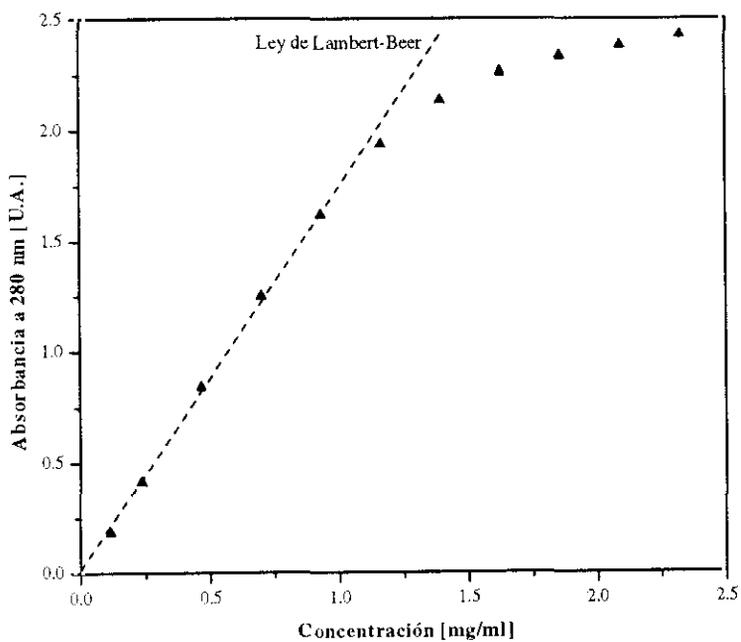


Figura 4.3: Relación entre la absorbancia a 280 nm y la concentración de α -amilasa en disolución de tampón Tris/HCl 0.05M, pH 7.0 y fuerza iónica 0.60.

A partir de los resultados obtenidos para el espectro de α -amilasa se procedió a realizar un

calibrado de la absorbancia a 280 nm frente a la concentración de enzima en disolución (figura 4.3). Con el fin de determinar la concentración de α -amilasa, puede considerarse que sus disoluciones siguen la ley de Lambert-Beer hasta una concentración de, aproximadamente, 1 mg/ml. Por esta razón, en el presente trabajo, la medida de concentraciones superiores a ese valor se ha realizado mediante dilución de la muestra original o mediante el uso de la curva de calibrado de la figura 4.3. La utilización del primer procedimiento se encuentra limitada a casos en los que no sea necesaria la recuperación de la fracción de disolución medida y la del segundo no estaría aconsejada, en cualquier caso, a concentraciones superiores a 2.2 mg/ml debido al error que se generaría ya que a partir de ese valor la variación de la absorbancia a 280 nm es excesivamente pequeña.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

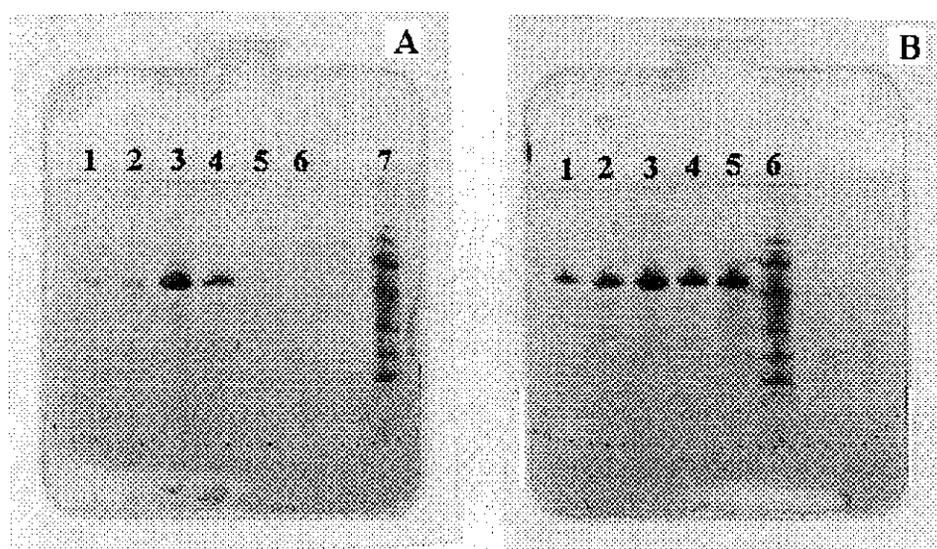


Figura 4.4: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Las muestras corresponden a las siguientes enzimas: (A1) Rapidase PFP, (A2) Rapidase PS, (A3) Amylase P500, (A4) Grindamyl A5000, (A5) Grindamyl S100, (A6) Grindamyl S250, (A7) Marcadores de masa molecular; (B1) Fungamyl 1600 BG, (B2) α -amilase type X-A, (B3) Sanzyme SP6300, (B4) Sanzyme SP3500, (B5) Sanzyme A7000, (B6) Marcadores de masa molecular.

Mediante análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, se ha observado que no hay presencia significativa de otras proteínas en Fungamyl 1600 BG (figura 4.4), lo cual también ha sido confirmado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en estado nativo.

Para determinar la presencia o no de sales acompañando a la enzima liofilizada, procedentes de la formulación de Fungamyl 1600 BG o del propio proceso de purificación, se procedió a medir la conductividad de una disolución de α -amilasa cristalizada. El resultado fue una variación

prácticamente nula de la conductividad, en cualquier caso correspondiente a una disolución de fuerza iónica menor de 0.001. Esto indicaría que la cantidad de sales que acompañan a la α -amilasa en la muestra cristalizada es un pequeño porcentaje de la masa total.

4.4.2.- Caracterización de los adsorbentes

Adsorción en fase gaseosa

Tras los datos correspondientes a las isotermas de adsorción (figuras 4.5A y 4.5B) y mediante las ecuaciones 4.1 y 4.2 se obtuvo el área BET de los dos adsorbentes estudiados. Los análisis de las resinas mediante esta técnica han dado como resultado un área BET considerablemente mayor para la resina de intercambio iónico frente al determinado para la hidrofóbica. Los valores obtenidos han sido, respectivamente, de 27.2 m²/g para la Duolite XAD-761 y 92.8 m²/g para la Duolite A-568.

A partir de los datos de adsorción de nitrógeno se determinó la distribución de tamaño de poro, obteniendo valores cercanos y superiores a 60 nm por lo que dicha distribución se dará a partir de los resultados obtenidos mediante porosimetría de mercurio.

Como puede observarse, ambas isotermas pueden clasificarse dentro del tipo II (Brunauer *et al.*, 1940) que se corresponde con isotermas típicas de sólidos meso- y macroporosos, presentando adsorción en multicapa sin restricciones sobre un sustrato heterogéneo, completándose la monocapa de nitrógeno al alcanzar el punto de inflexión ($p/p^0 \approx 0.25$) (Emmet y Brunauer, 1937). Las isotermas de los dos adsorbentes muestran histéresis del tipo H1, correspondiente a la existencia de poros tubulares abiertos con secciones transversales de diferentes formas (Anderson y Pratt, 1985).

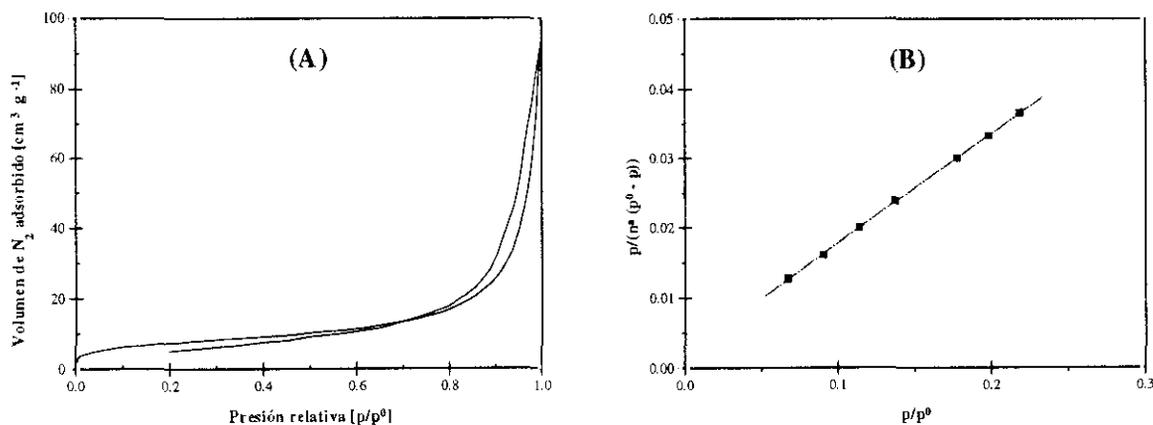


Figura 4.5: Duolite XAD-761: (A) Isotherma de adsorción-desorción de N₂, (B) gráfica BET.

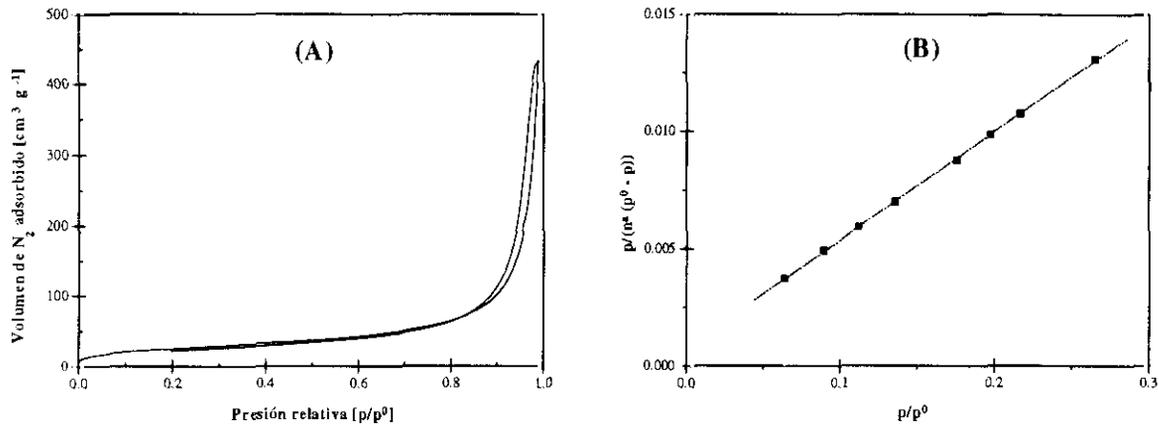


Figura 4.6: Duolite A-568: (A) Isotherma de adsorción-desorción de N₂, (B) gráfica BET.

En la siguiente tabla se resumen los valores obtenidos tras la caracterización de los sólidos adsorbentes por adsorción de nitrógeno.

Tabla 4.4: Resultados de la adsorción de nitrógeno.

| | Duolite XAD-761 | Duolite A-568 |
|------------------------------|-----------------|---------------|
| Área BET [m ² /g] | 27.2 | 92.8 |
| C (ecuación 4.1) | 79.3 | 62.7 |

Porosimetría de mercurio

Los resultados experimentales de distribución de tamaños de poro obtenidos (ecuación 4.4), para los dos adsorbentes, mediante porosimetría de mercurio se muestran gráficamente en la figura 4.7.

El volumen de intrusión de mercurio correspondiente a poros de tamaño superior a 1000 nm se ha considerado que pertenece al espacio interparticular de la muestra analizada. Los resultados muestran una distribución de tamaños de poro más estrecha en el caso de la resina Duolite A-568. Una fracción importante del volumen interno de esta resina (69%) es debido a la existencia de poros que se encuentran en la región de los mesoporos (tamaño entre 2 y 50 nm), correspondiendo el resto a la región de los macroporos. De hecho, el 75% del volumen de poros para este adsorbente pertenece a poros de tamaño entre 20 y 80 nm. La distribución para la resina hidrofóbica, Duolite XAD-761, es más abierta, conteniendo poros en un intervalo de tamaños mayor. La fracción de volumen correspondiente a los mesoporos es del 41%, conteniendo una cantidad significativa de macroporos de tamaño superior a 200 nm y mesoporos inferiores a 20 nm.

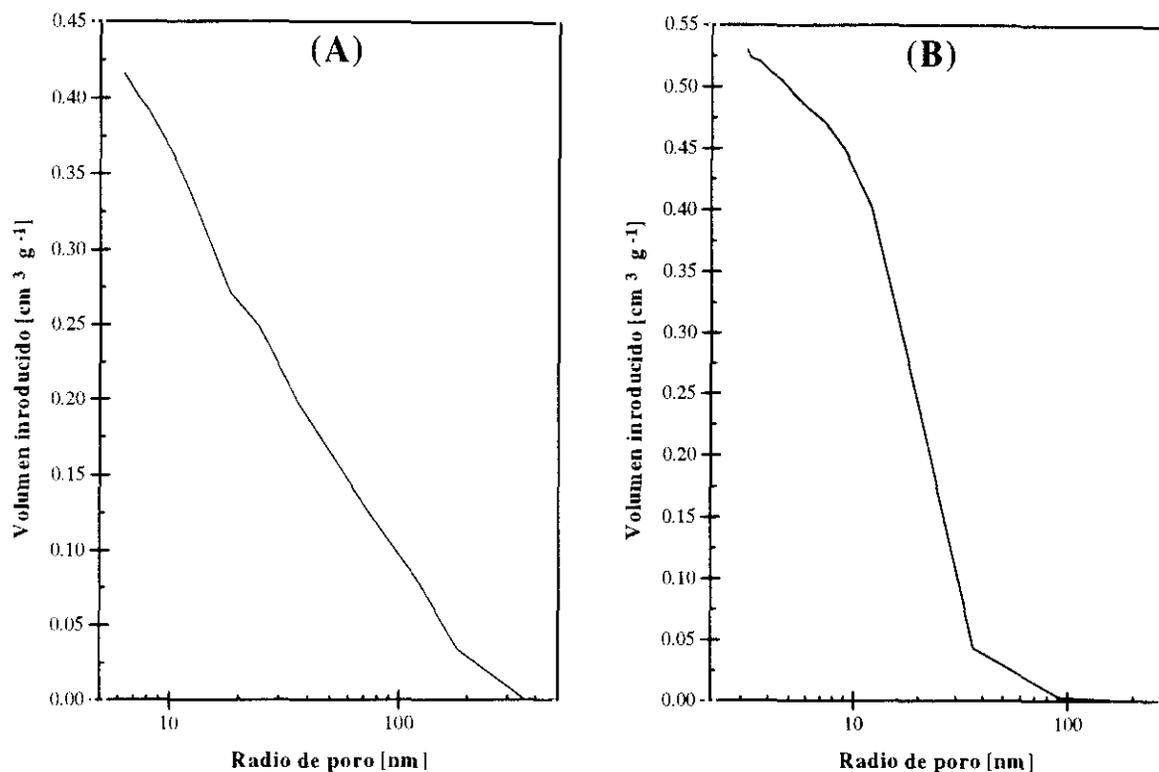


Figura 4.7: Distribución volumétrica acumulada de tamaño de poro mediante porosimetría de mercurio: (A) Duolite XAD-761, (B) Duolite A-568.

Los valores de porosidad y densidades se calcularon de acuerdo a las expresiones mostradas en las ecuaciones 4.4 y 4.5 a partir de los datos experimentales obtenidos por porosimetría de mercurio. En la tabla 4.5. se resumen los parámetros físicos obtenidos para cada uno de los adsorbentes analizados por este método.

Tabla 4.5: Resultados de la porosimetría de mercurio.

| | Duolite XAD-761 | Duolite A-568 |
|--|-----------------|---------------|
| Volumen de poro [cm ³ /g] | 0.42 | 0.53 |
| Densidad aparente [g/cm ³] | 1.08 | 0.94 |
| Densidad real [g/cm ³] | 1.97 | 1.89 |
| Porosidad | 0.45 | 0.50 |
| Tamaño medio de poro (nm) [§] | 23.0 | 28.5 |

[§] Obtenido a partir de: $\phi = (4 \cdot v_p) / S_g$

Absorción de líquido

La técnica de absorción de líquido (agua) no se ha mostrado adecuada para la determinación del volumen de poros para la resina Duolite XAD-761 ya que una fracción de la muestra flotaba parcialmente y se obtuvo un valor excesivamente bajo. Para el otro adsorbente, Duolite A-568, el ensayo se pudo realizar correctamente, estimándose un valor del volumen de poro específico de $0.59 \text{ cm}^3/\text{g}$, próximo al determinado mediante porosimetría de mercurio.

Tamaño de partícula por dispersión de luz

Se ha determinado la curva de distribución de tamaños de partícula para las ambas resinas correspondientes a las fracciones utilizada como relleno de las columnas de HPLC. Para partículas de tamaño menor de $100 \mu\text{m}$ el tamizado mecánico puede verse dificultado por factores tales como la electricidad estática que acumula el sólido. En estos casos, la fracción de partículas recogida entre dos tamices puede que tenga un tamaño de corte inferior que no coincida con el nominal del tamiz de menor tamaño de luz de malla. Por otro lado, la existencia de partículas que no se asemejen a una esfera, es decir que tengan una dimensión diferente a las otras dos, puede producir que en la fracción recogida por tamizado existan partículas mayores que las que le correspondería al tamiz de mayor tamaño.

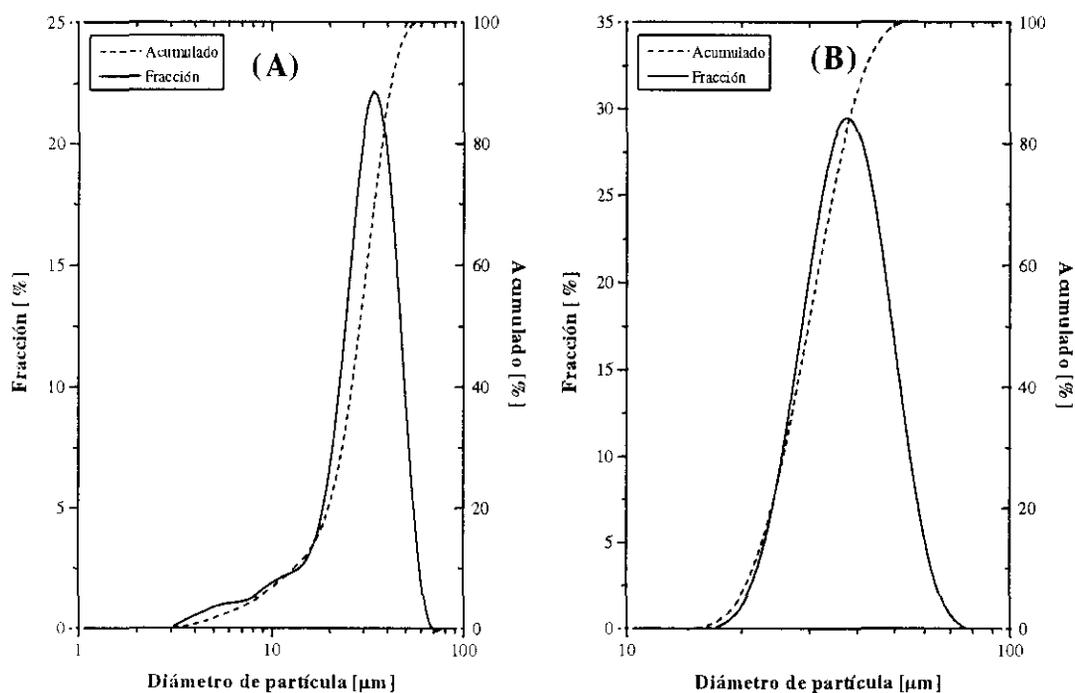


Figura 4.8: Distribución de tamaño de partícula de la fase estacionaria de las columnas de HPLC: (A) Duolite XAD-761, (B) A-568.

Ambos efectos no son tan significativos a medida que se aumenta el tamaño de las partículas con las que se trabaja. Por ello, en los experimentos de adsorción en tanque agitado y lecho fijo, en los que se utilizan partículas de mayor tamaño, se tomará el valor medio de la luz de malla de los tamices utilizados para cada fracción como tamaño medio de las partículas.

La distribución de tamaños de partícula para las resinas indicadas se muestran en la figura 4.8. En ambos casos el máximo de la distribución se sitúa en un valor de 36 μm . Sin embargo, la distribución correspondiente a la resina de HIC (Duolite XAD-761) es más abierta, contando con una fracción significativa de partículas inferiores a 10 μm , lo cual dará un empaquetamiento más compacto que la columna de intercambio iónico.

4.5.- BIBLIOGRAFÍA

- Akabori, S.; Ikenaka, T. y Hagihara, B. (1954). "Isolation of crystalline taka-amylase A from Takadiastase Sankyo", *J. Biochem.*, **41** (5), 577-582.
- Allen, T. (1990), en: *Particle size measurement* (4ª ed.), Chapman and Hall, Londres.
- Anderson, J.R. y Pratt, K.C. (1985), en: *Introduction to characterization and testing of catalysts*, Academic Press Australia, Melbourne.
- Bernfeld, P. (1955). "Amylases, α and β ", *Methods Enzymol.*, **1**, 149-158.
- Bradford, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Creighton, T.E. (1993), en: *Proteins: structures and molecular properties* (2ª ed.), W.H. Freeman, Nueva York.
- Dawson, R.M.C.; Elliott, D.C.; Elliott, W.H. y Jones, K.M. (1993), en: *Data for biochemical research* (3ª ed.), Clarendon Press, Oxford.
- Drake, L.C. y Ritter, H.L. (1945). "Macropore-size distributions in some typical porous substances", *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **17** (12), 787-791.
- Emmett, P.H. y Brunauer, S. (1937). "The use of low temperature Van der Waals adsorption isotherms in determining the surface area of iron synthetic ammonia catalysts", *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 1553-1564.
- Perkampus, H.H. (1992), en: *UV-Vis spectroscopy and its applications*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Pharmacia Biotech [a]. "PhastSystem. Separation technique. File No 110. SDS-PAGE", Uppsala.

Suecia.

- Pharmacia Biotech [b]. "PhastSystem. Development technique. File No 200. Fast coomassie staining", Uppsala, Suecia.
- Ritter, H.L. y Drake, L.C. (1945). "Pore-size distribution in porous materials. Pressure porosimeter and determination of complete macropore-size distributions", *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **17** (12), 782-786.
- Rootare, H.M. y Prenzlow, C.F. (1967). "Surface area from mercury porosimeter measurements", *J. Phys. Chem.*, **71** (8), 2733-2736.
- Rouquérol, J.; Avnir, D.; Fairbridge, C.W.; Everett, D.H.; Haynes, J.H.; Pernicone, N.; Ramsay, J.D.F.; Sing, K.S.W. y Unger, K.K. (1994). "Recommendations for the characterization of porous solids", *Pure & Appl. Chem.*, **66** (8), 1739-1758.
- Satterfield, C.N. (1980), en: *Heterogeneous catalysis in practice*, McGraw-Hill, Nueva York.
- Scopes, R.K. (1987), en: *Protein purification. Principles and practice* (2ª ed.), Springer-Verlag, Nueva York.
- Sing, K.S.W.; Everett, D.H.; Haul, R.A.W.; Moscou, L.; Pierotti, R.A.; Rouquérol, J. y Siemieniewska, T. (1985). "Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity", *Pure & Appl. Chem.*, **57** (4), 603-619.
- Smith, J.M. (1981), en: *Chemical engineering kinetics* (3ª de.), McGraw-Hill, Tokio.
- Spector, T. (1978). "Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation", *Anal. Biochem.*, **86**, 142-146.
- Warburg, O. y Christian, W. (1941). "Isolierung und kristallisation des gärungsfermenter enolase", *Biochem. Z.*, **310**, 384-421.

5. EXPERIMENTAL

En el presente capítulo se detallan los materiales y se describen los equipos experimentales utilizados durante la realización del trabajo de investigación para cada uno de los procedimientos estudiados: impulsos de adsorbato en columnas de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), adsorción en tanque agitado discontinuo y adsorción en lecho fijo. También se describen los métodos utilizados para desarrollar cada uno de los experimentos que se han llevado a cabo. Por último se justifica la elección de las variables y condiciones de operación en base a los objetivos que se desean alcanzar y el conocimiento previo de los sistemas que se ha obtenido a partir de los experimentos diseñados para tal fin.

5.1.- PREPARACIÓN DE LOS ADSORBENTES

Previamente a la utilización de ambos adsorbentes es necesario someterles a un pretratamiento con el fin de eliminar las impurezas y restos del monómero del que están que están formados y que hubiese quedado ocluido durante el proceso de síntesis, mejorando así el rendimiento de la adsorción.

A la resina de intercambio iónico se la sometió, de forma secuencial y en discontinuo, a

tratamiento con 5 volúmenes de NaOH 1.5M, 20 de agua destilada, 5 de HCl 2.0M y de nuevo agua destilada hasta alcanzar un pH neutro. Para realizar el pretratamiento a la resina hidrofóbica se repitió dos veces la secuencia descrita anteriormente, tras la cual se lavó con metanol y, finalmente, con agua destilada. A continuación cada resina fue sometida a vacío (2 mmHg) en un desecador con objeto de eliminar todo el agua retenida y adsorbida por ella.

A lo largo de toda la experimentación realizada en el presente trabajo, se han utilizado diferentes tamaños de partícula, para lo que, en cada caso, se tamizó para obtener la fracción correspondiente al tamaño deseado.

5.2.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia es una técnica ampliamente utilizada como método analítico de una multitud de compuestos químicos de muy diversa naturaleza. Se ha descrito su capacidad como método preparativo (Felinger y Guiochon, 1994; Compton y Kreilgaard, 1994, Kenney *et al.*, 1989; Velayudhan y Horváth, 1988; Gooding *et al.*, 1986) o incluso como método de purificación a escala industrial para la industria farmacéutica (Kato *et al.*, 1985; Clonis *et al.*, 1986).

Debido a su exactitud, sensibilidad, repetibilidad, facilidad de uso y necesidad de muy pequeñas cantidades de muestra, también puede ser utilizada como herramienta de la investigación para conocer las propiedades y características de adsorbatos y adsorbentes así como para estudiar la interacción que se produce entre ambos.

En el presente trabajo de investigación, las curvas de respuesta (picos cromatográficos) obtenidas tras la introducción de un impulso de α -amilasa en las columnas de HIC e IEC se han obtenido mediante un equipo de HPLC. Los datos experimentales, así obtenidos, se utilizarán para realizar el análisis mediante el método de los momentos. La experimentación llevada a cabo con este sistema, cuya descripción se detalla más adelante, produce una doble información: en primer lugar, nos permitirá estudiar la influencia de las variables en base a un análisis de los parámetros *clásicos* de la cromatografía (tiempos de retención, factor de retención, parámetro de interacción hidrofóbica, carga característica del adsorbato, etc.); en segundo lugar, el análisis mediante el método de los momentos (ver apartado 3.2) nos dará estimaciones de la capacidad de los adsorbentes, de los parámetros cinéticos (coeficiente de difusión en los poros y de dispersión axial) y termodinámicos (isoterma lineal, entalpía y entropía de adsorción).

A continuación se describe el equipo experimental de cromatografía líquida junto con los procedimientos utilizados para el desarrollo de cada uno de los experimentos y los ensayos previos llevados a cabo para la definición y conocimiento del sistema.

5.2.1. Materiales

Como fuente de α -amilasa de *Aspergillus oryzae* se utilizó la procedente del producto comercial Fungamyl 1600 BG type WF, lote AF12614, donada por Novo Nordisk (Bagsværd, Dinamarca). La enzima se extrajo, cristalizó y liofilizó según se indica en el apartado 4.1.2 del presente trabajo.

Los adsorbentes utilizados fueron, para los estudios de adsorción por interacción hidrofóbica (HIC), Duolite XAD-761 y, para los correspondientes a adsorción por intercambio aniónico (IEC), Duolite A-568. Ambos han sido donados por Rohm and Haas Co. (Filadelfia, PA, EE.UU.). Tras ser sometidos al pretratamiento correspondiente (ver apartado 5.1), fueron tamizados para obtener la fracción de tamaño seleccionada.

Las disoluciones reguladoras utilizadas como fase móvil fueron Tris/HCl 0.05M y fosfato 0.05M en función del valor de pH requerido para cada experimento. La fuerza iónica se ajustó mediante la adición de NaCl. Para estabilizar la estructura y actividad de la α -amilasa es necesaria la presencia de Ca^{2+} en el medio (Vallee et al., 1959; Janecek y Baláz, 1992), por lo que a cada disolución utilizada se le han añadido 40 ppm de CaCl_2 . Los trazadores utilizados para los experimentos en impulso fueron, NaCl 2M y NaNO_3 0.25M en el tampón correspondiente para las columnas de intercambio iónico e interacción hidrofóbica respectivamente. Todas las disoluciones fueron filtradas a través de membrana de 0.22 μm Millipore GSWP04700 (Millipore Corp. Bedford, MA, EE.UU.).

Los reactivos tris(hidroximetil)aminometano (Tris), NaCl, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 y CaCl_2 han sido suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.), el ácido clorhídrico por Merck (Darmstadt, Alemania) y el NaNO_3 por Panreac Química (Barcelona, España). El agua utilizada ha sido destilada y desionizada ($< 5 \text{ M}\Omega\text{-cm}$).

5.2.2.- Equipo experimental

El equipo de cromatografía líquida utilizado fue un Smart^{MR} System (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). En la figura 5.1 se muestra un esquema del mismo. Consta de un sistema de dos bombas de pistón y una cámara termostaticada donde se aloja la columna, la válvula de inyección, el colector de fracciones y los detectores de ultravioleta y de conductividad. La válvula de inyección incluye un lazo de 5 μl para la introducción de la muestra. El sistema refrigeración se completa con un baño termostático Haake D8-L (Haake, Karlsruhe, Alemania).

Las bombas de impulsión, de 10 ml de capacidad, tienen un intervalo de funcionamiento de 10-2000 $\mu\text{l}/\text{min}$ a una presión máxima de 25 MPa. El detector ultravioleta junto con una lámpara de

xenón permite medir la absorbancia, de forma simultánea, a tres valores de longitud de onda en el intervalo 190-600 nm. El volumen muerto del sistema es muy pequeño y se debe, principalmente, al correspondiente a los tubos por los que circula la fase móvil (80 μ l) y al mezclador a la salida de las bombas (60 μ l) ya que la contribución de la célula de detección de ultravioleta (2 μ l) y de conductividad (1.5 μ l) es, en comparación, despreciable.

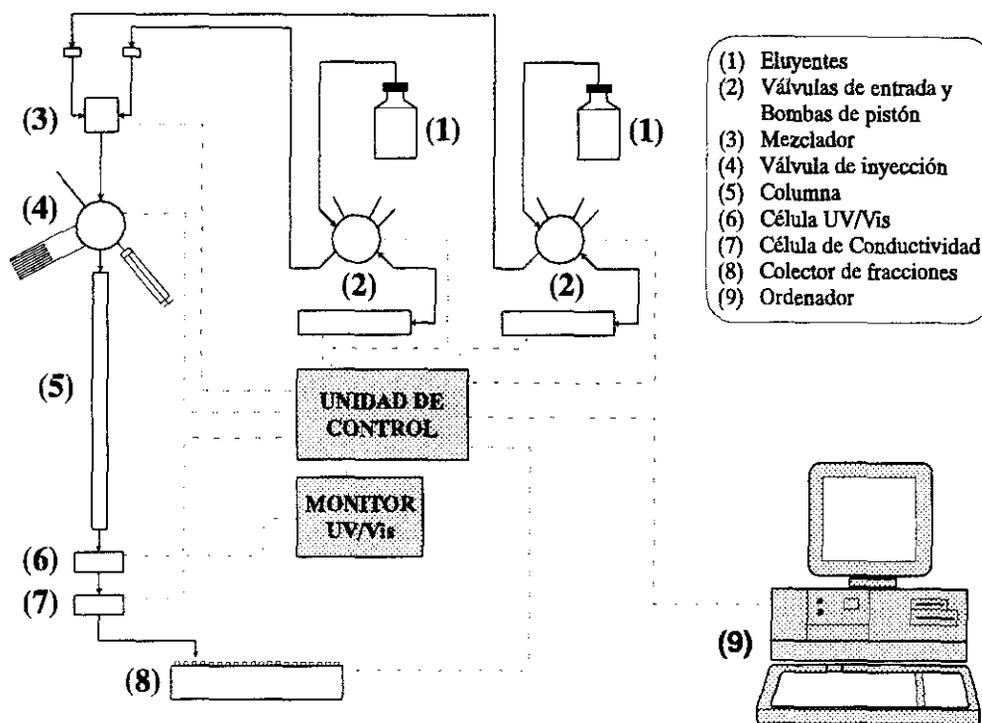


Figura 5.1: Esquema del equipo de HPLC (Smart System).

Las columnas de HPLC utilizadas están realizadas en acero inoxidable y tienen unas dimensiones de 2.1 mm de diámetro interno y 200 mm de longitud.

Un programa (Smart Manager), del mismo fabricante, implementado en un ordenador personal (Compaq Deskpro XE 466. Compaq Computer Corp., Houston, TX, EE.UU.) gestiona y controla cada uno de los sistemas mencionados a través de una tarjeta de adquisición de datos, así como programa y registra los datos de presión, temperatura, caudal, posición de la válvula, absorbancia en ultravioleta y conductividad del efluente que proporcionan los correspondientes sensores y detectores.

5.2.3.- Relleno y preparación de las columnas de HPLC

Las columnas de HPLC se empacaron en el laboratorio de la siguiente manera. Una vez realizado el pretratamiento (ver apartado 5.1) a cada uno de los adsorbentes, se tamizaron y se recogió

la fracción seleccionada para los experimentos (25-38 μm). Posteriormente se suspendieron en una disolución de ácido acético que fue bombeada a través de la columna de HPLC aplicando una presión aproximada de 45 MPa. La columna se mantuvo a la citada presión hasta que 2 litros de la suspensión pasaron a través de ella. Para terminar la preparación, se procedió al lavado de la columna, haciendo pasar agua destilada a un caudal de 1.0 ml/min durante 24 horas. Una vez realizado este proceso, se conecta la columna al equipo para el desarrollo de la experimentación.

La masa de adsorbente en el interior de la columna se determinó por diferencia de pesada entre la cantidad inicial utilizada y la resina sobrante del proceso de empacado tras el secado de la misma.

5.2.4.- Desarrollo de un experimento

Antes de realizar cualquier experimento en impulso o grupo de ellos en unas condiciones de temperatura, pH y fuerza iónica determinada, es necesario que la columna se acondicione adquiriendo los parámetros mencionados. Para el acondicionamiento de la columna, con el tampón de concentración, pH y fuerza iónica seleccionado, se bombea, a un caudal de 0.50 ml/min, la fase móvil adecuada durante 12 horas aproximadamente. Previamente las disoluciones han debido ser filtradas y desgasificadas a vacío (60 mmHg aproximadamente) inmediatamente antes de la experimentación para evitar el ensuciamiento y posible taponamiento de la parte superior de la columna y obtener cromatogramas sin *ruido* ni deriva en la línea base

Una vez acondicionada la columna, se fija el caudal de la fase móvil y se realiza el llenado del lazo de la válvula de inyección con la disolución de α -amilasa o del trazador correspondiente. Posteriormente y mediante el programa de control, se inyecta la muestra en la fase móvil que fluye a través de la columna.

El seguimiento de la concentración de α -amilasa a la salida de la columna se realizó mediante los datos de absorbancia a 280 nm del detector de ultravioleta. El trazador utilizado en la columna de IEC fue NaCl 2M, realizándose la medida de la respuesta mediante el detector de conductividad. Como trazador en la columna de HIC se utilizó NaNO_3 0.25M, detectándose mediante absorbancia en ultravioleta a 280 nm. Estos datos se almacenan en el ordenador para su posterior tratamiento mediante el método de los momentos como se indica en el apartado 3.2.

5.2.5.- Experimentos previos

Antes de comenzar la experimentación para el posterior análisis matemático de los momentos cromatográficos obtenidos en los experimentos en impulso, es necesario determinar los valores o, en

su caso, los intervalos de operación de las variables que influyen en la respuesta del sistema.

Adsorbentes

Como ya se ha comentado anteriormente, se va a estudiar la adsorción de α -amilasa sobre dos sistemas con mecanismos de retención diferente, intercambio iónico e interacción hidrofóbica. Se han seleccionado dos adsorbentes que tienen la misma matriz, diferenciándose fundamentalmente en los ligandos de que están recubiertos. Así, se podrán estudiar de forma más independiente el comportamiento en el proceso de adsorción debido a cada uno de los mecanismos mencionados.

pH

La α -amilasa muestra una estabilidad extremadamente alta en el intervalo de pH entre 6 y 8, reduciéndose con el tiempo la actividad enzimática fuera del mismo (Carlsen, 1994), por ello se decidió estudiar la influencia del pH en el proceso de adsorción entre dichos valores. El punto isoeléctrico de la α -amilasa de *A. oryzae* es 4.2 (Fischer y de Montmollin, 1951) por lo que la proteína presentará, en dicho intervalo, una carga neta negativa, lo que justifica la elección de una resina intercambiadora de aniones para el estudio de la adsorción en sistemas de intercambio iónico.

Para los experimentos de cromatografía de interacción hidrofóbica, a los valores de pH 6, 7 y 8, se utilizó tampón fosfato 0.05M. El tampón utilizado en los experimentos con la columna de intercambio aniónico, para pH 7 y 8, fue Tris/HCl 0.05M y fosfato 0.05M para pH 6.

Fuerza iónica

La fuerza iónica es un parámetro que tiene gran influencia en el mecanismo de adsorción tanto por interacción hidrofóbica como por intercambio iónico (ver apartados 1.2.2.1 y 1.2.2.2). La adsorción en sistemas hidrofóbicos se ve favorecida por un aumento en la fuerza iónica de la fase móvil y el efecto contrario ocurre en la adsorción por intercambio iónico. Por esta razón, existe un intervalo de fuerza iónica en el que se produce una variación gradual en la intensidad de la adsorción. Fuera del mismo, la retención del adsorbato, o bien no es significativa, o bien es total y queda retenida en el interior de la columna.

Se han realizado experimentos en un amplio intervalo de fuerza iónica para ambos sistemas estudiados y se ha comprobado que los valores entre los cuales puede estudiarse adecuadamente la respuesta cromatográfica ante un impulso de adsorbato son 0.5 - 1.1 para IEC y 0.1 - 0.4 para HIC.

Concentración de adsorbato

Se realizaron experimentos con impulsos de α -amilasa a diferentes concentraciones (0.5, 1.0 y 2.0 g/l) para determinar el valor más adecuado de esta variable. No se encontraron diferencias entre los tiempos de retención correspondientes a cada una de las concentraciones ensayadas y a diferentes caudales (figura 5.2).

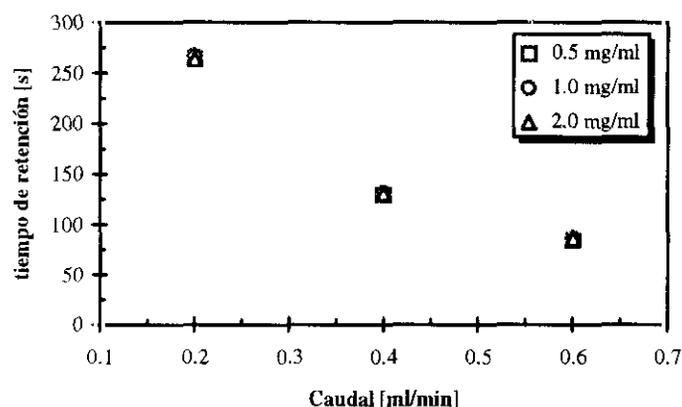


Figura 5.2: Representación del tiempo de retención en función del caudal de eluyente para diferentes impulsos de concentración variable de α -amilasa. Columna de HIC (Duolite XAD-761); pH 7.0, 20 °C y volumen de inyección 5 μ l.

Las respuestas cromatográficas obtenidas para la concentración de 2.0 g/l presentaban mayor asimetría que las otras dos y las correspondientes a 0.5 g/l eran demasiado débiles por lo que, en condiciones de alta adsorción, la exactitud de la medida podría verse comprometida.

Por ello, la concentración de α -amilasa seleccionada para la realización de los experimentos de impulso en columnas de HPLC fue de 1.0 g/l.

Tamaño de partícula

Cuanto menor sea el tamaño de las partículas de adsorbente que rellenan una columna cromatográfica, mayor será la resolución de la misma y mayor simetría presentarán los picos obtenidos. Por otro lado, el menor tamaño de partícula tiene asociado una mayor pérdida de carga a lo largo de la columna. Tras diferentes experimentos con columnas empacadas con adsorbentes de tamaño medio diferente, se determinó que el tamaño de partícula con el que se obtenía un mejor compromiso entre los efectos mencionados era el de la fracción tamizada correspondiente al corte 0.25 - 0.38 μ m.

Caudal

El intervalo de caudal de elución de la fase móvil seleccionado para llevar a cabo la experimentación ha sido 0,40 - 1,00 ml/min. Para valores inferiores, la anchura del pico obtenido es considerable y para valores superiores, la pérdida de presión es elevada para el tamaño de partícula seleccionado.

Temperatura

El valor máximo de temperatura a la que se pueden realizar los experimentos viene dado por la estabilidad térmica de la propia enzima. De los datos obtenidos de la bibliografía y debido a que los procesos de adsorción a nivel industrial pueden durar muchas horas, se ha considerado 30 °C como temperatura máxima de experimentación.

Volumen de inyección

El volumen óptimo del impulso cromatográfico inyectado en la fase móvil a la entrada de la columna está relacionado con la concentración de adsorbato en la muestra. Es necesario evitar que la cantidad de α -amilasa introducida al sistema llegue a saturar la cabeza de la columna y se esté en condiciones de no equilibrio. Por otra parte, un volumen elevado de inyección, aun estando en condiciones de equilibrio, da lugar a respuestas cromatográficas asimétricas que dificultan el tratamiento de los resultados obtenidos. En base a la experimentación previa, se ha establecido un volumen de inyección de 5 μ l de disolución de α -amilasa para el estudio de la adsorción mediante cromatografía de impulso en HPLC.

Reversibilidad

Con objeto de comprobar que, tras la inyección de una disolución de α -amilasa, no queda proteína retenida irreversiblemente en la columna, se realizaron una serie de experimentos. Como la respuesta del detector ultravioleta a 280 nm es lineal para el intervalo de concentración de α -amilasa utilizado, podemos suponer que el área de los picos obtenidos es proporcional a la cantidad de proteína que se detecta. Para comprobar el grado de reversibilidad se llevaron a cabo dos tipos de experimentos. Por un lado se determinó el área de los picos obtenidos a la salida de la columna tras la inyección de pulsos de α -amilasa de volumen y concentración fija para diferentes caudales. Por otro lado, se inyectaron pulsos de α -amilasa en iguales condiciones de concentración, volumen y caudal, pero se substituyó la columna cromatográfica por un tubo capilar. De esta manera, se determina el área que le correspondería al pulso de entrada en las condiciones indicadas ya que toda la α -amilasa introducida al sistema es detectada. La diferencia entre el área del pulso de entrada y el del pico

cromatográfico registrado en iguales condiciones nos indicará la cantidad de α -amilasa que ha quedado retenida en la columna.

Se comprobó que en los intervalos experimentales estudiados, la adsorción es completamente reversible, no existiendo diferencias significativas entre ambas áreas salvo a caudales bajos (≤ 0.2 ml/min) debido, fundamentalmente a que a este caudal, el pico cromatográfico es muy ancho y achatado, existiendo mayor error en la integración del mismo. Esto justifica también la elección de caudales superiores para la experimentación según se ha comentado en el apartado correspondiente. En la figura 5.3 se muestra un ejemplo de test de reversibilidad.

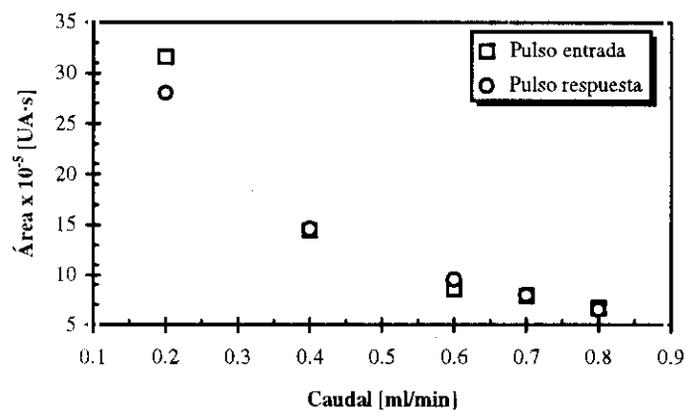


Figura 5.3: Test de reversibilidad de la adsorción en experimentos de impulso en HPLC. Columna HIC (Duolite XAD-761); pH 7.0, 20 °C, concentración 1.0 mg/ml y volumen de inyección 5 μ l.

5.2.6.- Condiciones de operación

De acuerdo con los experimentos previos realizados y con los objetivos del presente trabajo de investigación, en la tabla 5.1 se resumen los valores e intervalos utilizados en los experimentos realizados para el análisis de momentos de las respuestas obtenidas ante los impulsos de α -amilasa en cromatografía de interacción hidrofóbica y de intercambio iónico.

Tabla 5.1: Condiciones de operación para los experimentos de HPLC.

| | HIC (Duolite XAD-761) | IEC (Duolite A-568) |
|-------------------------------|------------------------------|---|
| Fase móvil | Fosfato 0.05M (pH 6, 7, 8) | Tris/HCl 0.05M (pH 7, 8) Fosfato (pH 6) |
| pH | 6.0, 7.0, 8.0 | 6.0, 7.0, 8.0 |
| Fuerza iónica | 0.10, 0.20, 0.30, 0.35, 0.40 | 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90, 1.00, 1.10 |
| Concentración (mg/ml) | 1.0 | 1.0 |
| Volumen inyección (µl) | 5.0 | 5.0 |
| Tamaño partícula (µm) | 25 - 38 | 25 - 38 |
| Caudal (ml/min) | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| Temperatura (°C) | 15, 17, 20, 23, 25 | 15, 17, 20, 23, 25 |

5.3.- ADSORCIÓN EN TANQUE AGITADO DISCONTINUO

Este tipo de instalaciones se caracteriza por su versatilidad, facilidad de uso y gran simplicidad de las mismas. Permiten de manera sencilla la variación de las condiciones de operación de cada uno de los experimentos para poder establecer la influencia que tienen sobre el comportamiento del sistema en los procesos de adsorción.

Uno de los parámetros cinéticos que caracterizan la adsorción de un soluto sobre las partículas de un adsorbente es el coeficiente de transferencia de materia externa. Una vez que se ha llegado a establecer un régimen de mezcla perfecta, puede considerarse que la resistencia a la transferencia de materia que ejerce la capa límite que rodea las partículas del adsorbente ha sido eliminada. Esta situación se consigue mediante la selección adecuada de la velocidad de agitación, del tamaño de las partículas sólidas y del diseño del equipo experimental. De esta forma, el seguimiento de la disminución de la concentración de α -amilasa en la fase líquida en un experimento de adsorción en tanque agitado, proporcionará las curvas cinéticas de las que se obtendrá el valor del coeficiente de difusión en los poros tras el correspondiente ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto para este tipo de sistemas.

Por otro lado, la realización de los experimentos de adsorción en un sistema de tanque agitado discontinuo proporcionará la información correspondiente a las isothermas de adsorción mediante la obtención de datos de equilibrio.

5.3.1.- Materiales

Como adsorbato se ha utilizado α -amilasa de *A. oryzae* cristalizada y liofilizada. Los adsorbentes, Duolite XAD-761 y Duolite A-568 para adsorción por interacción hidrofóbica e intercambio iónico respectivamente, fueron sometidos al pretratamiento descrito en el apartado 5.1.

Las disoluciones de adsorción utilizadas para HIC e IEC han sido: tampón fosfato 0.05M de pH 6.0 y Tris/HCl 0.05 de pH 7.0, con una fuerza iónica de 0.35 y 0.60 respectivamente (ver apartado 5.2.1.). Todas las disoluciones fueron filtradas a través de membrana de 0.80 μ m Millipore GSWP04700 (Millipore Corp. Bedford, MA, EE.UU.).

5.3.2.- Equipo experimental

Los experimentos cinéticos y de equilibrio de adsorción en tanque agitado discontinuo se han llevado a cabo en la instalación cuyo esquema se muestra en la figura 1, pudiéndose diferenciar las siguientes partes:

Sistema de adsorción

La adsorción se realiza en un matraz esférico de vidrio Pyrex de 50 mm de diámetro con tres bocas cuyas funciones son las siguientes:

- Introducción del agitador.
- Introducción del tubo de toma de muestras con filtro incorporado.
- Introducción del tubo de recirculación.

Sistema termostático

La temperatura del proceso se controla mediante un baño termostático de enfriamiento Heto DT1 CB-8-30e (Heto-Holten, Allerød, Dinamarca). El fluido utilizado fue agua o disolución de etilén glicol para los experimentos realizados a 4 °C, siendo la precisión nominal del controlador de ± 0.01 °C. El tanque con la disolución de adsorción y el adsorbente adecuado se sumergía parcialmente en el líquido del baño (ver figura 5.4).

Sistema de agitación

La agitación se lleva a cabo mediante un agitador de hélice de tres palas realizado en vidrio. Este se encuentra impulsado por un motor con selector y regulador de velocidad IKA RW-20 (Janke & Kunkel, Staufen, Alemania).

Sistema de recirculación

Una bomba peristáltica Hewlett-Packard 89052B (Hewlett-Packard, Avondale, PE, EE.UU.) hace circular continuamente la disolución de adsorción a través de la célula de flujo del espectrofotómetro UV/Vis y de medida de pH. En el extremo del tubo de toma de muestra, sumergido en la disolución de adsorción, se encuentra un filtro de teflón de 0.8 μm para evitar que las partículas de adsorbente salgan del medio. El tiempo muerto del sistema es de 15 segundos y el volumen muerto de 2.3 ml.

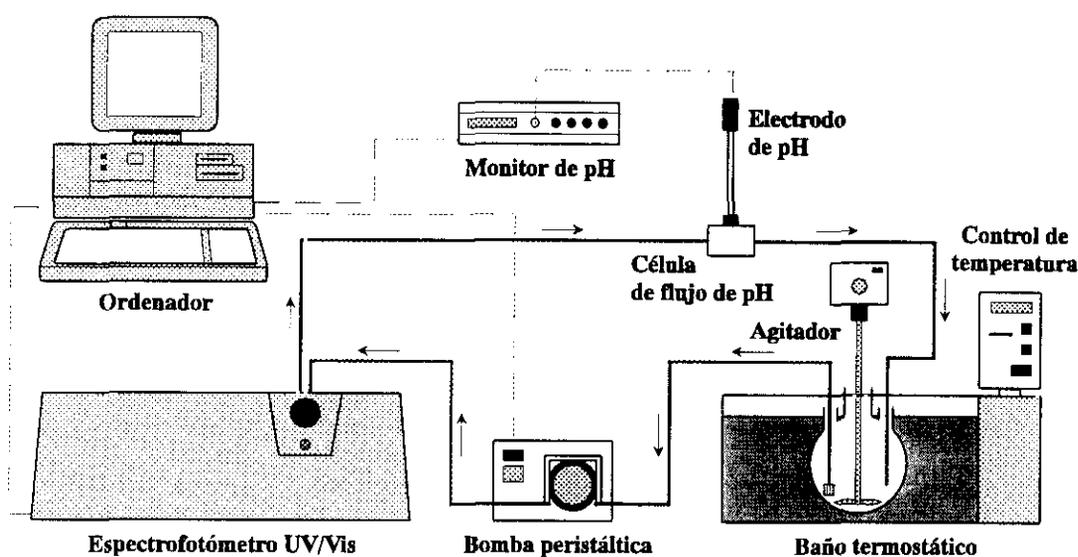


Figura 5.4: Esquema de la instalación para los experimentos de adsorción en tanque agitado discontinuo.

Espectrofotómetro ultravioleta

El espectrofotómetro UV/Vis de matriz de diodos Hewlett-Packard 8452A (Hewlett-Packard, Avondale, PE, EE.UU.) tiene un intervalo de medida entre 190 y 820 nm. Está dotado con una célula de flujo de cuarzo de 50 μl . La concentración de α -amilasa en el tanque se determina mediante absorbancia a 280 nm y se monitoriza y almacena en el ordenador (Hewlett-Packard Vectra 486/33VL) mediante los programas de control G1100A (General Scanning) y G1101A (Quantification) del propio fabricante.

Medidor de pH

El seguimiento de la variación de pH se realiza mediante un electrodo situado en una célula de flujo de 30 μl que se encuentra conectado a un monitor digital, pH Monitor (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). De esta manera se determinan las posibles variaciones de pH que puedan producirse

a lo largo del experimento en la disolución de adsorción.

5.3.3.- Desarrollo de un experimento

Los experimentos cinéticos y aquellos realizados para determinar las isothermas del equilibrio de adsorción se llevaron a cabo en el mismo equipo experimental pero el procedimiento operativo difiere ligeramente en cuanto a la toma de muestras y medida de la concentración de α -amilasa.

El procedimiento operativo para la realización de los experimentos cinéticos de adsorción en tanque agitado discontinuo comienza con el acondicionamiento del adsorbente. Una vez pesada en seco la cantidad seleccionada de este, se le suspende en la disolución tampón correspondiente al experimento de adsorción (25 ml aproximadamente) y se mantiene en esas condiciones durante 24 horas. La disolución de adsorción con la concentración adecuada de α -amilasa se filtra y, tras medir el volumen correspondiente al experimento, se echa en el matraz de vidrio. Este se introduce en el baño termostático a la temperatura de experimentación y se conecta la agitación, la recirculación y el espectrofotómetro. Se mantiene así durante una hora, tiempo necesario para considerar que el sistema se encuentra termostaticado y estabilizado. A continuación, la suspensión de adsorbente se filtra a vacío, recogiendo la totalidad del mismo.

El experimento comienza cuando se añade el adsorbente al matraz, en ese momento comienza la medida continua de la absorbancia a 280 nm mediante el espectrofotómetro. El final del experimento se determina cuando la medida de la absorbancia a 280 nm da un valor constante.

El retraso del sistema viene determinado por el tiempo que tarda la disolución de adsorción en llegar hasta la célula de medida desde el interior del matraz. Este se ha determinado, obteniéndose un valor de 10 segundos.

Los experimentos realizados en tanque agitado discontinuo para la determinación de las isothermas del equilibrio de adsorción se ha llevado a cabo de manera análoga, a diferencia que la medida de la concentración de α -amilasa mediante absorbancia a 280 nm se realizó solamente para el valor correspondiente al equilibrio. Para ello se tomaron tres muestras del sobrenadante (1.0 ml) y se midió su concentración sin necesidad de hacer circular la disolución por la célula de flujo con la bomba peristáltica. Para concentraciones mayores de 1.0 mg/ml, debido a que la ley de Beer no se cumple satisfactoriamente, se diluyó previamente la muestra obtenida.

5.3.4.- Experimentos previos

Para determinar los valores e intervalos de operación de las variables del sistema, se han llevado a cabo una serie de experimentos previos que proporcionarán la información necesaria para tal

fin.

pH y fuerza iónica

A partir de los resultados obtenidos en los experimentos de adsorción en HPLC, se han seleccionado las condiciones de pH y fuerza iónica a las que se van a desarrollar el estudio de la adsorción en tanque agitado discontinuo y en lecho fijo. Estos valores son:

- Adsorción por interacción hidrofóbica en Duolite XAD-761: pH 6.0, fuerza iónica 0.35.
- Adsorción por intercambio iónico en Duolite A-568: pH 7.0, fuerza iónica 0.60.

En estas condiciones el factor de capacidad es elevado pero la adsorción es aun reversible. Si trabajásemos en condiciones extremas que favoreciesen la adsorción, no sólo se unirían fuertemente las moléculas de α -amilasa sino también otros componentes de la mezcla que se desea separar ya que en esa situación la adsorción no es muy específica. En el caso de la cromatografía, operar en condiciones de adsorción reversibles supone la existencia de una velocidad de migración determinada para la α -amilasa y, si se optiman los resultados, diferente de las del resto de sustancias que la acompañan.

Velocidad de agitación

Es necesario determinar la velocidad de agitación mínima, a partir de la cual el control de la transferencia de materia externa puede considerarse que no es significativo. Para ello, se realizaron una serie de experimentos en iguales condiciones de operación pero con diferentes velocidades de agitación.

Para velocidades mayores de 600 rpm, no se aprecian diferencias en las curvas cinéticas de adsorción. A partir de agitaciones superiores a 1200 rpm la aparición de espumas produce inestabilidades en la medida de la absorbancia a 280 nm, así como una nueva resistencia a la transferencia de materia. Por ello se ha elegido una velocidad de agitación de 800 rpm.

Concentración inicial

Se ha elegido un intervalo de concentración inicial de α -amilasa en la disolución de adsorción de 0.10 a 1.00 g/l. A concentraciones mayores, la absorbancia a 280 nm no cumple la ley de Beer, llegando a saturarse el detector ultravioleta a partir de concentraciones de 2.5 mg/ml.

Tamaño de partícula

A la velocidad de agitación elegida, se han realizado experimentos con diferentes tamaños de partícula en el intervalo 0.20-0.80 mm. No se han detectado influencias significativas debidas a un control de la transferencia de materia externa por lo que se ha elegido un tamaño de partícula correspondiente a la fracción intermedia tamizada entre 0.32-0.50 mm.

Volumen de disolución

El volumen de la disolución de α -amilasa no influye en el comportamiento cinético ni de equilibrio en el proceso de adsorción. Para volúmenes excesivamente pequeños (menores de diez veces el volumen muerto del sistema de recirculación), aparecen problemas técnicos y de retraso de las curvas cinéticas de adsorción. Si el volumen es demasiado grande, el problema que aparece es el de la correcta mezcla y homogeneización de la suspensión, haciendo necesaria la utilización de sistemas de agitación más complejos con la inclusión de tabiques deflectores en el tanque de adsorción. Tras diversos experimentos, se seleccionó un volumen de disolución de 50 ml, suficiente para evitar los problemas mencionados, permitiendo así una buena homogeneización de la suspensión mediante agitación simple.

Masa de adsorbente

La selección de la masa de adsorbente utilizado en cada experimento está relacionada con el volumen de disolución y con la capacidad de adsorción de la resina en las condiciones experimentales, que viene dada por la isoterma de equilibrio. Si la concentración de adsorbente en la suspensión es elevada, aparecerán problemas de transporte de materia, y si es demasiado baja, la disminución de la concentración de enzima en la disolución puede llegar a ser tan pequeña que su seguimiento esté sujeto a un error experimental intolerable.

A partir de estas consideraciones y de los experimentos previos realizados, se ha decidido llevar a cabo los experimentos cinéticos con una cantidad de 0.50 g de adsorbente. Para los experimentos de equilibrio en los que la concentración de α -amilasa fue superior a 1.0 mg/ml se utilizaron cantidades entre 0.75 y 1.75 g, en función de la concentración inicial de enzima.

5.3.5.- Condiciones de operación

En la siguiente tabla se resumen las condiciones experimentales e intervalos de las variables de operación estudiadas:

Tabla 5.2: Condiciones de operación para los experimentos cinéticos en tanque agitado discontinuo.

| | HIC (Duolite XAD-761) | IEC (Duolite A-568) |
|------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| Tampón | Fosfato 0.05M | Tris/HCl 0.05M |
| pH | 6.0 | 7.0 |
| Fuerza iónica | 0.35 | 0.60 |
| Concentración (mg/ml) | 0.1 - 0.5 | 0.1 - 1.0 |
| Masa adsorbente (g) | 0.50 | 0.50 |
| Agitación (rpm) | 800 | 800 |
| Volumen (ml) | 50 | 50 |
| Tamaño partícula (µm) | 0.32 - 0.50 | 0.32 - 0.50 |
| Temperatura (°C) | 4, 20, 30 | 20, 25, 30 |

5.4.- ADSORCIÓN LECHO FIJO

La disposición más frecuentemente utilizada a nivel industrial en los procesos de purificación por adsorción es aquella que utiliza uno o varios lechos fijos. Respecto a la adsorción en tanque agitado, la llevada a cabo en lecho fijo es más fácilmente escalable y el control de las variables del sistema es más sencillo. Sin embargo en el flujo de un fluido a través de un lecho fijo, aparece el efecto de mezcla a lo largo del eje longitudinal de la columna, denominado dispersión axial, que produce una disminución de la eficacia de los procesos de adsorción. La experimentación en lecho fijo deberá minimizar este efecto para mejorar el rendimiento obtenido en el sistema.

Con el fin de disminuir la resistencia a la transferencia de materia externa es necesario seleccionar partículas de adsorbente suficientemente pequeñas. Por otro lado, sería deseable el uso de caudales elevados ya que el caudal de operación está directamente relacionado con la producción del proceso. Sin embargo, el aumento del caudal y la disminución del tamaño de partícula conducen ambos a un incremento de la pérdida de carga a lo largo de la columna por lo que será necesario alcanzar una solución de compromiso entre ambos factores.

Estas variables (caudal y tamaño de partícula), junto con otras características del proceso (concentración, temperatura, tamaño de lecho, etc.) tendrán que ser optimadas para conseguir los niveles de pureza del producto requeridos por las especificaciones establecidas para su uso, así como los valores de producción y rendimiento especificados en el diseño del proceso.

5.4.1.- Materiales

Los reactivos utilizados para los experimentos de adsorción en lecho fijo han sido los mismos que los utilizados en el estudio de la adsorción en tanque agitado discontinuo (ver apartado 5.3.1.).

El adsorbato ha sido α -amilasa de *A. oryzae* cristalizada y liofilizada y los adsorbentes Duolite XAD-761 y Duolite A-568 para HIC e IEC respectivamente.

Las disoluciones de adsorción, elución y lavado fueron filtradas a través de membrana de 0.80 μm Millipore GSWP04700 (Millipore Corp. Bedford, MA, EE.UU.) y desgasificadas a vacío antes de ser utilizadas en cada uno de los experimentos.

5.4.2.- Equipo experimental

El estudio experimental del proceso de adsorción de α -amilasa por interacción hidrofóbica e intercambio iónico en lecho fijo se ha llevado a cabo en un equipo FPLC[®] System (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). En la figura 5.5 se muestra un esquema de la instalación experimental utilizada en la que se indican los diferentes módulos que lo componen.

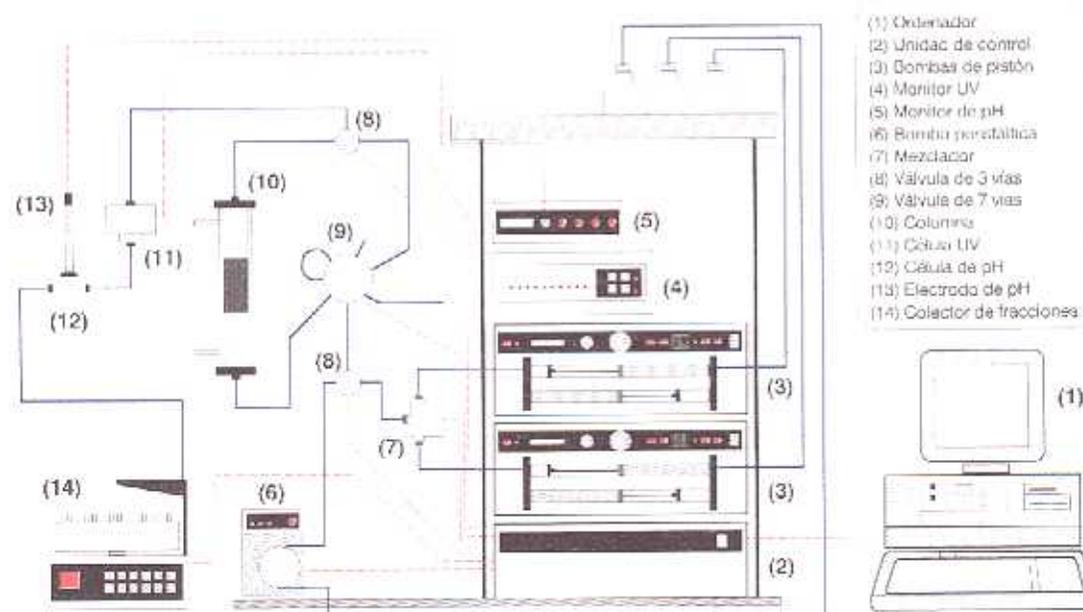


Figura 5.5: Esquema del equipo de adsorción en lecho fijo, FPLC System.

Módulo de elución

Consta de dos bombas de pistón, modelo P-500 de 10 ml de capacidad con una precisión en el caudal del 1%. En caso que fuese necesario, puede utilizarse una bomba peristáltica, modelo P-1, para

la inclusión de un eluyente adicional. Sirven para impulsar la disolución de adsorción y las de elución necesarias para cada uno de los experimentos planificados.

Columna

Durante la experimentación correspondiente a este estudio se han utilizado dos tipos de columna con dimensiones diferentes. Ambas columnas, marca Amicon, modelo Moduline (Amicon Corp. Danvers, MA, EE.UU.), están fabricadas en vidrio. Se encuentran provistas de una camisa externa que permite la termostatación de la misma mediante la circulación de un líquido refrigerante. Constan de cierres móviles en los extremos, haciendo posible la variación de la altura del lecho, ajustándola a la cantidad de adsorbente introducido en la columna.

Las dimensiones de los dos modelos de columna de adsorción son las siguientes:

Tabla 5.3: Dimensiones de las columnas.

| Diámetro interno (mm) | Altura máxima (mm) |
|----------------------------------|-------------------------------|
| 10 | 150 |
| 16 | 250 |

Módulo de análisis

Como se ha determinado previamente, el seguimiento de la concentración de α -amilasa se lleva a cabo mediante medida de la absorbancia a 280 nm. El sistema experimental consta de una célula de flujo de 2 ml con una lámpara de mercurio conectada al monitor UV-M-II que mide y registra los datos de absorbancia a la longitud de onda mencionada.

Módulo de pH

Otro de los detectores del sistema consiste en un medidor de pH en continuo que consta de una célula de flujo y un electrodo conectado a la unidad de medida, pH Monitor.

Colector de fracciones

Con objeto de recuperar determinadas fracciones del efluente, o de realizar otro tipo de análisis paralelos al de absorbancia en ultravioleta para el seguimiento del proceso de adsorción (medida de la actividad, etc.), se dispone de un colector de fracciones programable, Frac-200, a la

salida del sistema.

Módulo de control

Está compuesto por un controlador LCC-500 CI y un ordenador personal IBM 330 P100 (IBM Corp. Armonk, NY, EE.UU.) con el programa de control FPLC Director (Pharmacia Biotech. Uppsala, Suecia). Este módulo controla, programa y registra todas las actividades de cada uno de los diferentes dispositivos de que consta el equipo experimental. Además, mediante el programa de control, se registran los valores, en continuo, de caudal, pH absorbancia a 280 nm, etc. que permitirán posteriormente su tratamiento numérico en la etapa de modelado matemático de los experimentos realizados.

El equipo dispone también de una serie de válvulas motorizadas (PSV-50, MV-7) que permiten dirigir el flujo de cada una de las bombas a través de la columna en la etapa de adsorción y desorción, así como realizar un cortocircuito a la columna.

5.4.3.- Desarrollo de un experimento

Se deberán tener preparadas las disoluciones de elución, de adsorción y de lavado filtradas y desgasificadas. La disolución de elución es la misma que el tampón en que está disuelta la α -amilasa en la disolución de adsorción. La de lavado es una disolución que facilita la desorción de todas las sustancias que hayan podido quedar retenidas en cada uno de los sistemas estudiado: para HIC deberá ser una disolución de muy baja fuerza iónica y para IEC de mayor fuerza iónica que la disolución de adsorción correspondiente (ver tabla 5.4).

Una vez rellena la columna cromatográfica, debe acondicionarse para estabilizarse y adquirir los valores de pH, fuerza iónica y temperatura correspondientes al experimento que se va a realizar. Para ello, se hace pasar un volumen determinado de disolución de elución a través de la columna y se conecta el sistema de termostatación a la camisa que rodea a la misma. Para conocer la señal de absorbancia a 280 nm correspondiente a la disolución de elución y de adsorción, se realiza un cortocircuito a la columna con cada una de las disoluciones mencionadas.

El experimento comienza cuando se cambia la fase móvil que se alimenta al sistema, pasando de la disolución de elución a la de adsorción con la concentración de α -amilasa y el caudal correspondiente al experimento. La evolución del pH y de la concentración de adsorbato a la salida de la columna se determina mediante el monitor de pH y la absorbancia en ultravioleta a 280 nm respectivamente. Los datos se registran y almacenan en el ordenador para su posterior tratamiento matemático. El experimento de adsorción termina cuando la señal de absorbancia en ultravioleta del

efluente alcanza el valor obtenido para la disolución de adsorción (saturación completa de la columna) o una fracción determinada del mismo (saturación parcial).

Tabla 5.4: Composición de las disoluciones de elución y lavado con las cantidades utilizadas en las etapas de acondicionamiento y lavado respectivamente.

| | HIC | IEC |
|------------------------------|--|---|
| Disolución de elución | Tampón fosfato 0.05M pH 6.0 fuerza iónica 0.60 | Tampón Tris/HCl 0.05M pH 7.0 fuerza iónica 0.35 |
| Acondicionamiento | 40 volúmenes de lecho (90 min) | 50 volúmenes de lecho (120 min) |
| Disolución de lavado | Agua destilada | Tampón Tris/HCl 0.05M pH 7.0 Fuerza iónica 2.50 |
| Lavado | 30 volúmenes de lecho (60 min) | 20 volúmenes de lecho (60 min) |

A continuación se procede a llevar a cabo el experimento de desorción mediante un procedimiento experimental análogo pero, en este caso, la disolución que se alimenta a la columna saturada de adsorbato es la de elución. La desorción acaba cuando la absorbancia a 280 nm del efluente de la columna es igual a la que le corresponde a la disolución de elución.

Posteriormente se realiza el lavado de la columna para eliminar cualquier traza de adsorbatos que hubiesen podido quedar retenidos al adsorbente. Para ello se hace pasar un volumen adecuado (ver tabla 5.4) de disolución de lavado, dejando la columna preparada para volver a realizar el acondicionamiento para el siguiente experimento.

5.4.4.- Experimentos previos

Los experimentos de adsorción en lecho fijo se han llevado a cabo en las mismas condiciones de pH y fuerza iónica que los desarrollados en tanque agitado discontinuo para cada uno de los mecanismos de adsorción estudiados, intercambio iónico e interacción hidrofóbica.

Caudal

Con objeto de estudiar la influencia de la velocidad de la fase móvil en el comportamiento cinético del proceso de adsorción, se ha seleccionado un amplio intervalo de valores de caudal. Para

los experimentos realizados en la columna de 10 mm de diámetro, los valores han sido 0.10 - 1.00 ml/min y para la columna mayor, de 16 mm de diámetro, hasta 5.00 ml/min.

Concentración inicial

Por motivos de comparación de resultados, los valores de concentración de adsorción en lecho fijo, se han elegido en un intervalo similar al correspondiente a los experimentos de adsorción en tanque agitado, 0.10 - 1.00 mg/ml. Para los experimentos, realizados con fines de escalado del proceso, llevados a cabo en la columna de mayor tamaño, la concentración de α -amilasa en la fase móvil fue de 2.50 mg/ml, de similar orden que la que se puede encontrar en el caldo de fermentación del cual se obtiene a nivel industrial.

Tamaño de partícula

Se ha usado la misma fracción de tamaños de partícula que en los experimentos en tanque agitado, 0.32 - 0.50 mm. A diferencia de este sistema, y debido a una menor velocidad superficial del fluido, en el proceso de adsorción en lecho fijo no se ha eliminado el control a la transferencia de materia externa que ejerce la capa límite que rodea a las partículas de adsorbente. Por esta razón, se pretende estudiar el efecto del tamaño de partícula en el coeficiente de transferencia de materia externo, realizando experimentos con otras dos fracciones diferentes, 0.20 - 0.32 y 0.50 - 0.80 mm.

Dimensiones del lecho

Para un estudio de cambio de escala, es necesario realizar experimentos en lechos de diferentes dimensiones. Esta variable está directamente relacionada con la masa de adsorbente utilizada en cada uno de los experimentos. En el presente trabajo se han utilizado columnas con una carga de resina de 0.50, 1.00 y 13.00 g. Las dimensiones de cada una de ellas vienen fijadas por la densidad del adsorbente sólido así como por la distribución de tamaños de partícula que determina el empaquetamiento del lecho.

Temperatura

Los valores de temperatura ensayados han sido los mismos y por las mismas razones que los llevados a cabo en los experimentos de adsorción en tanque agitado, es decir, para la adsorción por interacción hidrofóbica sobre Duolite XAD-761, a 4, 20 y 30°C y para la adsorción por intercambio iónico en Duolite A-568, a 20, 25 y 30°C.

5.4.5.- Condiciones de operación

A continuación se resumen las condiciones experimentales utilizadas en el estudio de la adsorción de α -amilasa en lecho fijo:

Tabla 5.5: Condiciones de operación para los experimentos de adsorción en lecho fijo.

| | HIC | IEC |
|---|------------------------|------------------------|
| Fase móvil | Tampón fosfato 0.05M | Tampón Tris/HCl 0.05M |
| pH | 6.0 | 7.0 |
| Fuerza iónica | 0.35 | 0.60 |
| Concentración de entrada (mg/ml) | 0.25, 0.50, 1.00, 2.5 | 0.25, 0.50, 1.00, 2.50 |
| Caudal (ml/min) | 0.25, 0.50, 1.00, 5.00 | 0.25, 0.50, 1.00, 5.00 |
| Temperatura (°C) | 4, 20, 30 | 20, 25, 30 |
| Tamaño medio de partícula (mm) | 0.26, 0.41, 0.65 | 0.26, 0.41, 0.65 |
| Masa adsorbente (g) | 0.5, 1.0 | 0.5, 1.0, 13.0 |

5.5.- BIBLIOGRAFÍA

- Carlsen, M. (1994). " α -Amylase production by *Aspergillus oryzae*", PhD Thesis. Department of Biotechnology, Technical University of Denmark.
- Clonis, Y.D.; Jones, K. y Lowe, C.R. (1986). "Process scale high-performance liquid affinity chromatography", *J. Chromatogr.*, **363** (1), 31-36.
- Compton, B.J. y Kreilgaard, L. (1994). "Chromatographic analysis of therapeutic proteins", *Anal. Chem.*, **66** (23), 1175A-1180A.
- Felinger, A. y Guiochon, G. (1994). "Optimizing experimental conditions for minimum production cost in preparative chromatography", *AIChE J.*, **40** (4), 594-605.
- Fischer, E.H. y de Montmollin, R. (1951). "Proprietes de l' α -amilase d'*Aspergillus oryzae* cristallisee", *Helv. Chim. Acta*, **34**, 1994-1999.
- Gooding, D.L.; Schmuck, M.N.; Nowlan, M.P. y Gooding, K.M. (1986). "Optimization of preparative hydrophobic interaction chromatography purification methods", *J. Chromatogr.*, **359**, 331-337.
- Janecek, S. y Baláz, S. (1992). "Alpha-amylases and approaches leading to their enhanced stability", *FEBS Lett.*, **304** (1), 1-3.
- Kato, Y.; Kitamura, T. y Hashimoto, T. (1985). "Preparative high-performance hydrophobic

interaction chromatography of proteins on TSKgel Phenyl-5PW", *J. Chromatogr.*, **333** (1), 202-210.

- Kenney, A.C.; Thompson, P.W. y Harris, J.L. (1989). "Automatic chromatography apparatus and method, and their use in monoclonal antibody purification", *Eur. Pat. Appl.*, EP 317 114.
- Vallee, B.L.; Stein, E.A.; Sumerwell, W.N. y Fischer, E.H. (1959). "Metal content of alpha-amylases of various origins", *J. Biol. Chem.*, **234** (11), 2901-2905.
- Velayudhan, A. y Horváth, C. (1988). "Preparative chromatography of proteins. Analysis of the multivalent ion-exchange formalism", *J. Chromatogr.*, **443**, 13-29.

6. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN

6.1.- CROMATOGRAFÍA DE IMPULSO

En este apartado se muestran los resultados obtenidos mediante cromatografía de impulso de α -amilasa en columnas de interacción hidrofóbica (HIC) y de intercambio iónico (IEC). A partir de ellos se estudiará la influencia de las variables de operación en los dos sistemas utilizados y se determinarán los parámetros cinéticos y termodinámicos de la adsorción en base a la teoría de momentos.

6.1.1.- Planificación de experimentos

Para la consecución de los objetivos generales del presente trabajo de investigación, se realizará experimentación mediante cromatografía de impulso sobre los sistemas de IEC y HIC seleccionados. En esta etapa experimental se plantearon varios objetivos específicos que a

continuación se detallan.

En primer lugar se pretende determinar la influencia que tienen las variables de operación pH, temperatura, fuerza iónica y caudal sobre la retención de α -amilasa en Duolite A-568 y Duolite XAD-761. Para ello, se realizarán experimentos en un determinado intervalo de cada una de las variables mencionadas de acuerdo con los resultados obtenidos en la experimentación previa llevada a cabo (ver apartado 5.2.5).

En segundo lugar, se procederá a estimar los parámetros cinéticos y termodinámicos mediante el análisis de los momentos cromatográficos en cada una de las condiciones ensayadas. Para la aplicación de esta técnica, es necesario contar con experimentos realizados a diferentes caudales para cada valor de pH, fuerza iónica y temperatura (ver anexo A, apartado A.1).

Tabla 6.1: Condiciones experimentales para cromatografía de impulso de α -amilasa sobre Duolite XAD-761.

| Temperatura [°C] | pH | Fuerza Iónica | Caudal [ml/min] |
|---------------------|-----|---------------|------------------------|
| 20 | 6.0 | 0.10 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | | 0.20 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | | 0.30 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | | 0.35 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | 7.0 | 0.01 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | | 0.10 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | | 0.20 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | | 0.30 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | 8.0 | 0.40 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | | 0.20 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | | 0.30 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | 15 | | |
| 17 | 6.0 | 0.35 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| 23 | | | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| 25 | | | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |

Por último, para el estudio de la hidrofobicidad del sistema de HIC y de la carga característica del sistema de IEC se deberá disponer de experimentos llevados a cabo en iguales condiciones de pH.

temperatura y caudal para diferentes valores de la fuerza iónica de la fase móvil.

Para cada uno de los experimentos correspondientes a impulsos de α -amilasa se ha realizado otro en iguales condiciones de operación pero utilizando trazador como soluto. El trazador para la columna de intercambio iónico ha sido disolución de NaCl 2M y para la de interacción hidrofóbica, disolución de NaNO₃ 0.25M. En las tablas 6.1 y 6.2 se muestra la planificación de los experimentos mencionados.

Tabla 6.2: Condiciones experimentales para cromatografía de impulso de α -amilasa sobre Duolite A-568.

| Temperatura [°C] | pH | Fuerza Iónica | Caudal [ml/min] |
|---------------------|-----|---------------|------------------------|
| 20 | 6.0 | 0.90 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | | 1.00 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | | 1.10 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | 7.0 | 0.60 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | | 0.70 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | | 0.80 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | | 0.90 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | 8.0 | 0.50 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | | 0.60 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | | 0.70 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | | 0.80 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| | 15 | | |
| 17 | 7.0 | 0.60 | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| 23 | | | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |
| 25 | | | 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 |

6.1.2.- Influencia de las variables de operación

Los resultados de la cromatografía de impulso se han obtenido en forma de pico cromatográfico que corresponde a la respuesta detectada a la salida de la columna tras un impulso de α -amilasa a la entrada de la misma. En las figuras 6.1 y 6.2 se muestran algunos picos obtenidos en diferentes condiciones de operación para cada uno de los adsorbentes utilizados.

Los picos experimentales obtenidos presentan asimetría, siendo más acusada para condiciones de operación en las que la adsorción es más fuerte, apreciándose esta tendencia en todos los experimentos realizados con impulsos de α -amilasa. La asimetría de los picos en cromatografía puede deberse a la existencia de grandes volúmenes muertos entre el inyector y el detector del cromatógrafo (Johns, 1989), incluyendo la columna (huecos, empaquetamiento deficiente, etc.). Si esta fuese la causa, debería producirse para todos los solutos inyectados, independientemente de su naturaleza. Sin embargo el efecto mencionado no se presenta en los experimentos realizados con trazador, los cuales producen picos simétricos, asemejándose con gran precisión a una distribución gaussiana. La posible causa de la forma de los picos obtenidos para los experimentos de α -amilasa (brusca subida hasta el máximo del pico y una bajada con una tendencia lenta hasta alcanzar de nuevo la línea de base), puede ser debida a un equilibrio no lineal de adsorción tanto para la resina de HIC como para la de IEC.

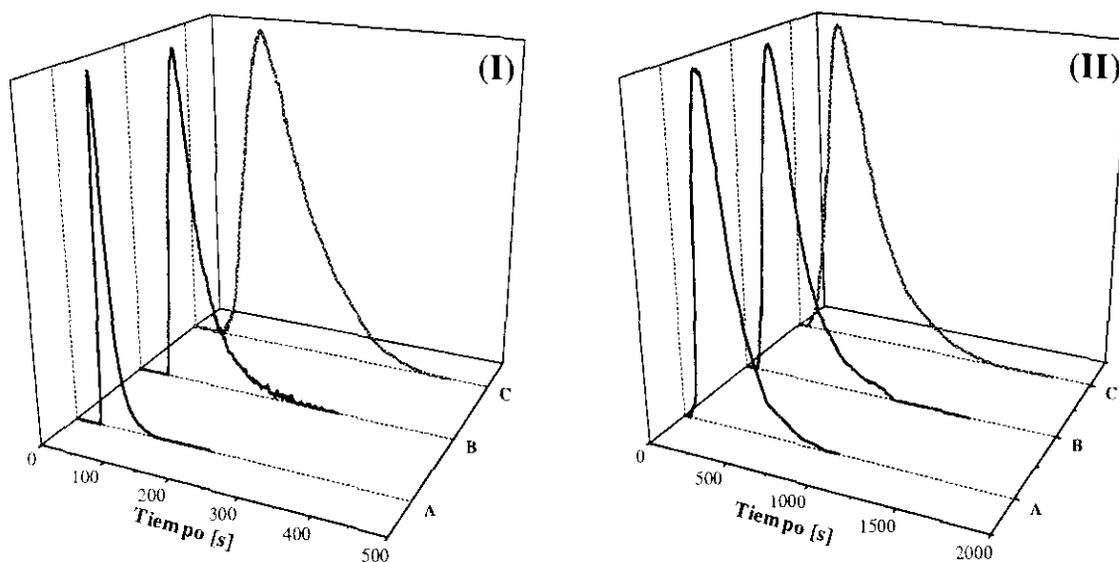


Figura 6.1: Picos cromatográficos. (I) Impulsos de α -amilasa sobre Duolite XAD-761 a 20 °C, pH 6.0 y 0.60 ml/min a tres valores de fuerza iónica: (A) 0.10, (B) 0.20 y (C) 0.35. (II) Impulsos de α -amilasa sobre Duolite A-568 a pH 6.0, fuerza iónica 0.60 y 0.60 ml/min a tres temperaturas: (A) 15 °C, (B) 20 °C y (C) 25 °C.

Cálculo de la porosidad de la columna

Una vez determinada la porosidad interna de las partículas de adsorbente mediante porosimetría de mercurio, la porosidad de la columna se ha determinado a partir de las ecuaciones 3.3 y 3.4, que relacionan el primer momento con la constante del equilibrio de adsorción. Si se realizan experimentos en impulso con un trazador que no se retenga sobre el adsorbente (es decir, $K_A \rightarrow 0$) la ecuación 3.3 quedará de la siguiente forma:

$$\mu = \frac{L}{v} \left[1 + \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \varepsilon_p \right] = \frac{L \varepsilon}{V} \left[1 + \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \varepsilon_p \right] \quad [6.1]$$

sabiendo que la relación entre la velocidad lineal, V , y la velocidad intersticial, v , viene determinada por $v = V/\varepsilon$.

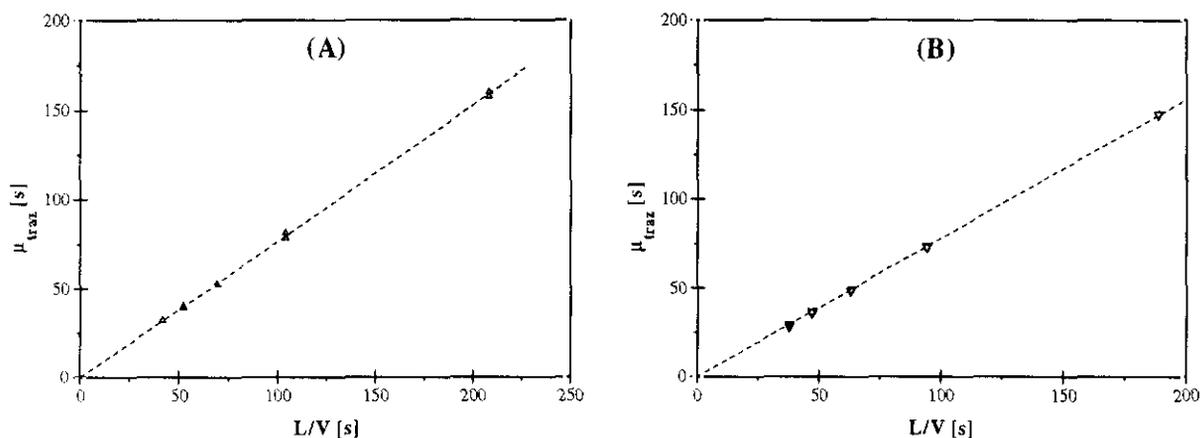


Figura 6.2: Representación gráfica del primer momento frente a L/V correspondiente al trazador en: Duolite XAD-761 (A) y Duolite A-568 (B).

De esta forma, de la pendiente de la gráfica μ frente a L/V figura 6.2 se ha calculado el valor de la porosidad externa de cada una de las dos columnas utilizadas, con lo que ambas columnas quedan caracterizadas (tabla 6.3).

Tabla 6.3: Características de las columnas de HPLC.

| | Duolite XAD-761 (HIC) | Duolite A-568 (IEC) |
|-----------------------------|--------------------------|------------------------|
| ε | 0.57 | 0.56 |
| ε_p^\dagger | 0.45 | 0.50 |
| L [m] | 0.20 | 0.20 |
| Diámetro interno [m] | $2.1 \cdot 10^{-3}$ | $2.1 \cdot 10^{-3}$ |

Hidrofobicidad de la resina Duolite XAD-761

Para caracterizar la hidrofobicidad que presenta la resina Duolite XAD-761 frente a la adsorción de α -amilasa de *A. oryzae* en base a la teoría solvofóbica (Melander *et al.*, 1984) es

[†] Determinada por porosimetría de mercurio (apartado 4.4.2).

necesario conocer la variación del factor de retención, k' , en función de la concentración salina de la fase móvil. En la figura 6.3 se representan los resultados obtenidos para dicha variación correspondiente a los tres valores de pH estudiados. De acuerdo con la ecuación 1.9, la pendiente de cada una de las rectas representa el parámetro de interacción hidrofóbica (λ) y la ordenada en el origen ($\ln k'_w$) corresponde al factor de retención extrapolado a concentración salina nula. Los resultados se muestran en la figura 6.4 y en la tabla 6.4.

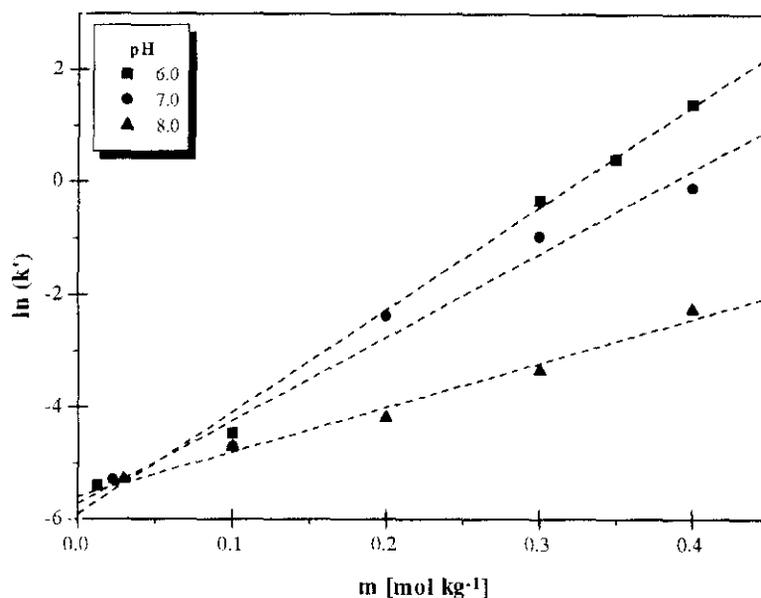


Figura 6.3: Variación del factor de retención en función de la concentración salina de la fase móvil para tres valores de pH en el sistema α -amilasa/Duolite XAD-761.

Como puede observarse, al aumentar el pH la ordenada en el origen no varía significativamente, disminuyendo la pendiente de forma considerable. En la bibliografía hay muy pocos datos experimentales relacionados con la variación de estos dos parámetros con el pH, sin embargo, para estudios realizados con lisozima se ha observado que el pH afecta a la ordenada en el origen pero no a la pendiente (Fausnaugh y Regnier, 1986). El primer parámetro, $\ln(k'_w)$, determina la retención en ausencia de sal, teniendo en cuenta la interacción neta debida a fuerzas electrostáticas y de Van der Waals (Katti *et al.*, 1987). Este parámetro tiene un valor muy bajo a los tres valores de pH utilizados, correspondiendo a una retención prácticamente nula en ausencia de sal. Esta situación en la que la retención no es significativa se extiende hasta valores de fuerza iónica de 0.1.

Por otra parte, los valores obtenidos de λ indican que la adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 depende fuertemente de la concentración salina del medio. El parámetro de interacción hidrofóbica es proporcional a la superficie hidrofóbica de contacto entre la proteína y el adsorbente (El Rassi y Horváth, 1986) y, en el sistema estudiado, aumenta al disminuir el pH en el intervalo

experimental. La disminución del área hidrofóbica accesible podría deberse a algún cambio conformacional sufrido por la α -amilasa al aumentar el pH. Para comprobar y explicar la causa de esta circunstancia, sería necesario realizar estudios adicionales relativos a la estructura y conformación de la α -amilasa en diferentes medios.

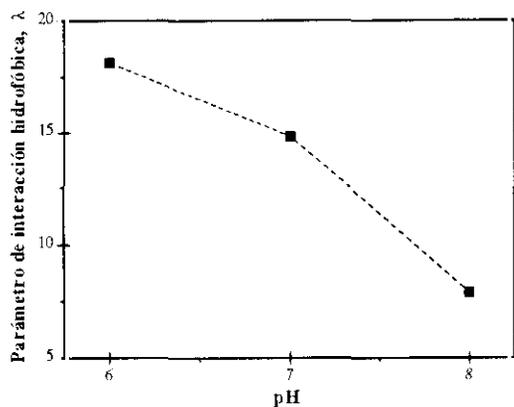


Figura 6.4: Variación del parámetro de interacción hidrofóbica con el pH para la adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761.

Tabla 6.4: Parámetros característicos de la interacción hidrofóbica calculados por regresión a partir de la figura 6.3.

| | $\ln(k'_w)$ | λ | r^2 |
|---------------|-------------|-----------|-------|
| pH 6.0 | -5.9 | 18.1 | 0.994 |
| pH 7.0 | -5.7 | 14.8 | 0.972 |
| pH 8.0 | -5.6 | 7.9 | 0.984 |

Carga característica de la α -amilasa en la resina Duolite A-568

Mediante la ecuación 1.10 se ha calculado la carga característica de la α -amilasa para cada valor de pH a partir de la pendiente de la recta obtenida al representar el logaritmo del factor de retención frente al logaritmo de la concentración molar de la sal (figura 6.5). Debido a que el contraión sujeto a intercambio es el Cl^- , se ha tomado como valor de la carga, Z_s , igual a 1.

En el intervalo experimental de pH (6 - 8), el estado de ionización de los aminoácidos varía poco, sólo el grupo imidazol de la histidina puede encontrarse ionizado o no a valores de pH correspondientes a dicho intervalo ($\text{pK} \approx 6.0 - 7.0$). Debido a que el punto isoeléctrico de la α -amilasa es 4.2, presentará carga neta negativa a valores de pH superiores a ese valor. En el intervalo experimental, a medida que el pH de la fase móvil aumenta, la carga neta también lo hará, siendo la progresiva ionización de la histidina la principal contribución a ese aumento de carga negativa. Como puede observarse, los resultados experimentales muestran (tabla 6.5 y en la figura 6.6) un ligero incremento de la carga característica de unión de la α -amilasa en la resina Duolite A-568 que iría asociado, posiblemente, al incremento de carga neta experimentado por la proteína a medida que aumenta el pH del medio.

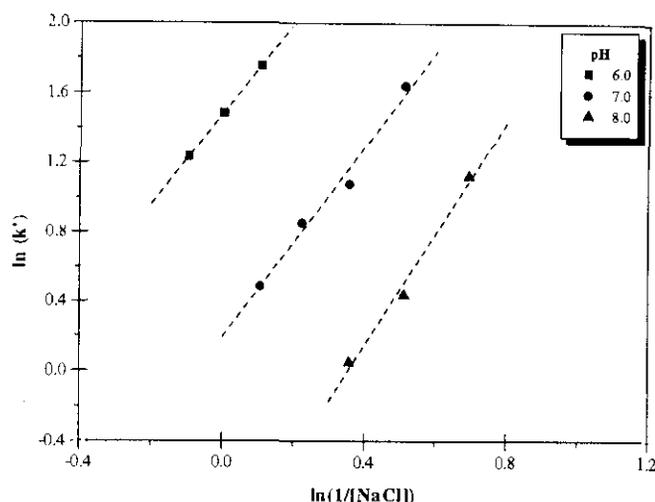


Figura 6.5: Influencia de la concentración molar de sal en el factor de retención a tres valores de pH en el sistema α -amilasa/Duolite A-568.

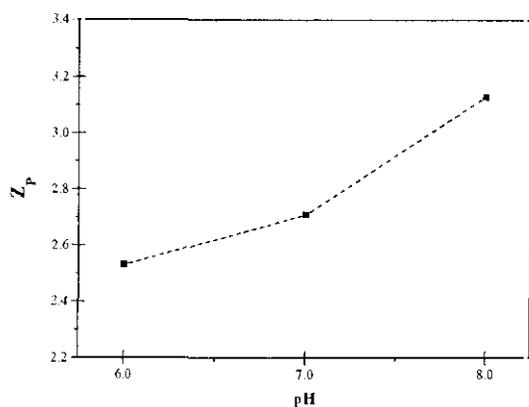


Figura 6.6: Variación de la carga característica de la α -amilasa de *A. oryzae* con el pH en la resina de intercambio iónico Duolite A-568.

Tabla 6.5: Valores de la ordenada en el origen, $\ln(A)$, y carga característica de la α -amilasa, Z_p , calculados por regresión lineal a partir de los datos de la figura 6.5 de acuerdo con la ecuación 1.10.

| | $\ln(A)$ | Z_p | r^2 |
|---------------|----------|-------|-------|
| pH 6.0 | 1.48 | 2.6 | 0.999 |
| pH 7.0 | 0.19 | 2.8 | 0.982 |
| pH 8.0 | -1.14 | 3.2 | 0.988 |

Influencia de las variables

La retención de la α -amilasa sobre cada uno de los adsorbentes ensayados, depende de una serie de factores que a continuación se describen.

Se ha representado el factor de retención en función de la fuerza iónica para diferentes valores de pH (figura 6.7). Se observa que la fuerza iónica tiene una influencia positiva sobre la retención en el caso de la adsorción sobre la resina hidrofóbica Duolite XAD-761 (figura 6.7A). El aumento de la fuerza iónica hace aumentar k' , en el intervalo utilizado, de forma muy rápida a pH 6, moderada a pH

7 y muy baja a pH 8. En todos los casos, la retención experimentada por la proteína a valores de fuerza iónica cercanos a cero es prácticamente nula. El aumento de la concentración salina en la fase móvil, produce interacciones hidrofóbicas de intensidad creciente entre la α -amilasa y el adsorbente. Este hecho está de acuerdo con la teoría de retención de adsorbatos modulada por la concentración de sal (Horváth *et al.*, 1976; Melander y Horváth, 1977; Melander *et al.*, 1989) basada en la teoría solvofóbica (Sinanoglu y Abdunur, 1965; Sinanoglu, 1982). De acuerdo con esta teoría, a medida que aumenta la concentración salina, los iones se solvatan, dejando menos moléculas de agua disponibles para hidratar las moléculas de proteína, por lo que se favorecen las interacciones entre las zonas apolares de esta con los ligandos hidrofóbicos del soporte. Esta situación no ocurre en presencia de determinadas sales que favorecen la hidratación de las proteínas como son las que contienen determinados cationes bivalentes como el Mg^{2+} , Ba^{2+} o Ca^{2+} (Arakawa y Timasheff, 1982; Szepesy y Horváth, 1988).

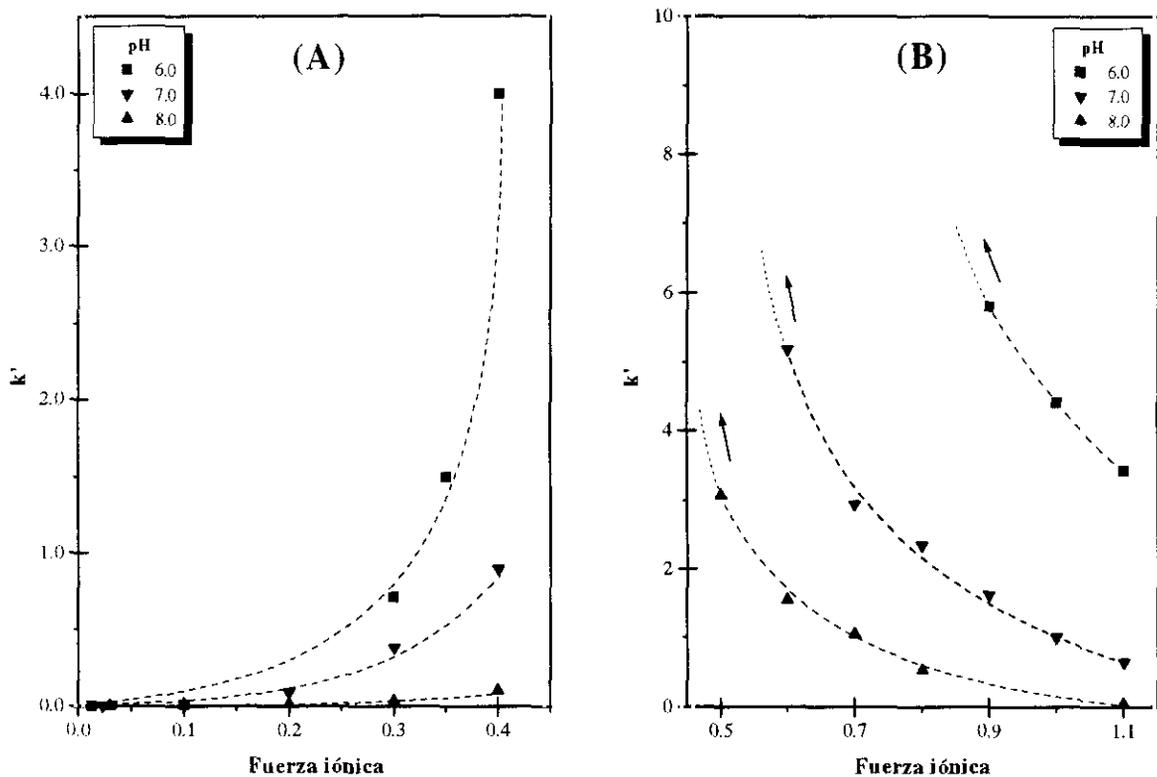


Figura 6.7: Variación del factor de retención con la fuerza iónica para diferentes valores de pH en la resina de HIC (A) y de IEC (B). Experimentos realizados a un caudal de 0.60 ml/min y 20 °C.

Se observa que la influencia de la fuerza iónica sobre el intercambio iónico de α -amilasa en Duolite A-568 es opuesto al comentado para la interacción hidrofóbica (figura 6.7B). Los iones, aniones Cl^- en el presente caso, actuarían como competidores de la proteína, cargada negativamente, por los sitios de unión de la fase estacionaria. De acuerdo con el intercambio estequiométrico

planteado por la ecuación 1.11, la constante del equilibrio del equilibrio vendrá dada por:

$$K = \frac{\left(\frac{[P^-]}{[P]}\right)^{Z_s}}{\left(\frac{[S]}{[S]}\right)^{Z_p}} \quad [6.2]$$

por lo que un aumento de la concentración de sal en la disolución, S, conducirá a una cantidad menor de proteína adsorbida a los ligandos iónicos de la matriz, lo que explicaría los resultados obtenidos para la influencia de la fuerza iónica en el sistema de IEC.

El efecto del pH sobre la adsorción de α -amilasa en HIC ha sido parcialmente comentado para valores bajos de fuerza iónica (figura 6.7A). El incremento del pH produce una diferencia creciente entre éste y el punto isoeléctrico de la α -amilasa ($pI = 4.2$), aumentando la magnitud de su carga neta negativa. En estas condiciones, las interacciones electrostáticas entre la enzima y la fase móvil serán mayores que las interacciones hidrofóbicas entre la α -amilasa y el adsorbente, disminuyendo, por tanto, la capacidad de retención de la fase estacionaria.

Como se ha determinado anteriormente para el sistema de intercambio iónico, la carga característica de unión de la α -amilasa aumenta al hacerlo el pH. Este efecto no se corresponde con el aumento del factor de retención al disminuir el valor del pH (figura 6.7B) ni con los modelos que predicen una dependencia exponencialmente creciente de k' con el pH (Kopaciewicz *et al.*, 1983; Velayudhan y Horváth, 1988). Este efecto puede ser debido a que la resina Duolite A-568 es un intercambiador aniónico débil por lo que la disminución del pH puede resultar en un progresivo incremento del número de grupos amino ionizados, aumentando la capacidad de adsorción (Bautista *et al.*, 1997).

La temperatura tiene una influencia positiva importante sobre la adsorción de α -amilasa en IEC. El aumento de la temperatura favorece la retención de la proteína debido a la mayor movilidad de las especies iónicas presentes. En el caso de la adsorción de α -amilasa en la resina hidrofóbica Duolite XAD-761, la influencia de la temperatura es muy pequeña en el intervalo experimental existiendo una ligera tendencia a disminuir el factor de retención al aumentar la temperatura. En la figura 6.8 se representa la influencia de la temperatura en la adsorción de α -amilasa sobre cada una de las dos resinas estudiadas.

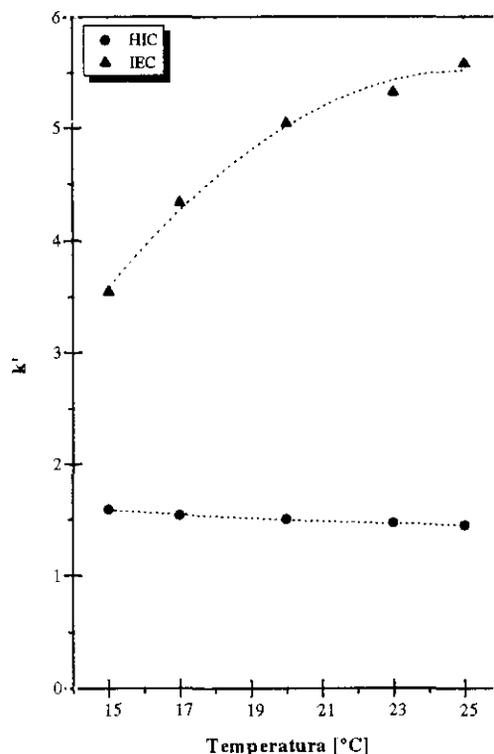


Figura 6.8: Efecto de la temperatura en la adsorción de α -amilasa sobre el factor de retención en los dos adsorbentes utilizados. Condiciones de operación: pH 6.0, fuerza iónica 0.35 (HIC) y pH 7.0, fuerza iónica 0.60 (IEC), todos a un caudal de 0.60 ml/min.

6.1.3.- Análisis de momentos

El análisis y discusión de resultados mediante el método de momentos se realizará en dos etapas. En la primera se determinarán los parámetros de equilibrio (K_A y factor de capacidad) y termodinámicos (ΔH^0 y ΔS^0). En la segunda etapa, con los datos del segundo momento central y los del primer momento calculado previamente, se estimarán los parámetros cinéticos del modelo de adsorción, coeficiente de dispersión axial (D_L) y coeficiente de difusión en los poros (D_p).

Datos termodinámicos y de equilibrio

A continuación se representan los resultados obtenidos correspondientes al primer momento para cada una de las resinas en las condiciones de operación en las que se ha trabajado en los experimentos de cromatografía de impulso.

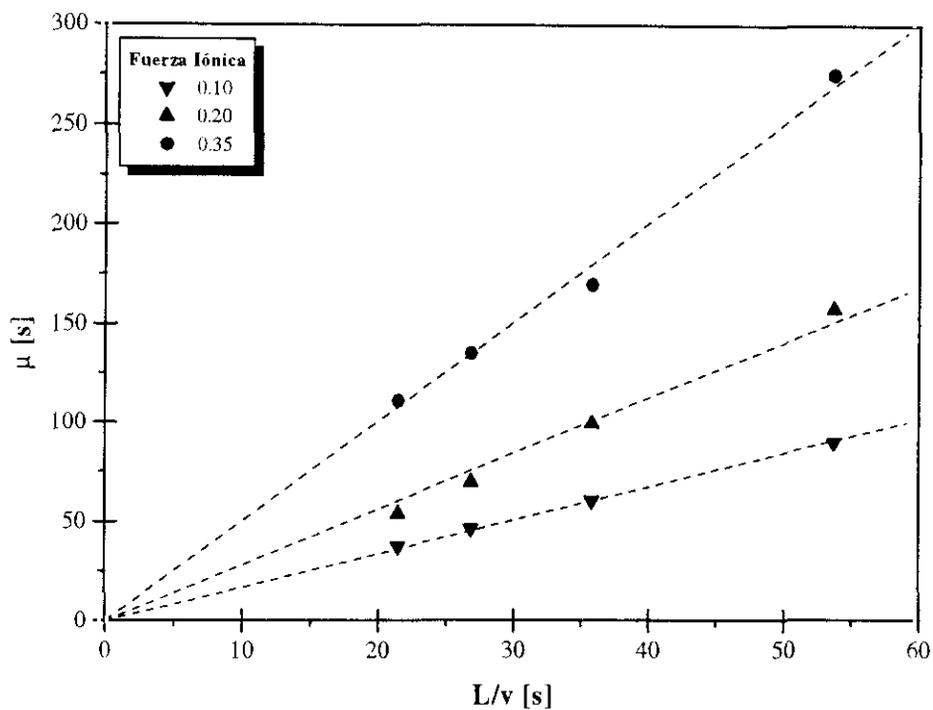


Figura 6.9: Representación del primer momento frente a L/v a pH 6.0 y 20 °C a diferentes valores de fuerza iónica para la resina Duolite XAD-761 (HIC).

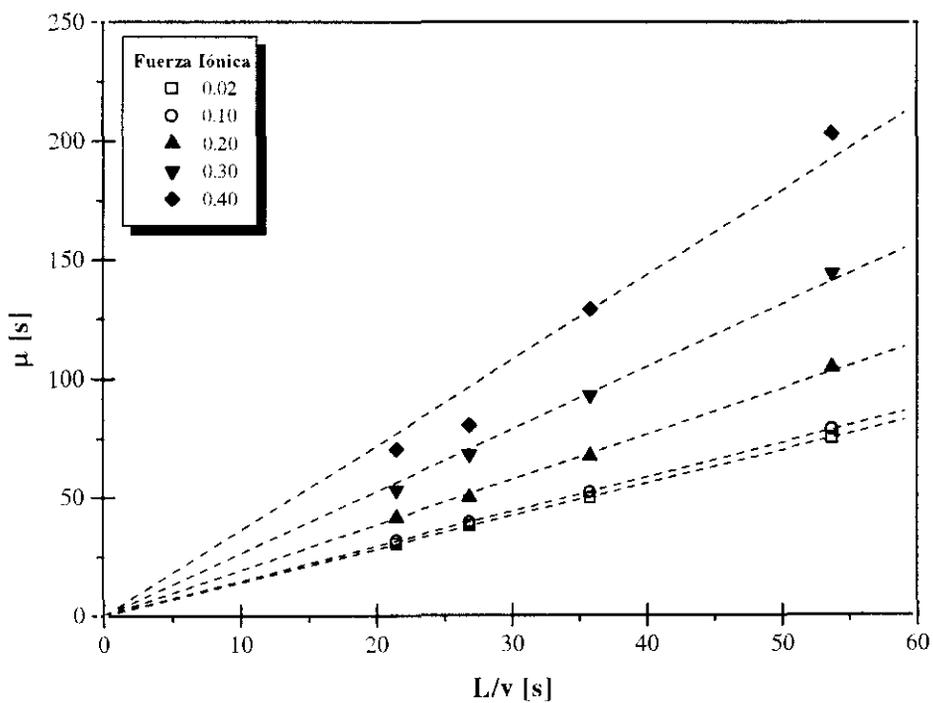


Figura 6.10: Representación del primer momento frente a L/v a pH 7.0 y 20 °C a diferentes valores de fuerza iónica para la resina Duolite XAD-761 (HIC).

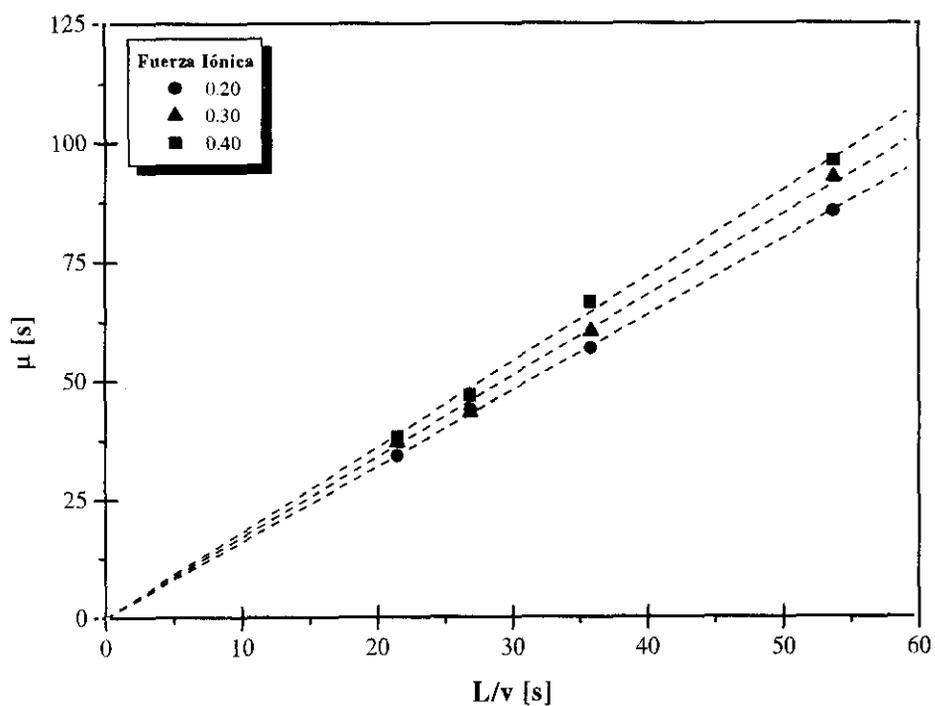


Figura 6.11: Representación del primer momento frente a L/v a pH 8.0 y 20 °C a diferentes valores de fuerza iónica para la resina Duolite XAD-761 (HIC).

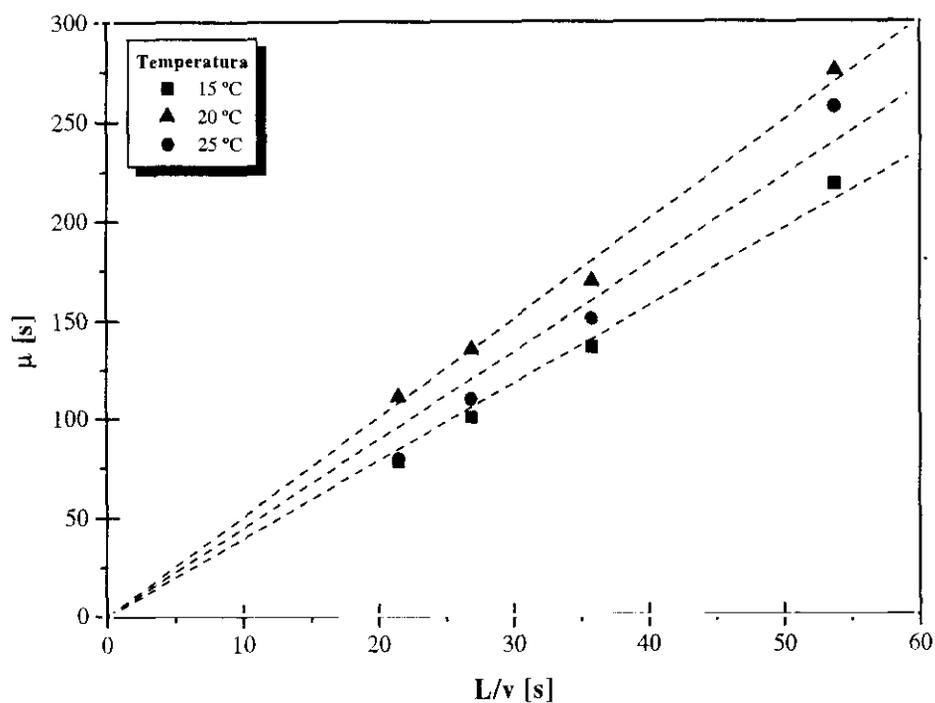


Figura 6.12: Representación del primer momento frente a L/v a pH 6.0 y fuerza iónica 0.35 a diferentes temperaturas correspondientes a la resina Duolite XAD-761 (HIC).

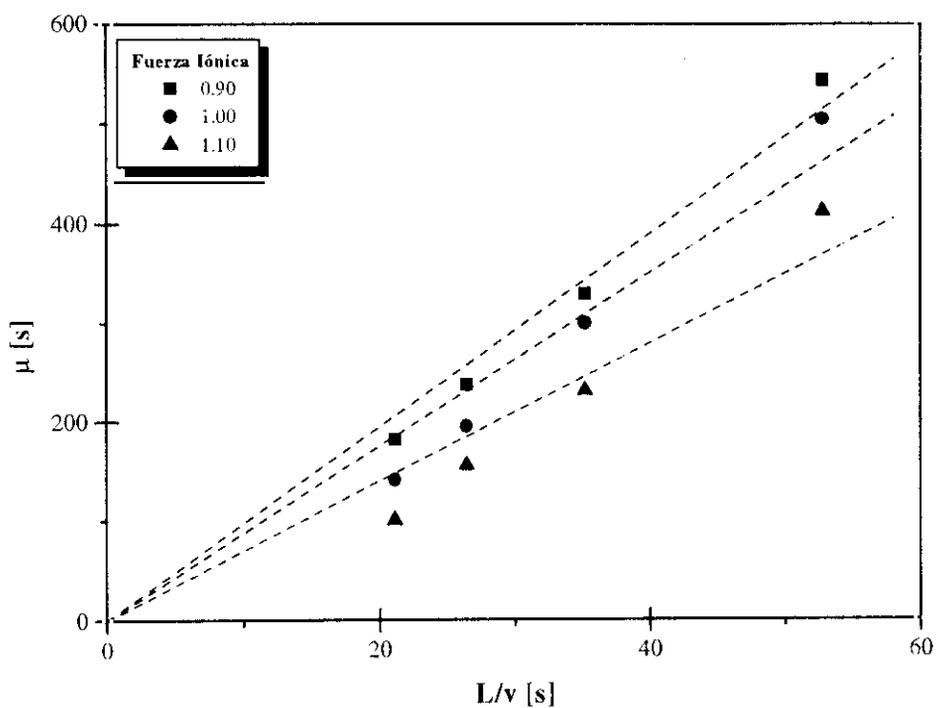


Figura 6.13: Representación del primer momento frente a L/v a pH 6.0 y 20 °C a diferentes valores de fuerza iónica para la resina Duolite A-568 (IEC).

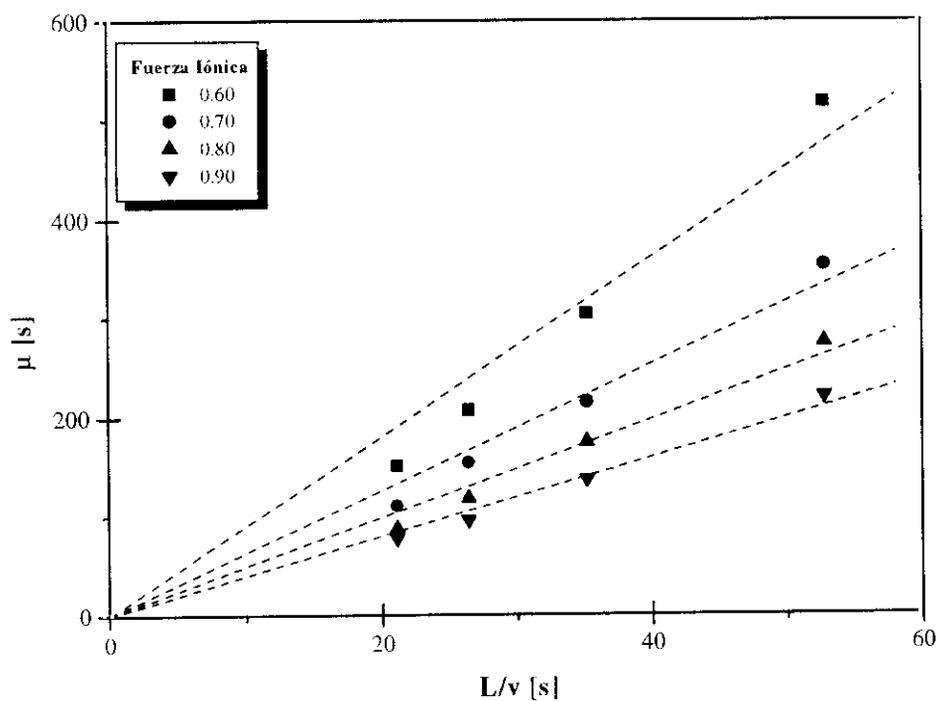


Figura 6.14: Representación del primer momento frente a L/v a pH 7.0 y 20 °C a diferentes valores de fuerza iónica para la resina Duolite A-568 (IEC).

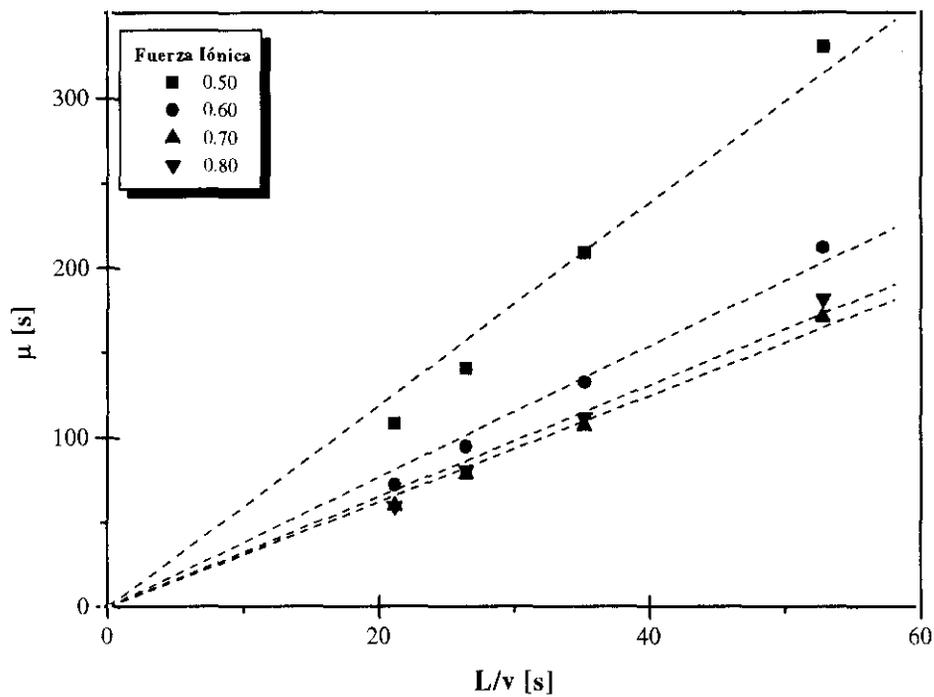


Figura 6.15: Representación del primer momento frente a L/v a pH 8.0 y 20 °C a diferentes valores de fuerza iónica para la resina Duolite A-568 (IEC).

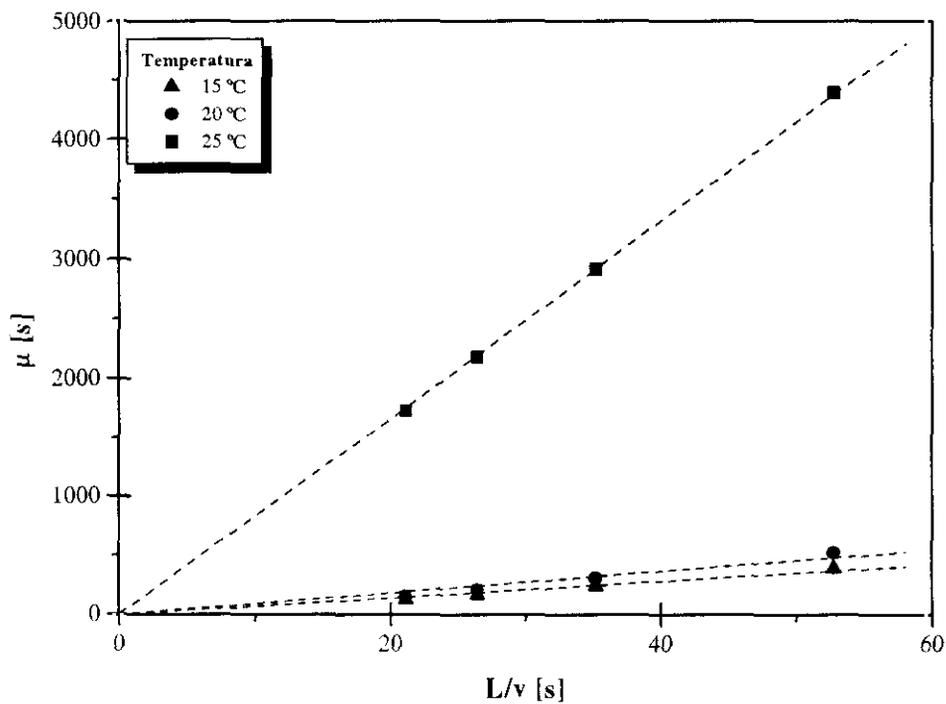


Figura 6.16: Representación del primer momento frente a L/v a pH 7.0 y fuerza iónica 0.60 a diferentes temperaturas correspondientes a la resina Duolite A-568 (IEC).

A partir de la pendiente de las gráficas anteriores, según el procedimiento descrito en el apartado A1 del anexo A, se determina el valor de la constante de adsorción, K_A , en las condiciones experimentales correspondientes a cada uno de los dos adsorbentes. También se determina el factor de capacidad de los adsorbentes a partir de la siguiente definición:

$$\text{Factor de capacidad} = \frac{\mu - \mu_{\text{traz.}}}{\mu_{\text{traz.}}} \quad [6.3]$$

Los resultados se muestran en las tablas 6.6 y 6.7. Ambos parámetros se ven influidos, cualitativamente, por las condiciones de operación en el mismo sentido que se ha observado para el factor de retención anteriormente comentado. En este caso, el cálculo de la constante de adsorción permite cuantificar la magnitud de dichas influencias.

Tabla 6.6: Constante de adsorción y factor de capacidad obtenidos mediante el método de momentos para la adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 (HIC) para las diferentes condiciones de operación.

| T [°C] | pH | Fuerza Iónica | K_A | Factor de Capacidad [‡] |
|-----------|------|------------------|-------|-------------------------------------|
| 20.0 | 6.0 | 0.10 | 0.83 | 0.2 |
| | | 0.20 | 3.54 | 0.9 |
| | | 0.30 | 8.90 | 2.6 |
| | | 0.35 | 8.86 | 2.5 |
| | 7.0 | 0.02 | 0.15 | 0.0 |
| | | 0.10 | 0.30 | 0.0 |
| | | 0.20 | 1.39 | 0.3 |
| | | 0.30 | 3.09 | 0.8 |
| | 8.0 | 0.40 | 5.42 | 1.4 |
| | | 0.20 | 0.61 | 0.1 |
| | | 0.30 | 0.86 | 0.2 |
| | 15.0 | 6.0 | 0.40 | 1.10 |
| 0.20 | | | 0.61 | 0.1 |
| 15.0 | 6.0 | 0.35 | 6.22 | 1.7 |
| 25.0 | 6.0 | 0.35 | 7.52 | 1.8 |

Como puede observarse, en el caso del sistema de HIC, la fuerza iónica favorece el equilibrio de adsorción para los tres valores de pH utilizados. Por otro lado, a valores de pH creciente, la

[‡] Calculado como el valor medio de los obtenidos para los diferentes caudales ensayados en iguales condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica.

capacidad de adsorción de la resina disminuye, siendo a pH 6.0 cuando la resina presenta el valor más alto. La influencia de la temperatura es pequeña y no presenta una tendencia regular en el intervalo experimental (15 - 25 °C).

Tabla 6.7: Constante de adsorción y factor de capacidad obtenidos mediante el método de momentos para la adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 (IEC) para las diferentes condiciones de operación.

| T [°C] | pH | Fuerza Iónica | K_A | Factor de Capacidad [§] |
|-----------|------|------------------|--------|-------------------------------------|
| 20.0 | 6.0 | 0.90 | 21.23 | 5.8 |
| | | 1.00 | 18.72 | 5.2 |
| | | 1.10 | 14.21 | 3.9 |
| | 7.0 | 0.60 | 19.48 | 5.4 |
| | | 0.70 | 12.55 | 3.5 |
| | | 0.80 | 9.05 | 2.6 |
| | | 0.90 | 6.61 | 1.9 |
| | 8.0 | 0.50 | 11.61 | 3.3 |
| | | 0.60 | 6.24 | 1.8 |
| | | 0.70 | 4.38 | 1.3 |
| | | 0.80 | 4.77 | 1.4 |
| | 15.0 | 7.0 | 0.60 | 14.06 |
| 17.0 | 7.0 | 0.60 | 21.43 | 6.1 |
| 25.0 | 7.0 | 0.60 | 207.53 | 59.0 |

Como en el caso anterior, el análisis de momentos para la resina de IEC da unos valores de la constante de adsorción que varían de acuerdo con lo previsto a raíz del estudio de la influencia de las variables. Los valores del factor de capacidad aumentan a medida que la concentración salina de la fase móvil disminuye, siendo mayor según disminuye el pH. La temperatura hace aumentar mucho la constante de adsorción a partir de valores superiores a 20 °C.

En general, los mayores valores del factor de capacidad y de la constante de adsorción se obtienen para la adsorción de α -amilasa en la resina de intercambio iónico Duolite A-568. A partir de los resultados obtenidos en esta etapa, se ha decidido realizar el estudio de la purificación de α -amilasa en tanque agitado discontinuo y en lecho fijo, para cada uno de los adsorbentes, en las

[§] Calculado como el valor medio de los obtenidos para los diferentes caudales ensayados en iguales condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica.

condiciones experimentales que se indican en la tabla 6.8. El criterio utilizado para la elección de esas condiciones de operación ha sido el de contar con un valor elevado de la constante de adsorción pero sin llegar a trabajar en condiciones de adsorción *irreversible*^{**}. Si esto ocurriese, la retención de α -amilasa sobre el adsorbente sería mayor pero se haría menos específica. En estas condiciones, no sería posible modular la adsorción ni la velocidad de migración del adsorbato en el caso de realizar la purificación de la α -amilasa a partir de un caldo de fermentación complejo.

Tabla 6.8: Condiciones de operación para la purificación de α -amilasa en tanque agitado y lecho fijo.

| | Duolite XAD-761 (HIC) | Duolite A-568 (IEC) |
|----------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Tampón | 0.05M Fosfato | 0.05M Tris/HCl |
| pH | 6.0 | 7.0 |
| Fuerza iónica | 0.35 | 0.60 |

Los valores de la entalpía y entropías de adsorción se han calculado para las condiciones de pH y fuerza iónica seleccionados (ver tabla 6.8) tanto para HIC como para IEC. Mediante la aplicación de la ecuación de Van't Hoff (ecuación 3.13) a los valores de constante de adsorción en función de la temperatura, se obtienen ΔH^0 y ΔS^0 . El primero de ellos representa la energía necesaria para que se produzca la adsorción de la α -amilasa a los ligandos unidos a la matriz de la resina.

Tabla 6.9: Variación de entalpía y entropía para la adsorción de α -amilasa en HIC e IEC en las condiciones experimentales listadas en la tabla 6.8.

| | ΔH^0 [kJ/mol] | ΔS^0 [J/mol·K] |
|------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Duolite XAD-761 | -25.2 | 103 |
| Duolite A-568 | 196 | 700 |

Los resultados (tabla 6.9) muestran, para la adsorción de α -amilasa, un comportamiento exotérmico en la resina hidrofóbica y endotérmico en la de intercambio aniónico. Ambas producen aumentos en la entropía global del proceso.

Como puede comprobarse mediante la aplicación del segundo principio de la termodinámica,

^{**} El término irreversible no hace referencia a su sentido estrictamente termodinámico. Se refiere a la escala temporal en la que se realiza el experimento y el adsorbato se eluye completa y rápidamente al modificar las condiciones de la fase móvil en el sentido adecuado.

en el intervalo de temperatura experimentado, la variación de energía libre, ΔG^0 , es negativa. Esto se traduce en que, en ambos casos, el proceso de adsorción se produce de forma espontánea.

Datos cinéticos

En primer lugar se ha determinado el valor del coeficiente de dispersión axial, D_L , a partir de los resultados de la altura equivalente de un plato teórico, AEPT, para los experimentos realizados con trazador. Los trazadores elegidos (NaCl para IEC y NaNO_3 para HIC) no se adsorben sobre la resina correspondiente y, debido a su pequeño tamaño, tampoco experimentan resistencia significativa por difusión a su paso a través de los poros de las partículas de adsorbente. Por ello, el segundo término de la ecuación 3.10 tendrá un valor muy pequeño, simplificándose dicha expresión a:

$$\text{AEPT} \approx \frac{2 \cdot D_L}{v} \quad [6.4]$$

De esta forma, la contribución fundamental al valor de la AEPT vendrá dada por término correspondiente a la dispersión axial, teniendo un valor aproximadamente constante para cada valor de la velocidad intersticial de la fase móvil. En la figura 6.17 se representan los valores de AEPT para cada una de las resinas. Se ha determinado, por tanto, el valor del coeficiente de dispersión axial en función de la velocidad de la fase móvil, obteniendo las siguientes expresiones:

$$\text{Columna de HIC:} \quad D_L = 8.0 \cdot 10^{-4} \cdot v$$

$$\text{Columna de IEC:} \quad D_L = 9.0 \cdot 10^{-4} \cdot v$$

donde D_L y v vienen expresados en m/s.

A continuación se procedió al cálculo del segundo momento central de forma numérica según la ecuación 3.2. Debido a la asimetría de los picos y a la excesiva anchura de los mismos, el cálculo de σ^2 está sujeto a un error considerable, ya que el desarrollo del método de momentos supone que los picos son simétricos y en forma de distribución gaussiana. Se aplicó entonces la corrección que suponen el método de los momentos con peso y el de los momentos truncados (ver apartado 3.2.2). Ambos, aunque mejoraron los resultados calculados presentan todavía un elevado grado de error en el cálculo del segundo momento, no ajustándose correctamente al modelo descrito.

Hay que decir que la aplicación de los dos métodos correctores mencionados, no varía los resultados derivados del cálculo del primer momento, ya que estos dependen únicamente del tiempo de retención.

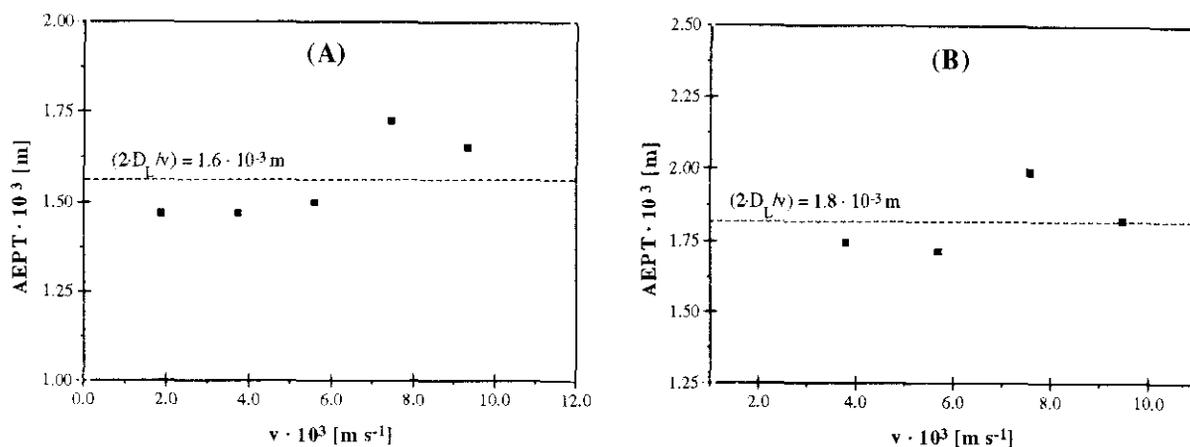


Figura 6.17: Valores de AEPT frente a la velocidad intersticial para la resina hidrofóbica (A) y de intercambio iónico (B) usando como trazador $NaNO_3$ y $NaCl$ respectivamente.

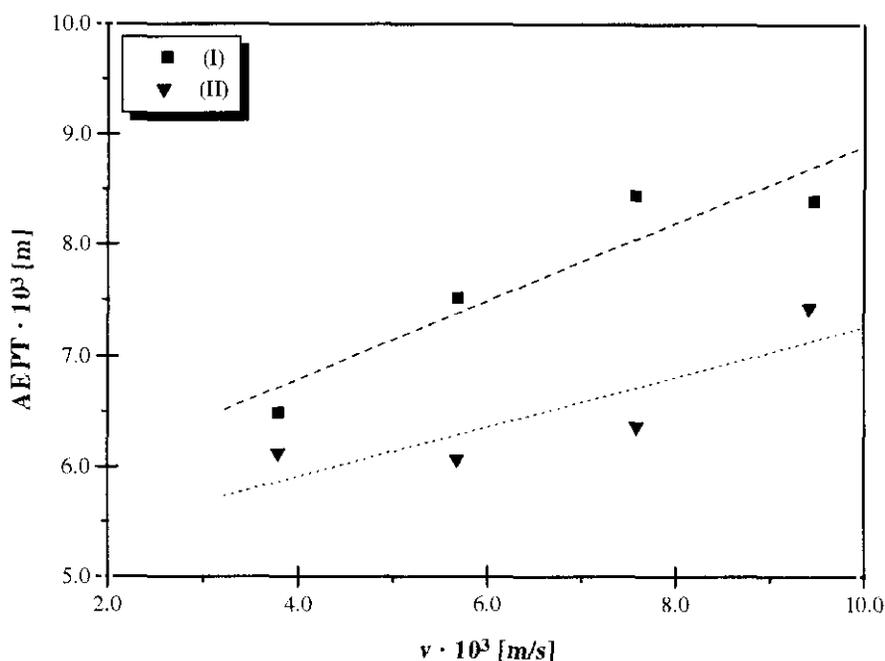


Figura 6.18: Representación de la AEPT frente a la velocidad intersticial para la adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 a 20 °C: (I) pH 7.0, fuerza iónica 0.60 y (II) pH 8.0, fuerza iónica 0.80.

A modo de ejemplo se han presentado (figura 6.18) los resultados obtenidos de la AEPT por el método de los momentos truncados para la adsorción en la resina de intercambio iónico correspondientes a dos condiciones de operación. La primera (I) en la que la adsorción es elevada y otra (II) en la que la constante de adsorción tiene el menor valor de los obtenidos experimentalmente. Se han calculado los valores del coeficiente de difusión en los poros mediante la ecuación A.3, determinando, por regresión lineal, la pendiente de los puntos que representan la variación de la

AEPT con la velocidad. Los coeficientes de correlación, r^2 , han sido 0.87 y 0.73 para los casos I y II respectivamente y los valores de D_p estimados para ambos casos fueron $9.9 \cdot 10^{-10}$ y $1.2 \cdot 10^{-9}$ m²/s.

Como resumen, puede decirse que el estudio de la adsorción mediante cromatografía líquida de alta eficacia, HPLC, es una técnica sencilla, rápida y sensible, adecuada para conocer la influencia de las variables de operación y la caracterización de determinados aspectos de la interacción adsorbato-adsorbente. La aplicación del método de los momentos permite cuantificar el valor de la constante del equilibrio y conocer así su variación con factores del medio como el pH, temperatura y fuerza iónica. Esto facilita la elección de las condiciones de operación para posteriores estudios de adsorción de α -amilasa en los adsorbentes estudiados. El cálculo del coeficiente de difusión en los poros a través de la determinación del segundo momento central no es adecuado para experimentos en los que los picos presenten alta asimetría, aunque da una idea del orden de magnitud que puede tener este parámetro.

6.2.- ISOTERMAS DE ADSORCIÓN

En este apartado se expondrán los resultados experimentales obtenidos para la determinación de las isotermas de adsorción a diferentes temperaturas para los adsorbentes de HIC e IEC estudiados. Posteriormente, los datos experimentales se ajustarán a las ecuaciones correspondientes a diversos tipos de isotermas que reproduzcan los resultados adecuadamente.

6.2.1.- Resultados experimentales

Se han determinado las isotermas de adsorción mediante experimentos en tanque agitado de acuerdo con el procedimiento experimental descrito en el apartado 5.3.2. En las gráficas se representan las concentraciones en el equilibrio correspondientes a la α -amilasa adsorbida en la superficie de la resina (q [mg/g]) frente a la de α -amilasa en la disolución (C_{eq} [mg/ml]). Esta última se determina mediante el análisis de la absorbancia en ultravioleta a 280 nm a partir de la curva de calibrado. La concentración superficial se calcula a través del balance de adsorbato en el sistema (ecuación 6.5) y está referida a la masa de resina.

$$q = \frac{(C_0 - C_{eq})V_L}{W} \quad [6.5]$$

siendo C_0 la concentración inicial de la disolución de adsorción, V_L el volumen de la misma y W la masa de resina utilizada.

Las isotermas de equilibrio para el sistema α -amilasa/HIC de han determinado a 4, 20 y 30 °C

y las del sistema α -amilasa/IEC a 20, 25 y 30 °C. El volumen de disolución utilizado, en todos los casos, ha sido de 50 ml, variando la masa de resina entre 0.50 y 1.75 g en los diferentes experimentos realizados. La concentración de α -amilasa se midió tras 12 horas, asegurándose así que se había alcanzado el equilibrio. Las condiciones de pH y fuerza iónica, para los experimentos realizados con la resina de HIC han sido 6.0 y 0.35 respectivamente y en los llevados a cabo con la de IEC se utilizó un pH de 7.0 y una fuerza iónica de 0.60, de acuerdo con lo expuesto en el apartado 5.3.1.

incrementarse la temperatura.

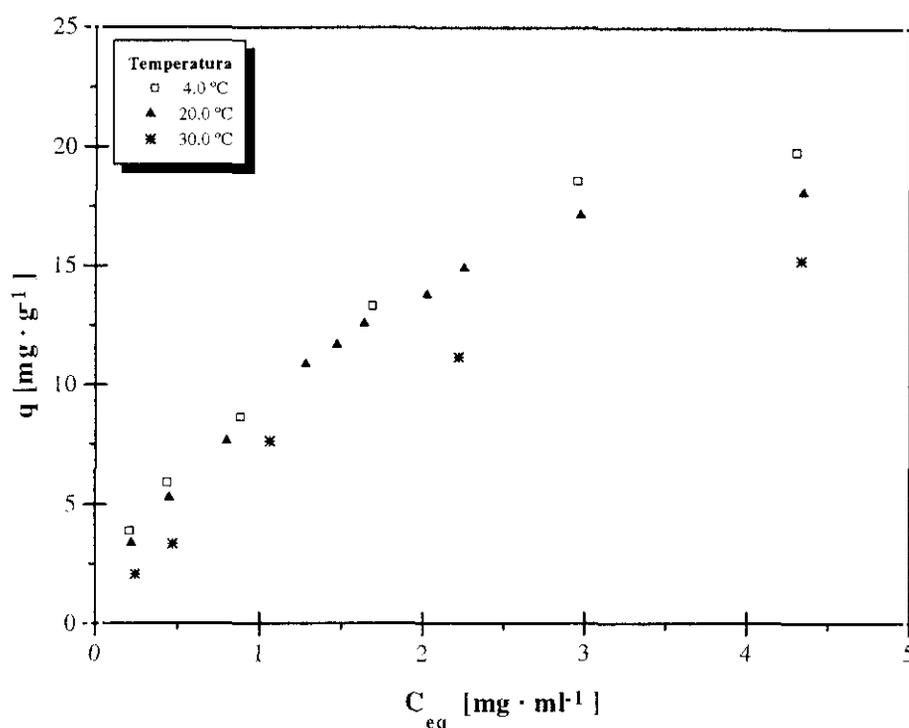


Figura 6.19: Isotermas de adsorción de α -amilasa sobre Duolite XAD-761 a tres temperaturas.

Los resultados experimentales se muestran en las figuras 6.19 y 6.20 para la adsorción sobre la resina de interacción hidrofóbica y de intercambio iónico respectivamente. En todos los casos se observa un comportamiento no lineal del equilibrio de adsorción para cada una de las temperaturas ensayadas en ambas resinas. Las curvas resultantes presentan una pendiente decreciente al aumentar la concentración en la fase líquida siendo, por tanto, cóncavas y clasificándose como isotermas favorables para la adsorción (figura 2.3).

Como se ha observado mediante la experimentación en HPLC, se comprueba que la capacidad de adsorción aumenta al disminuir la temperatura para la adsorción de α -amilasa sobre Duolite XAD-761 (resina de HIC), es decir, la curva correspondiente a una temperatura menor se encuentra por encima de otra cuya temperatura sea menor. En el caso de la adsorción en la resina de IEC, Duolite A-

568, la influencia de la temperatura actúa en sentido opuesto, aumentando la cantidad adsorbida al

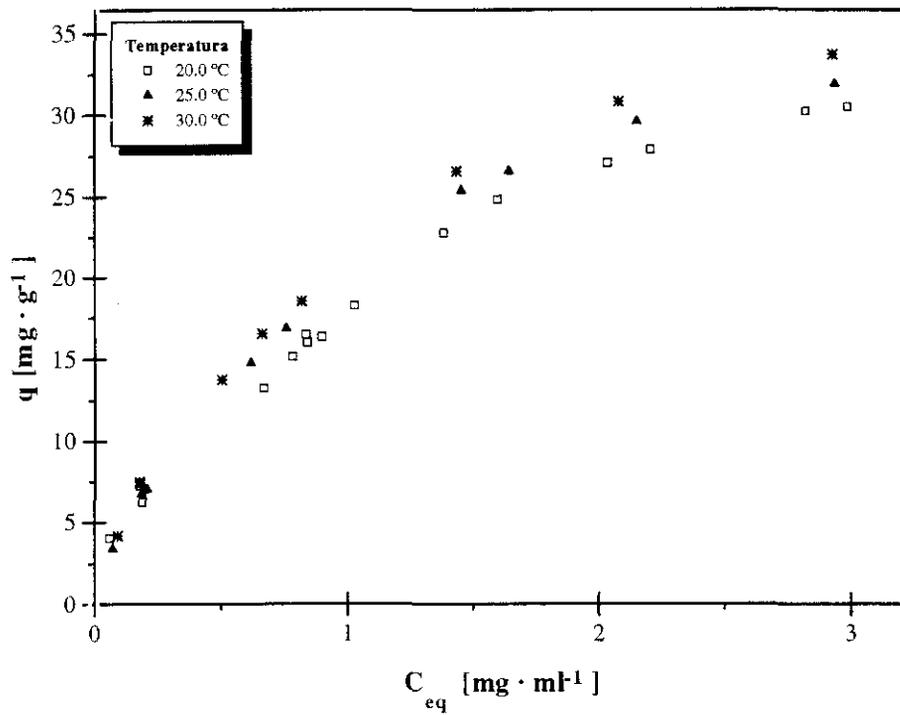


Figura 6.20: Isotermas de adsorción de α -amilasa sobre Duolite A-568 a tres temperaturas.

Comparando las isotermas obtenidas para ambas resinas (figura 6.21) en las condiciones de temperatura en las que la adsorción se ve más favorecida, se observa que la resina de IEC tiene mayor capacidad de adsorción que la de HIC en el intervalo de temperaturas estudiado ya que la concentración de α -amilasa en la fase adsorbida en el equilibrio es siempre más alta para la primera resina.

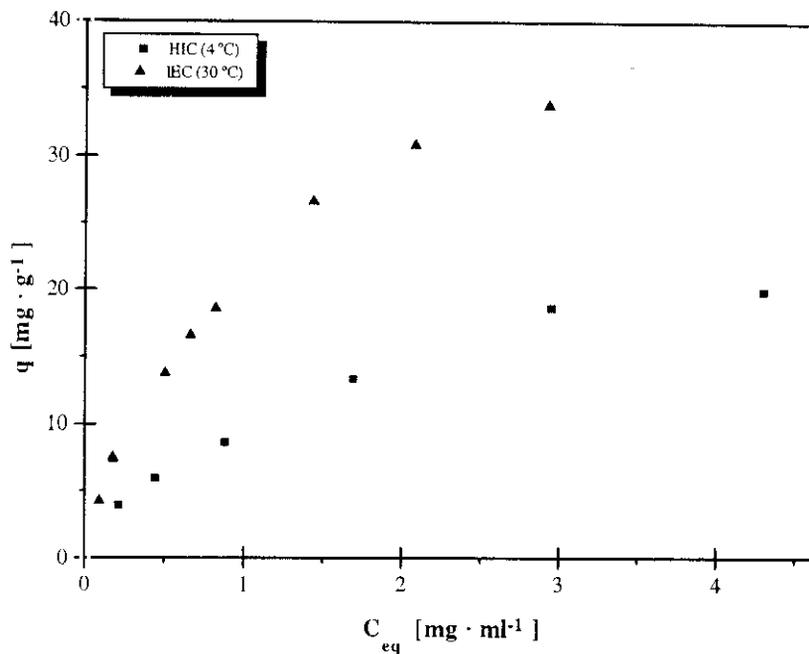


Figura 6.21: Isotermas de adsorción de α -amilasa sobre Duolite XAD-761 a 4 °C y sobre Duolite A-568 a 30 °C.

6.2.2.- Ajuste de los resultados a modelos de isotermas

Una vez obtenidos los datos experimentales del equilibrio de adsorción de α -amilasa en cada uno de los adsorbentes para cada temperatura, se ha procedido a ajustarlos a algunas de las ecuaciones de isotermas comentadas en el apartado 2.3.3.

Las isotermas de Langmuir y Freundlich (ecuaciones 2.13 y 2.14 respectivamente) son habitualmente utilizadas para describir el comportamiento no lineal del equilibrio de adsorción de un sólo componente. El ajuste de los datos experimentales a cada una de las expresiones se ha llevado a cabo mediante regresión no lineal utilizando el algoritmo de *Marquardt*.

A continuación se muestran los resultados obtenidos del análisis de regresión, con los parámetros estadísticos característicos, para todas las isotermas determinadas. Los ajustes se han realizado tomando un intervalo de confianza del 95%. Se incluyen como indicadores de la bondad del ajuste, el error medio de los parámetros estimados, el coeficiente de correlación, r , y el test chi-cuadrado, χ^2 . En las tablas 6.10 a 6.15 se resumen dichos parámetros y en las figuras 6.22 a 6.27 se representan gráficamente las curvas correspondientes al ajuste a las isotermas de Freundlich y Langmuir con los parámetros obtenidos. En el anexo B se muestra un estudio más detallado del ajuste, incluyendo el análisis de residuos.

Tabla 6.10: Parámetros de ajuste de la isoterma de equilibrio de α -amilasa en Duolite XAD-761 a 4 °C.

| Isoterma | Parámetros | Error | r | χ^2 |
|------------|-----------------|-------------|--------|----------|
| Langmuir | $q_m = 28.78$ | ± 1.98 | 0.9962 | 0.5064 |
| | $b = 0.544$ | ± 0.085 | | |
| Freundlich | $K_f = 9.68$ | ± 0.46 | 0.9941 | 0.7993 |
| | $\beta = 0.530$ | ± 0.799 | | |

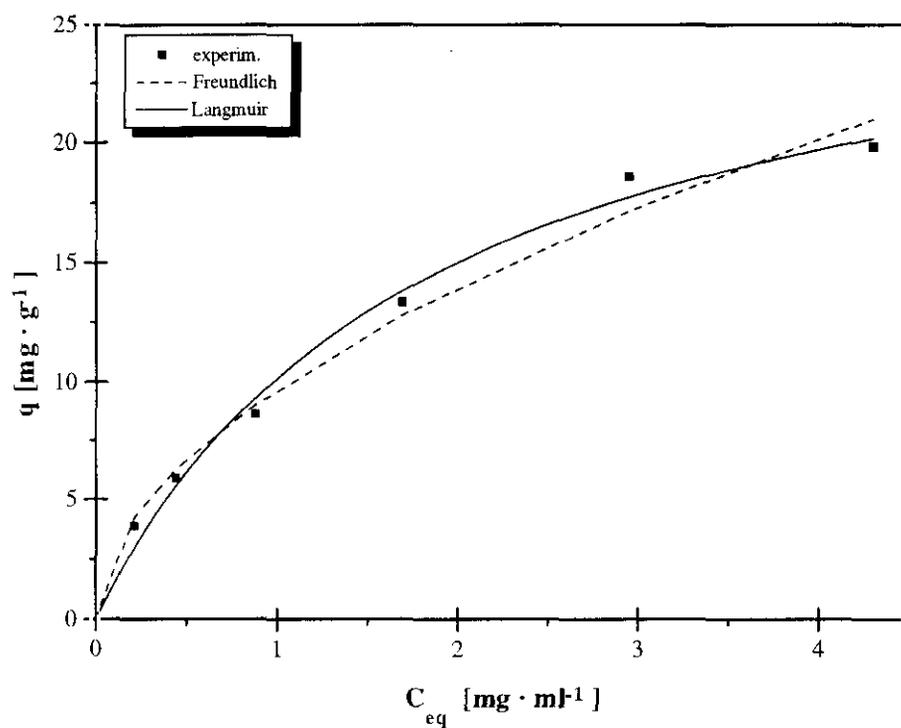
**Figura 6.22:** Ajuste de los datos experimentales a las isotermas de Langmuir y Freundlich para la adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 a 4 °C.

Tabla 6.11: Parámetros de ajuste de la isoterma de equilibrio de α -amilasa en Duolite XAD-761 a 20 °C.

| Isoterma | Parámetros | Error | r | χ^2 |
|------------|-----------------|-------------|--------|----------|
| Langmuir | $q_m = 26.35$ | ± 1.00 | 0.9979 | 0.1563 |
| | $b = 0.554$ | ± 0.045 | | |
| Freundlich | $K_f = 9.28$ | ± 0.46 | 0.9895 | 0.7764 |
| | $\beta = 0.513$ | ± 0.038 | | |

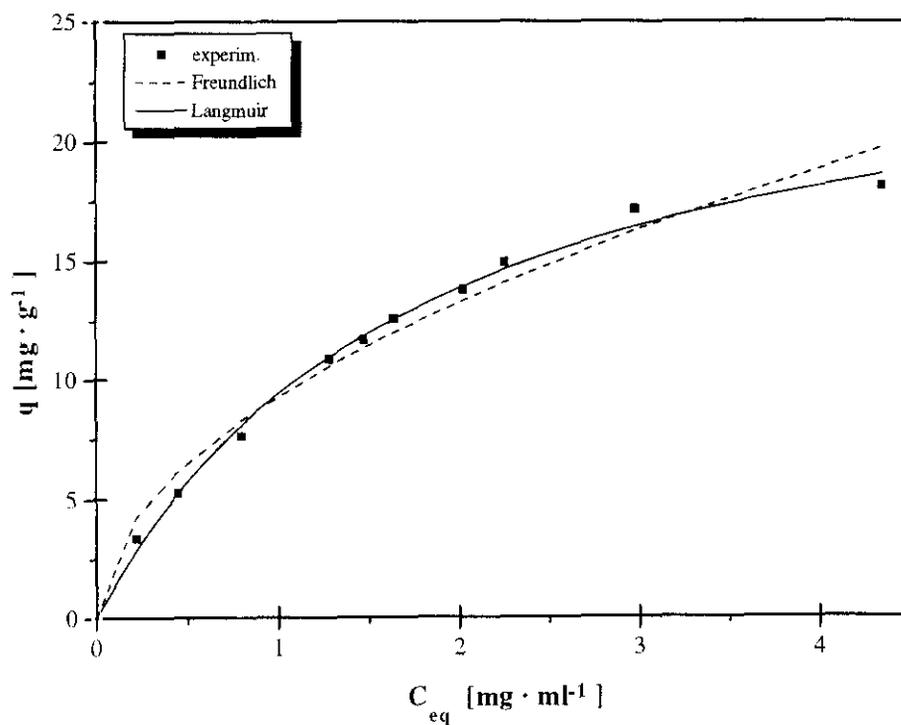
**Figura 6.23:** Ajuste de los datos experimentales a las isotermas de Langmuir y Freundlich para la adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 a 20 °C.

Tabla 6.12: Parámetros de ajuste de la isoterma de equilibrio de α -amilasa en Duolite XAD-761 a 30 °C.

| Isoterma | Parámetros | Error | r | χ^2 |
|------------|-----------------|-------------|--------|----------|
| Langmuir | $q_m = 24.09$ | ± 1.35 | 0.9987 | 0.1096 |
| | $b = 0.398$ | ± 0.045 | | |
| Freundlich | $K_f = 6.51$ | ± 0.45 | 0.9927 | 0.6254 |
| | $\beta = 0.602$ | ± 0.056 | | |

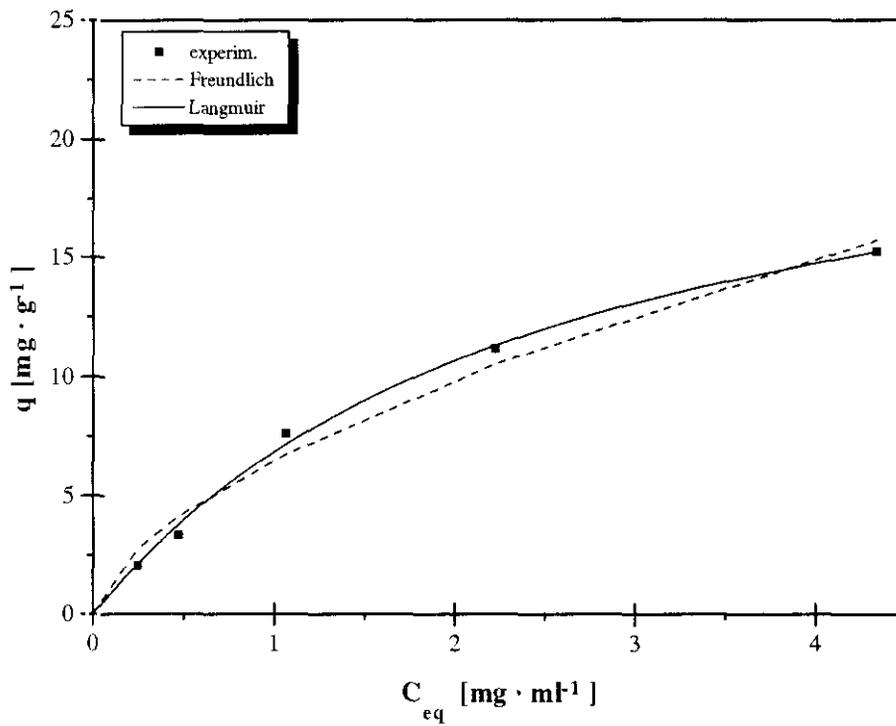
**Figura 6.24:** Ajuste de los datos experimentales a las isotermas de Langmuir y Freundlich para la adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 a 30 °C.

Tabla 6.13: Parámetros de ajuste de la isoterma de equilibrio de α -amilasa en Duolite A-568 a 20 °C.

| Isoterma | Parámetros | Error | r | χ^2 |
|------------|-----------------|-------------|--------|----------|
| Langmuir | $q_m = 45.46$ | ± 2.64 | 0.9923 | 1.4690 |
| | $b = 0.696$ | ± 0.084 | | |
| Freundlich | $K_f = 17.89$ | ± 0.28 | 0.9953 | 0.9096 |
| | $\beta = 0.532$ | ± 0.019 | | |

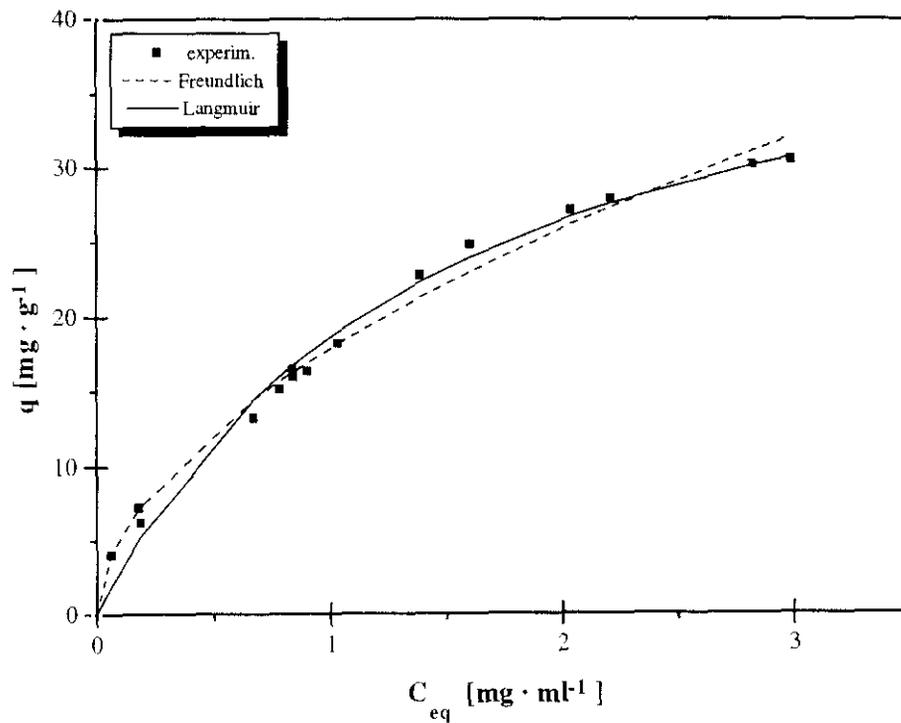
**Figura 6.25:** Ajuste de los datos experimentales a las isotermas de Langmuir y Freundlich para la adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 a 20 °C.

Tabla 6.14: Parámetros de ajuste de la isoterma de equilibrio de α -amilasa en Duolite A-568 a 25 °C.

| Isoterma | Parámetros | Error | r | χ^2 |
|------------|-----------------|-------------|--------|----------|
| Langmuir | $q_m = 45.40$ | ± 1.49 | 0.9988 | 0.3710 |
| | $b = 0.840$ | ± 0.064 | | |
| Freundlich | $K_f = 19.19$ | ± 0.56 | 0.9935 | 1.9702 |
| | $\beta = 0.539$ | ± 0.035 | | |

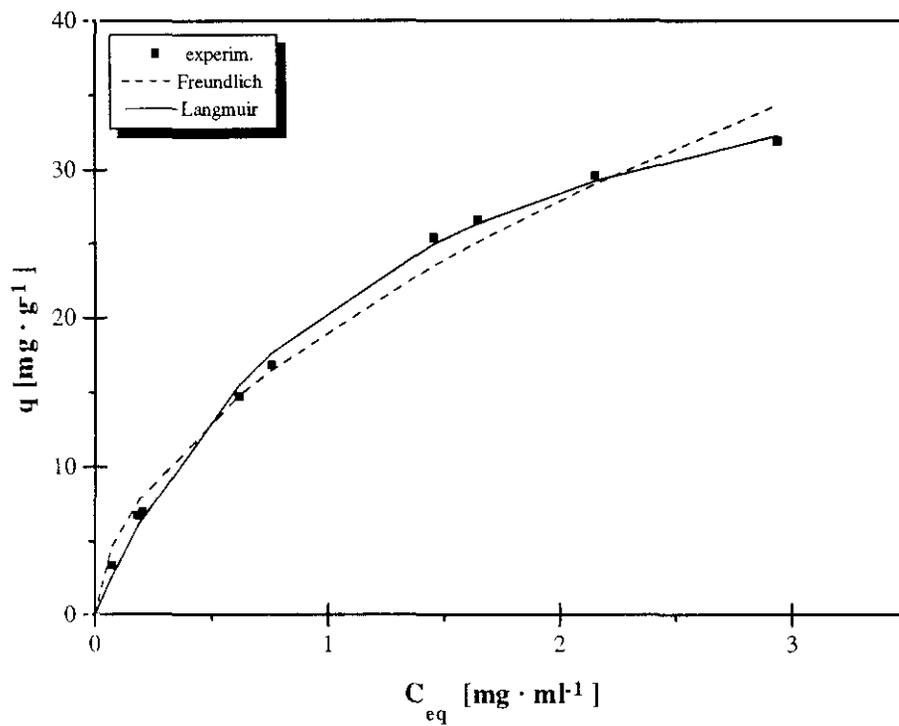
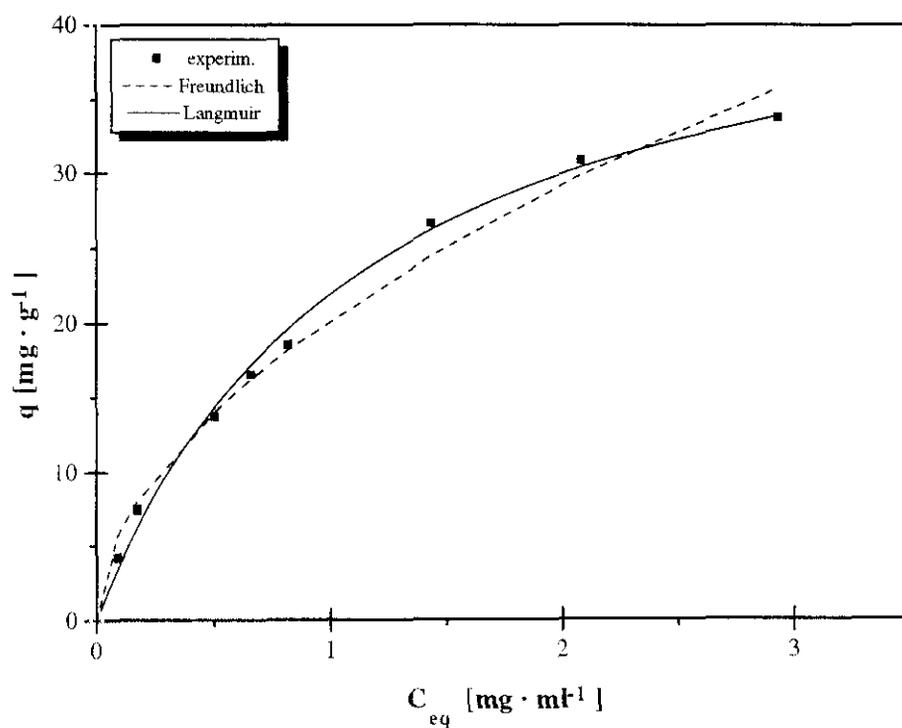
**Figura 6.26:** Ajuste de los datos experimentales a las isotermas de Langmuir y Freundlich para la adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 a 25 °C.

Tabla 6.15: Parámetros de ajuste de la isoterma de equilibrio de α -amilasa en Duolite A-568 a 30 °C.

| Isoterma | Parámetros | Error | r | χ^2 |
|------------|-----------------|-------------|--------|----------|
| Langmuir | $q_m = 47.17$ | ± 1.96 | 0.9988 | 0.7153 |
| | $b = 0.867$ | ± 0.080 | | |
| Freundlich | $K_f = 20.21$ | ± 0.49 | 0.9947 | 1.5928 |
| | $\beta = 0.530$ | ± 0.028 | | |

**Figura 6.27:** Ajuste de los datos experimentales a las isotermas de Langmuir y Freundlich para la adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 a 30 °C.

En base a los resultados del análisis de regresión realizado, se observa que los valores de r y χ^2 son mejores para el ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Langmuir excepto en el caso de la isoterma de adsorción de α -amilasa sobre la resina de IEC realizada a 20 °C para el que el ajuste a la ecuación de Freundlich es ligeramente mejor considerando el intervalo completo de experimentación.

A partir del análisis de residuos (ver anexo B) de los ajustes se han confirmado errores elevados (>10%) de forma sistemática para los valores de q calculados mediante la isoterma de Langmuir correspondientes a concentraciones menores de 0.20 mg/ml en el caso de ambos adsorbentes. Para concentraciones de α -amilasa inferiores a la comentada, la isoterma de Langmuir predice resultados considerablemente inferiores a los obtenidos experimentalmente, situándose la mayoría de los puntos correspondientes a estos valores en el intervalo de error de -15 a -30%, debido a que para concentraciones bajas, el comportamiento de la isoterma puede considerarse lineal. Para valores de concentración superiores al indicado, los residuos se distribuyen sin apreciarse tendencia alguna y se sitúan en el entorno de error de $\pm 5\%$.

En todos los casos, en el ajuste de los datos experimentales a la isoterma de Freundlich, se observa cierta tendencia en el análisis de los residuos (ve anexo B). Para valores de concentración baja, la utilización de la ecuación de ajuste de Freundlich produce errores, por exceso, muy elevados (hasta del 40%) por la tendencia lineal que presenta la isoterma a valores bajos de concentración. En el intervalo de concentraciones de 1 a 3 mg/ml, aproximadamente, los residuos correspondientes a este ajuste se sitúan en valores negativos, para pasar a magnitudes positivas y en rápido aumento para concentraciones superiores. Esto último se debe a que la expresión de la isoterma de Freundlich no predice la saturación del adsorbente, comportándose de forma monótonamente creciente.

Como resumen, pueden realizarse los siguientes comentarios:

Se han obtenido experimentalmente las isotermas de adsorción de α -amilasa sobre las resinas de HIC e IEC a diferentes temperaturas. Se observa un comportamiento no lineal en todos los casos estudiados y que, en el intervalo experimental de temperatura, la resina de intercambio iónico, Duolite A-568, tiene una capacidad de adsorción mayor que la de interacción hidrofóbica, Duolite XAD-761. Esta circunstancia no invalida ni reduce, en absoluto, la utilidad de esta última ya que al operar ambas en condiciones diferentes de fuerza iónica y temperatura, podrán ser adecuadas en determinadas etapas del proceso de purificación, en función de la composición y características del medio. Por ejemplo, el uso de una etapa de purificación por HIC podría ser aconsejada en situaciones en las que la proteína esté en un medio de alta concentración salina y esta quiera reducirse, ya que la adsorción en HIC se ve favorecida a alta fuerza iónica y la elución del adsorbato se produce con medios en los que la concentración salina es pequeña.

Por otro lado se han ajustado los datos experimentales de las isothermas de adsorción a las ecuaciones de Langmuir y Freundlich determinando los parámetros de regresión no lineal. Se ha comprobado que el uso de la ecuación de Langmuir reproduce, con errores inferiores al 5%, los resultados experimentales para valores de concentración en la fase líquida mayores de 0.2 mg/ml. El ajuste a la ecuación de Freundlich genera errores sistemáticos que no la hacen apropiada para el sistema experimental estudiado.

Como solución a este último problema se propone realizar un ajuste lineal a bajas concentraciones para ser utilizado en los casos en los que se necesite predecir la cantidad adsorbida en el equilibrio con concentraciones inferiores a 0.2 mg/ml. Los valores de la constante de adsorción para la isoterma lineal con validez en el intervalo de concentraciones se presentan en el anexo B.

6.3.- ADSORCIÓN EN TANQUE AGITADO DISCONTINUO

En el presente apartado se exponen los resultados obtenidos en los experimentos cinéticos de adsorción de α -amilasa sobre las resina de HIC y de IEC en un sistema de tanque agitado discontinuo. Estos resultados se utilizarán posteriormente para obtener los valores del coeficiente de difusión en los poros para cada uno de los experimentos, mediante el ajuste de los datos experimentales al modelo matemático propuesto para dicho sistema.

6.3.1.- Planificación de experimentos

Mediante la realización de experimentos de adsorción en un sistema de tanque agitado en operación discontinua se pretende obtener el valor del coeficiente de difusión efectivo en los poros, D_p , para cada una de las condiciones de operación ensayadas con los adsorbentes de HIC e IEC estudiados en el presente trabajo. Dicho parámetro se determinará mediante el ajuste y optimación de los datos cinéticos experimentales al modelo de adsorción propuesto para este sistema (ver apartado 3.3.2).

De esta manera, se estudiará la influencia de las variables de operación sobre el valor de D_p . Las condiciones generales de experimentación (pH, fuerza iónica, masa de resina, volumen de disolución, tamaño de partícula y velocidad de agitación) son las mostradas en la tabla 5.2. A continuación (tablas 6.16 y 6.17) se expone la planificación de experimentos para cada resina en función de las variables cuya influencia se va a estudiar: temperatura y concentración inicial de la disolución de adsorción, C_0 .

Tabla 6.16: Experimentos de adsorción de α -amilasa sobre resina de HIC realizados en tanque agitado discontinuo.

| Temperatura [°C] | C_0 [mg/ml] |
|------------------|---------------|
| 4.0 | 0.10 |
| | 0.25 |
| | 0.50 |
| 20.0 | 0.10 |
| | 0.25 |
| | 0.50 |
| 30.0 | 0.10 |
| | 0.25 |
| | 0.50 |

Tabla 6.17: Experimentos de adsorción de α -amilasa sobre resina de IEC realizados en tanque agitado discontinuo.

| Temperatura [°C] | C_0 [mg/ml] |
|------------------|---------------|
| 20.0 | 0.10 |
| | 0.25 |
| | 1.00 |
| 25.0 | 0.10 |
| | 0.25 |
| | 1.00 |
| 30.0 | 0.10 |
| | 0.25 |
| | 1.00 |

6.3.2.- Resultados

Se ha medido, de forma continua, la evolución de la concentración de α -amilasa en la disolución de adsorción en cada uno de los experimentos. Los resultados se muestran en forma gráfica representando la concentración adimensional, C/C_0 , frente al tiempo.

Como se ha verificado anteriormente, el efecto de la temperatura sobre la adsorción de α -

amilasa en las resinas de HIC e IEC estudiadas es opuesto. Como se observa en la figura 6.28 y en la tabla 6.18, la disminución de la temperatura aumenta la cantidad de α -amilasa adsorbida sobre la resina de HIC, ya que la curva experimental correspondiente a 4 °C está por debajo de la de 20 °C, quedando por encima de estas la curva de mayor temperatura, 30 °C (esto es así debido a que el resto de las variables de operación son comunes a los tres experimentos).

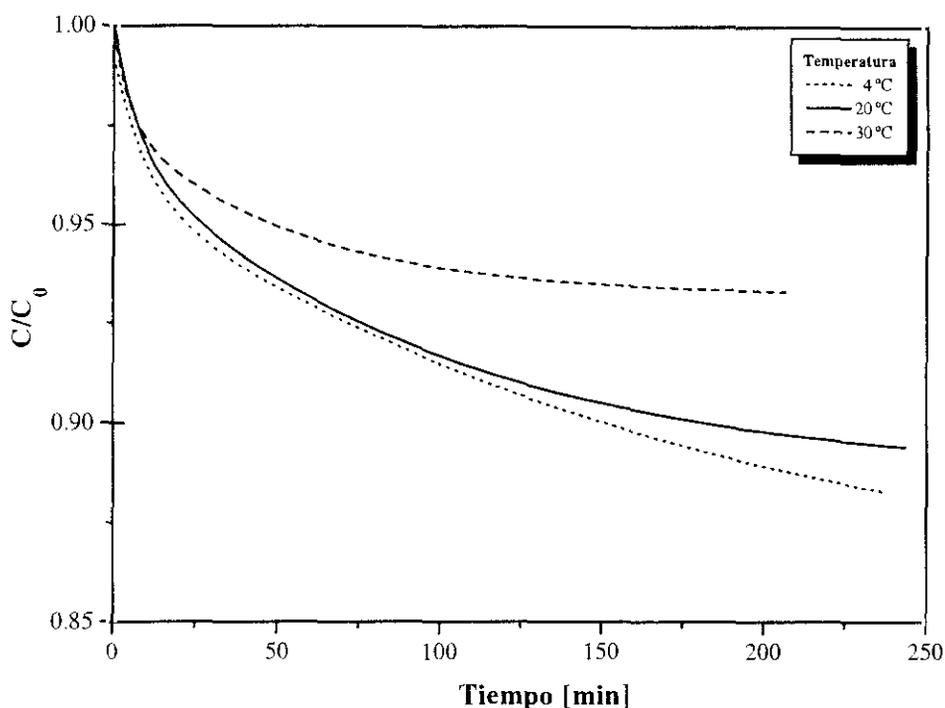


Figura 6.28: Comparación de la cinética de adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 a diferentes temperaturas para una concentración inicial de 0.50 mg/ml.

Para la resina de IEC, la adsorción de la enzima está favorecida por el aumento de la temperatura (figura 6.29 y tabla 6.20), mostrándose de esta manera en todo el intervalo experimental de concentraciones. En el apartado C1 (anexo C) se representan el resto de los resultados experimentales en los que se compara el efecto de la temperatura en la cinética de adsorción correspondientes a otras concentraciones iniciales para la resina de HIC (figuras C.1 y C.2) y para la de IEC (figuras C.3 y C.4). El tiempo al que se alcanza el equilibrio es menor para los experimentos realizados a temperaturas más elevadas, debido a una mayor velocidad de transferencia de materia, favorecida por temperaturas crecientes. Este efecto es común a los dos adsorbentes en todo el intervalo experimental.

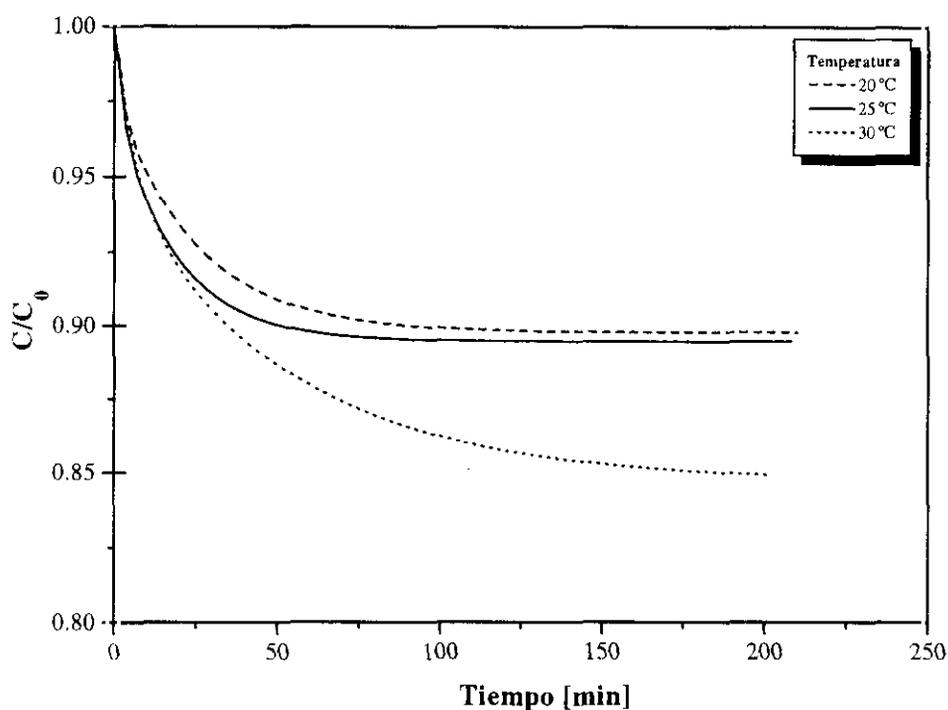


Figura 6.29: Comparación de la cinética de adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 a diferentes temperaturas para una concentración inicial de 1.00 mg/ml.

La concentración inicial de adsorbato también influye significativamente en las curvas cinéticas de adsorción. En este caso, el comportamiento de las dos resinas es, cualitativamente, análogo (figuras 6.30 y 6.31). Al disminuir la concentración inicial de la disolución de adsorción, el nivel de desaparición de adsorbato en el seno de dicha disolución es mayor (tablas 6.19 y 6.21), es decir, el valor final que alcanza la concentración adimensional es menor. Sin embargo, la capacidad de la resina por unidad de masa aumenta para concentraciones iniciales crecientes, de acuerdo con lo predicho por la isoterma de equilibrio. Las figuras C.5 a C.8 (anexo C) muestran el resto de los resultados experimentales en los que se compara el efecto de la concentración inicial en la adsorción de α -amilasa sobre las dos resinas estudiadas. La utilización del proceso de adsorción en condiciones de alta dilución, a pesar de aprovechar sólo una pequeña fracción de la capacidad total de la resina, podría tener interés en la eliminación de determinados contaminantes que se encuentren en concentraciones muy bajas. De esta manera, se podría reducir el nivel de dichos contaminantes hasta los márgenes tolerados por las especificaciones legales, técnicas o comerciales.

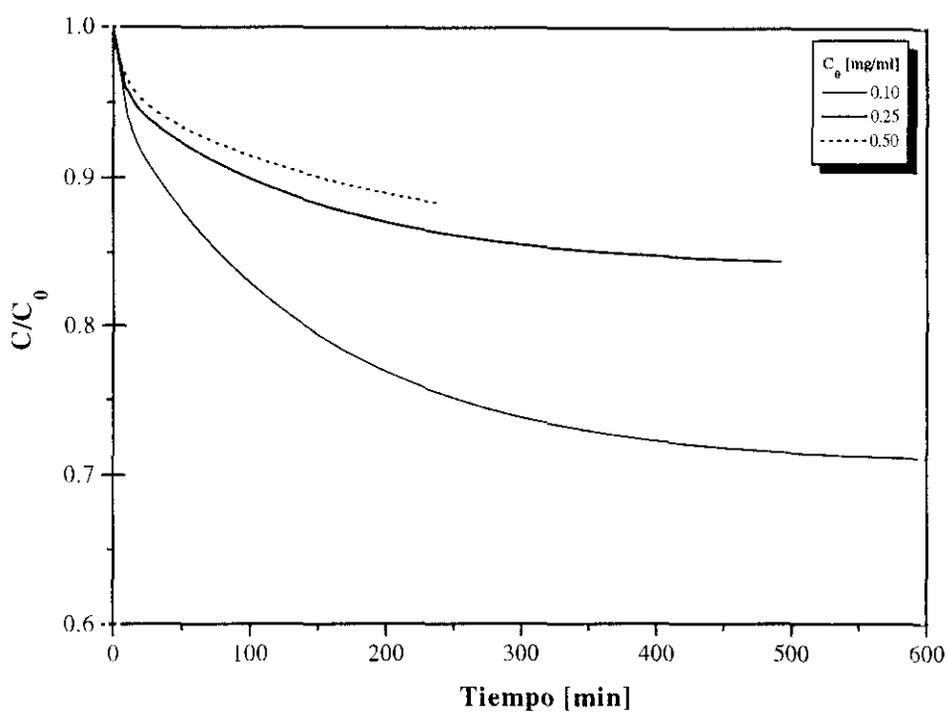


Figura 6.30: Comparación de la cinética de adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 para diferentes concentraciones iniciales de adsorbato llevadas a cabo a 4 °C.

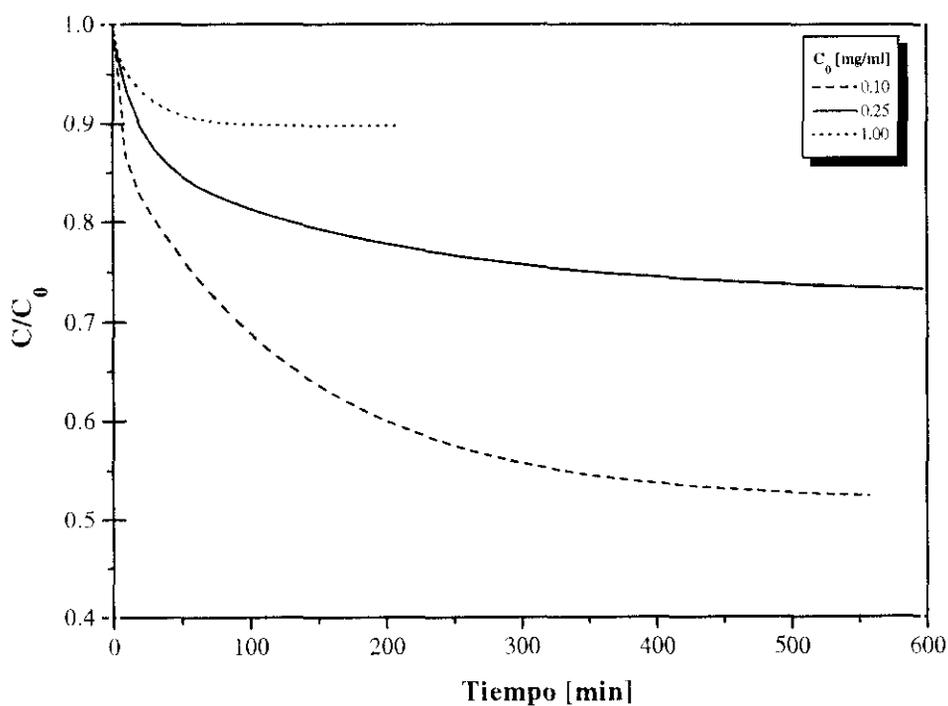


Figura 6.31: Comparación de la cinética de adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 para diferentes concentraciones iniciales de adsorbato llevadas a cabo a 30 °C.

También puede observarse que el equilibrio se alcanza antes en los experimentos en los que la concentración inicial de α -amilasa es más elevada. El flujo que atraviesa la capa límite externa que rodea a las partículas es directamente proporcional a la diferencia de concentración de α -amilasa entre los extremos de dicha película (ecuación 2.1), aunque los experimentos realizados en el presente trabajo se han diseñado de forma que la velocidad de transferencia de materia externa no controle la velocidad global del proceso. Sin embargo, el flujo por difusión en el interior de los poros viene descrito por una expresión basada en la ley de Fick, siendo el gradiente radial de concentración la fuerza impulsora que rige el flujo (ecuación 2.8), el cual es mayor en el caso de que la concentración también lo sea.

A modo comparativo, en las tablas 6.18 y 6.19 se muestran los resultados para la resina de HIC de la cantidad de α -amilasa adsorbida por unidad de masa de adsorbente y de la fracción de α -amilasa eliminado de la disolución, C_{eq}/C_0 , respectivamente y en las tablas 6.20 y 6.21 las correspondientes para la resina de IEC.

Tabla 6.18: Cantidad de α -amilasa adsorbida por unidad de masa de adsorbente con la resina de HIC.

| | C_0 [mg/ml] | | |
|---------|---------------|------|------|
| | 0.10 | 0.25 | 0.50 |
| 4.0 °C | 2.87 | 3.81 | 5.81 |
| 20.0 °C | 2.09 | 3.28 | 5.11 |
| 30.0 °C | 1.70 | 3.01 | 3.15 |

Tabla 6.19: Fracción de α -amilasa eliminada de la disolución de adsorción con la resina de HIC.

| | C_0 [mg/ml] | | |
|---------|---------------|------|------|
| | 0.10 | 0.25 | 0.50 |
| 4.0 °C | 0.71 | 0.84 | 0.88 |
| 20.0 °C | 0.79 | 0.86 | 0.89 |
| 30.0 °C | 0.83 | 0.87 | 0.93 |

Tabla 6.20: Cantidad de α -amilasa adsorbida por unidad de masa de adsorbente con la resina de IEC.

| | C_0 [mg/ml] | | |
|---------|---------------|------|-------|
| | 0.10 | 0.25 | 1.00 |
| 20.0 °C | 3.82 | 6.56 | 9.76 |
| 25.0 °C | 4.35 | 6.99 | 10.06 |
| 30.0 °C | 4.62 | 7.24 | 14.63 |

Tabla 6.21: Fracción de α -amilasa eliminada de la disolución de adsorción con la resina de IEC.

| | C_0 [mg/ml] | | |
|---------|---------------|------|------|
| | 0.10 | 0.25 | 1.00 |
| 20.0 °C | 0.61 | 0.73 | 0.90 |
| 25.0 °C | 0.56 | 0.72 | 0.89 |
| 30.0 °C | 0.53 | 0.71 | 0.85 |

6.4.- ADSORCIÓN EN LECHO FIJO

En este apartado se exponen los resultados obtenidos en el proceso de adsorción de α -amilasa en lecho fijo utilizando los adsorbentes de interacción hidrofóbica e intercambio aniónico estudiados en el presente trabajo de investigación.

Se ha realizado una planificación de los experimentos necesarios para alcanzar los objetivos fijados en el apartado 1.3.

6.4.1.- Planificación de experimentos

Tabla 6.22: Experimentos de adsorción de α -amilasa sobre Duolite XAD-761 en lecho fijo (diámetro interno de la columna: 10.0 mm).

| T [°C] | C ₀ [mg/ml] | Caudal [ml/min] | R [mm] | W [g] | L [mm] |
|--------|------------------------|-----------------|--------|-------|--------|
| | | 0.25 | | | |
| | 0.50 | 0.50 | | | |
| | | 1.00 | | | |
| | | 0.25 | | | |
| 20.0 | 1.00 | 0.50 | | | |
| | | 1.00 | 41.0 | 1.00 | 25.5 |
| | | 0.25 | | | |
| | 2.50 | 0.50 | | | |
| | | 1.00 | | | |
| | | 0.25 | | | |
| | | 0.50 | | | |
| | | 1.00 | | | |
| 4.0 | 1.00 | 0.50 | | | |
| 30.0 | 1.00 | 0.50 | | | |
| 20.0 | 1.00 | 0.50 | 26.0 | 1.00 | 32.0 |
| 20.0 | 1.00 | 0.50 | 65.0 | 1.00 | 25.0 |
| 20.0 | 1.00 | 0.50 | 26.0 | 0.50 | 13.0 |

Uno de los objetivos del presente trabajo de investigación es la determinación de la influencia de las diferentes variables de operación (temperatura, concentración de entrada y caudal) y

características físicas de cada sistema experimental (radio medio de partícula, masa de adsorbente y longitud de lecho) en el proceso de adsorción así como, posteriormente, en los parámetros cinéticos de transferencia de materia que caracterizan la adsorción de la α -amilasa en un lecho fijo. Con este fin, se han realizado los experimentos que se muestran en las tablas 6.22 y 6.23 para las resinas de HIC e IEC respectivamente.

Tabla 6.23: Experimentos de adsorción de α -amilasa sobre Duolite A-568 en lecho fijo (diámetro interno de la columna: 10,0 mm).

| T [°C] | C ₀ [mg/ml] | Caudal [ml/min] | R [mm] | W [g] | L [mm] |
|--------|------------------------|-----------------|--------|-------|--------|
| | | 0.25 | | | |
| | 0.50 | 0.50 | | | |
| | | 1.00 | | | |
| | | 0.25 | | | |
| 25.0 | 1.00 | 0.50 | | | |
| | | 1.00 | 41.0 | 1.00 | 31.0 |
| | | 0.25 | | | |
| | 2.50 | 0.50 | | | |
| | | 1.00 | | | |
| | | 0.25 | | | |
| | | 0.50 | | | |
| | | 1.00 | | | |
| 20.0 | 0.50 | 0.50 | | | |
| 30.0 | 0.50 | 0.50 | | | |
| 25.0 | 1.00 | 0.50 | 26.0 | 1.00 | 32.0 |
| 25.0 | 1.00 | 0.50 | 65.0 | 1.00 | 30.0 |
| 25.0 | 1.00 | 0.50 | 26.0 | 0.50 | 19.0 |

Además, se ha estudiado la estabilidad de los dos adsorbentes para conocer la pérdida de capacidad de cada uno de ellos debida a la reutilización de la columna. Para ello se realizaron ciclos de adsorción-desorción en las condiciones de operación que se detallan en la tabla 6.24.

Tabla 6.24: Condiciones de operación de los ciclos de adsorción-desorción.

| | T [°C] | C ₀ [mg/ml] | Caudal [ml/min] | R [mm] | W [g] | L [mm] |
|------------------------|-----------|---------------------------|--------------------|-----------|----------|-----------|
| Duolite XAD-761 | 20.0 | 1.00 | 0.50 | 41.0 | 1.00 | 25.5 |
| Duolite A-568 | 25.0 | 1.00 | 0.50 | 41.0 | 1.00 | 31.0 |

6.4.2.- Resultados experimentales

Los resultados experimentales se muestran en forma de gráficas que representan las curvas de ruptura de cada uno de los experimentos. En ellas se representa la concentración, en forma adimensional (C/C_0) a la salida de la columna frente al número de volúmenes de lecho (N_v) que han pasado a través de la columna. En algunos casos, por motivos de claridad, la abscisa corresponde al tiempo de operación (t).

El número de volúmenes de lecho se determina a partir del caudal (Q) y del volumen de la columna de adsorción (V_L) mediante la siguiente expresión:

$$N_v = \frac{t \cdot Q}{V_L} \quad [6.6]$$

Los experimentos muestran unas curvas de ruptura con la forma sigmoideal típica de los procesos de adsorción, en los que transcurrido un tiempo determinado, sucede la ruptura, aumentando la concentración de α -amilasa en el efluente de la columna. A tiempos suficientemente elevados, la columna alcanza la saturación y la concentración a la salida de la misma se iguala a la concentración de alimentación a la entrada del lecho. La forma de dichas curvas está determinada por una combinación compleja de mecanismos correspondientes a procesos de equilibrio y de no equilibrio (Johnston *et al.*, 1991).

Una vez alcanzada la saturación, la cantidad de α -amilasa adsorbida en la superficie interna de la resina viene dada por el siguiente balance de materia:

$$q \cdot W = Q \cdot C_0 \cdot \int_0^{\infty} [1 - (C / C_0)] \cdot dt - C_0 \cdot V_L \cdot [\epsilon + \epsilon_p \cdot (1 - \epsilon)] \quad [6.7]$$

donde el valor de la integral corresponde al área que hay por encima de la curva de ruptura y corresponde a la definición del momento cero (μ_0) de la misma (Martínez *et al.*, 1991). Así, la capacidad de la resina es proporcional al producto del momento cero, el caudal y la concentración de entrada. Por ello definimos el factor de capacidad como:

$$F. C. = \mu_0 \cdot Q \cdot C_0 \quad [6.8]$$

Los valores del factor de capacidad calculados para los experimentos de adsorción en las resinas de interacción hidrofóbica e intercambio iónico se muestran en las tablas 6.25 y 6.26 respectivamente.

Tabla 6.25: Factores de capacidad para los experimentos en lecho fijo con la resina de HIC.

| C_0 [mg/ml] | Q [ml/min] | T [°C] | L [mm] | dp [mm] | F.C. [mg] |
|---------------|--------------|----------|----------|-----------|-----------|
| 0.5 | 0.25 | 20 | 25.5 | 0.41 | 1.05 |
| 0.5 | 0.50 | 20 | 25.5 | 0.41 | 1.01 |
| 0.5 | 1.00 | 20 | 25.5 | 0.41 | 0.97 |
| 1.0 | 0.25 | 20 | 25.5 | 0.41 | 1.92 |
| 1.0 | 0.50 | 20 | 25.5 | 0.41 | 1.73 |
| 1.0 | 1.0 | 20 | 25.5 | 0.41 | 1.87 |
| 2.5 | 0.25 | 20 | 25.5 | 0.41 | 4.15 |
| 2.5 | 0.50 | 20 | 25.5 | 0.41 | 3.95 |
| 2.5 | 1.00 | 20 | 25.5 | 0.41 | 3.70 |
| 1.0 | 0.50 | 4 | 25.5 | 0.41 | 1.73 |
| 1.0 | 0.50 | 30 | 25.5 | 0.41 | 2.00 |
| 1.0 | 0.50 | 20 | 25.0 | 0.65 | 1.85 |
| 1.0 | 0.50 | 20 | 32.0 | 0.26 | 2.79 |
| 0.5 | 0.50 | 20 | 1.28 | 0.41 | 1.10 |

Tabla 6.26: Factores de capacidad para los experimentos en lecho fijo con la resina de IEC.

| C_0 [mg/ml] | Q [ml/min] | T [°C] | L [mm] | dp [mm] | F.C. [mg] |
|---------------|------------|--------|--------|---------|-----------|
| 0.5 | 0.25 | 25 | 31.0 | 0.41 | 2.94 |
| 0.5 | 0.50 | 25 | 31.0 | 0.41 | 2.80 |
| 0.5 | 1.00 | 25 | 31.0 | 0.41 | 2.01 |
| 1.0 | 0.25 | 25 | 31.0 | 0.41 | 7.67 |
| 1.0 | 0.50 | 25 | 31.0 | 0.41 | 5.89 |
| 1.0 | 1.0 | 25 | 31.0 | 0.41 | 3.95 |
| 2.5 | 0.25 | 25 | 31.0 | 0.41 | 7.78 |
| 2.5 | 0.50 | 25 | 31.0 | 0.41 | 8.53 |
| 2.5 | 1.00 | 25 | 31.0 | 0.41 | 7.23 |
| 0.5 | 0.50 | 20 | 31.0 | 0.41 | 2.54 |
| 0.5 | 0.50 | 30 | 31.0 | 0.41 | 3.02 |
| 1.0 | 0.50 | 25 | 32.0 | 0.65 | 6.77 |
| 1.0 | 0.50 | 25 | 32.0 | 0.26 | 10.22 |
| 0.5 | 0.50 | 20 | 15.5 | 0.41 | 1.22 |

Efecto del caudal

De acuerdo con los resultados experimentales obtenidos (figuras 6.32 y 6.33), se observa que la pendiente de las curvas experimentales, tras la ruptura del lecho, es mayor a medida que aumenta el caudal de alimentación a la columna. En el caso de la adsorción de α -amilasa sobre la resina de IEC, esta situación se presenta más acusada que en el caso de la adsorción sobre la resina de HIC. Debido a que el volumen de fase móvil necesaria para saturar el lecho es similar para los diferentes caudales utilizados, a igualdad del resto de las condiciones de operación, el tiempo de saturación de la columna disminuye al aumentar el caudal.

De esta forma, para cada valor de la concentración de entrada, el factor de capacidad disminuye según aumenta el caudal (tablas 6.25 y 6.26). Este fenómeno puede deberse a que la cinética de adsorción está controlada por los procesos de difusión de la α -amilasa desde el seno de la fase móvil hasta el interior de las partículas. En esta situación, la utilización de caudales crecientes puede conducir a que, en una sección transversal de la columna, no todas las moléculas de adsorbato tengan el tiempo de residencia suficiente como para permitir que se difundan hacia el interior de las partículas de adsorbente, disminuyendo la eficacia y la capacidad del proceso de adsorción.

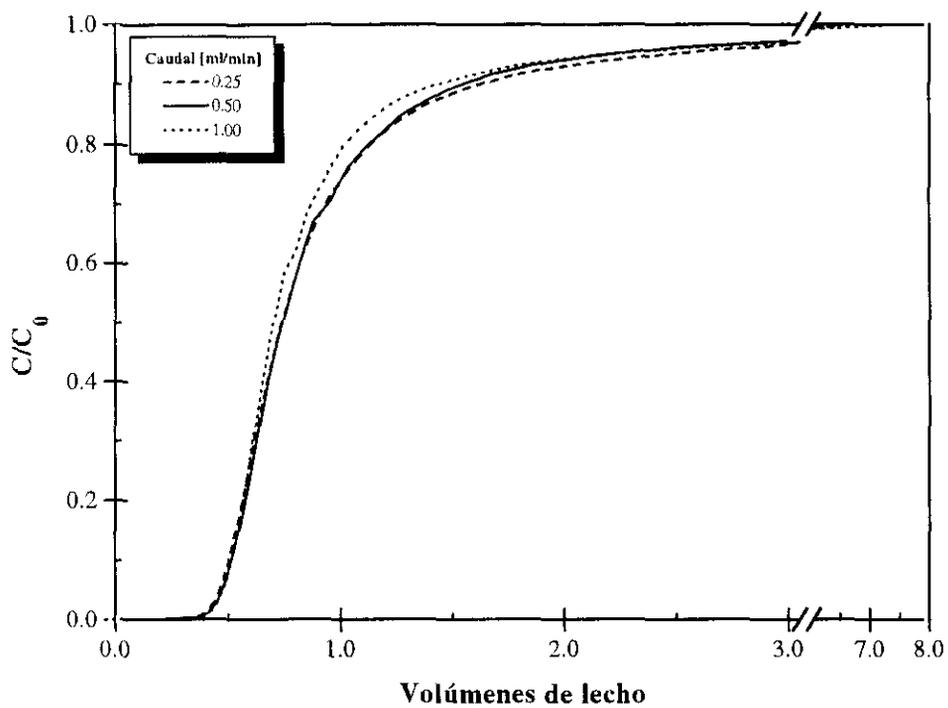


Figura 6.32: Efecto del caudal sobre las curvas de ruptura correspondientes a la columna de HIC para una concentración de entrada de 1.00 mg/ml a 20.0 °C.

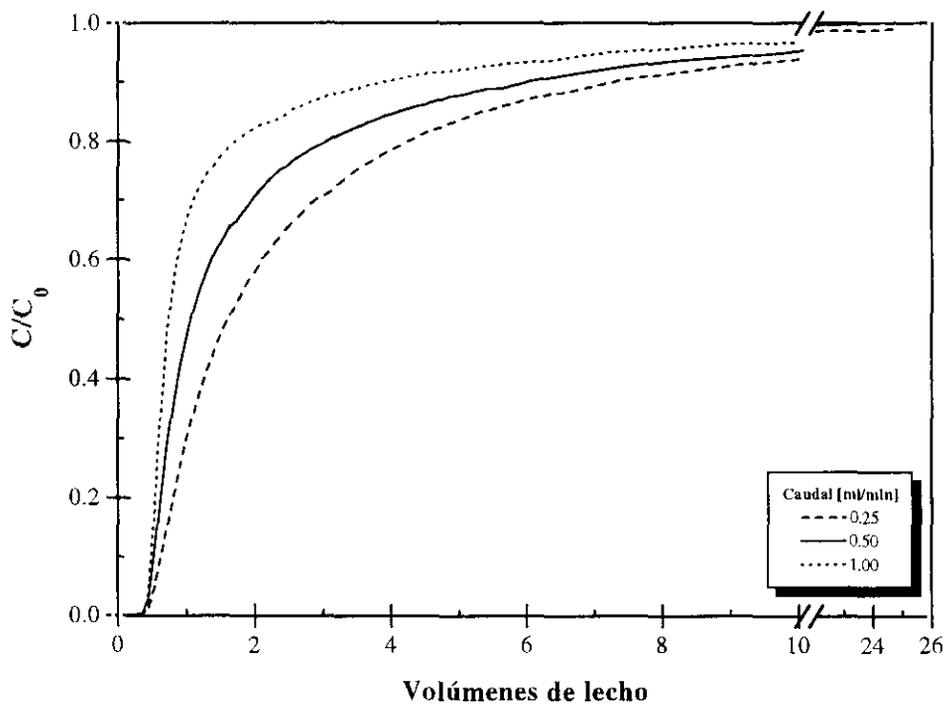


Figura 6.33: Efecto del caudal sobre las curvas de ruptura correspondientes a la columna de IEC para una concentración de entrada de 1.00 mg/ml a 25.0 °C.

Los dos comportamientos comentados (mayor capacidad a caudales bajos y menor tiempo necesario para la adsorción a caudales altos) deberán tenerse en cuenta a la hora de la optimización del proceso con el fin de elegir el caudal más adecuado para el sistema utilizado. Para ello se deberán considerar los costes de operación derivados del tiempo consumido por el proceso, el valor del producto purificado así como la estabilidad en función del tiempo que presente la enzima en las condiciones en las que se lleve a cabo la purificación

Efecto de la concentración

Como puede observarse en las figuras 6.34 y 6.35, el aumento de la concentración de α -amilasa en la disolución de alimentación a la columna afecta a la forma de las curvas de ruptura experimentales. Para ambos adsorbentes, se comprueba que las curvas correspondientes a los experimentos de mayor concentración tienen una pendiente más acusada, alcanzando la saturación del lecho a tiempos inferiores que los correspondientes a experimentos de concentración inferior.

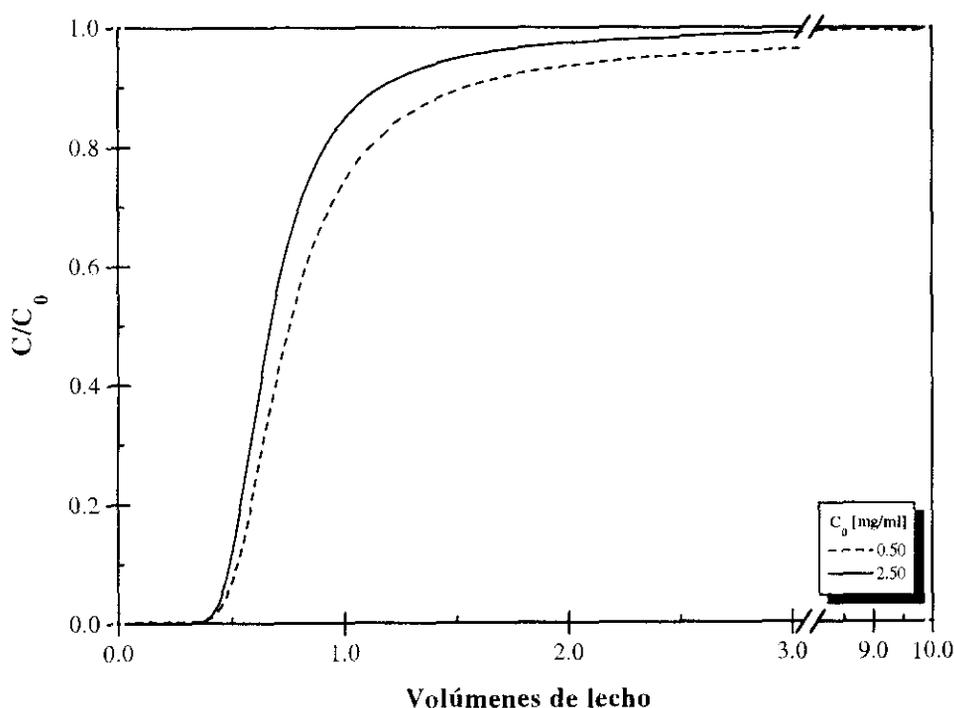


Figura 6.34: Efecto de la concentración de alimentación sobre las curvas de ruptura correspondientes a la columna de HIC para un caudal de 0.50 ml/min a 20.0 °C.

Estos efectos, relacionados entre sí, se deben a que la diferencia entre la concentración de α -amilasa en la fase móvil y la concentración de dicha enzima en el interior de los poros no saturados es mayor cuanto mayor sea la primera. Esto produce un aumento en el flujo de α -amilasa en dirección al interior de los poros de las partículas de adsorbente hasta los sitios de adsorción, alcanzándose más

rápidamente el equilibrio entre ambas fases.

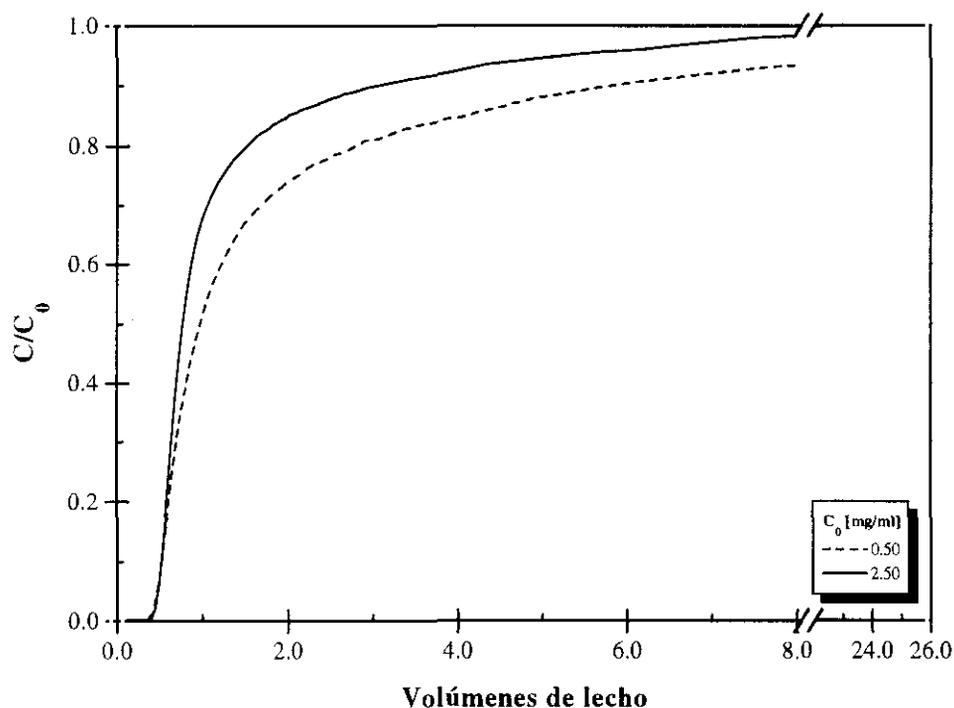


Figura 6.35: Efecto de la concentración de alimentación sobre las curvas de ruptura correspondientes a la columna de IEC para un caudal de 0.50 ml/min a 25.0 °C.

Se ha determinado que, para cada uno de los adsorbentes, el factor de capacidad aumenta (tablas 6.25 y 6.26) a medida que lo hace la concentración a la entrada de la columna. De acuerdo con la isoterma de adsorción, en el equilibrio, la cantidad de α -amilasa retenida en la resina aumenta (hasta alcanzar el valor de saturación) con la concentración de la enzima en la fase fluida del interior de los poros.

Efecto de la temperatura

La influencia de la temperatura en el equilibrio de adsorción de α -amilasa en las resinas de HIC e IEC se ha establecido mediante la determinación de las isotermas de adsorción. Según estas, para la resina de intercambio iónico, la cantidad de α -amilasa adsorbida en equilibrio con una determinada concentración de la misma en la fase fluida aumenta con la temperatura. Esta situación se corresponde con los resultados experimentales obtenidos a diferentes temperaturas para la resina de IEC (figura 6.36) donde el factor de capacidad (tabla 6.26) aumenta con la temperatura.

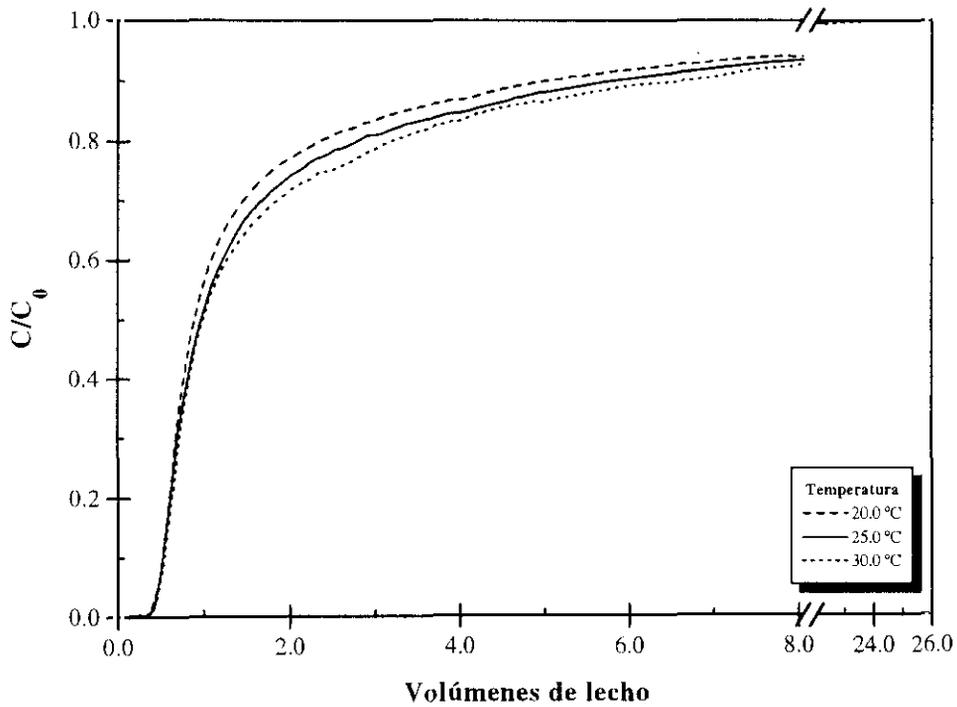


Figura 6.36: Efecto de la temperatura sobre las curvas de ruptura correspondientes a la columna de IEC para un caudal de 0.50 ml/min y una concentración de 0.50 mg/ml a 25.0 °C.

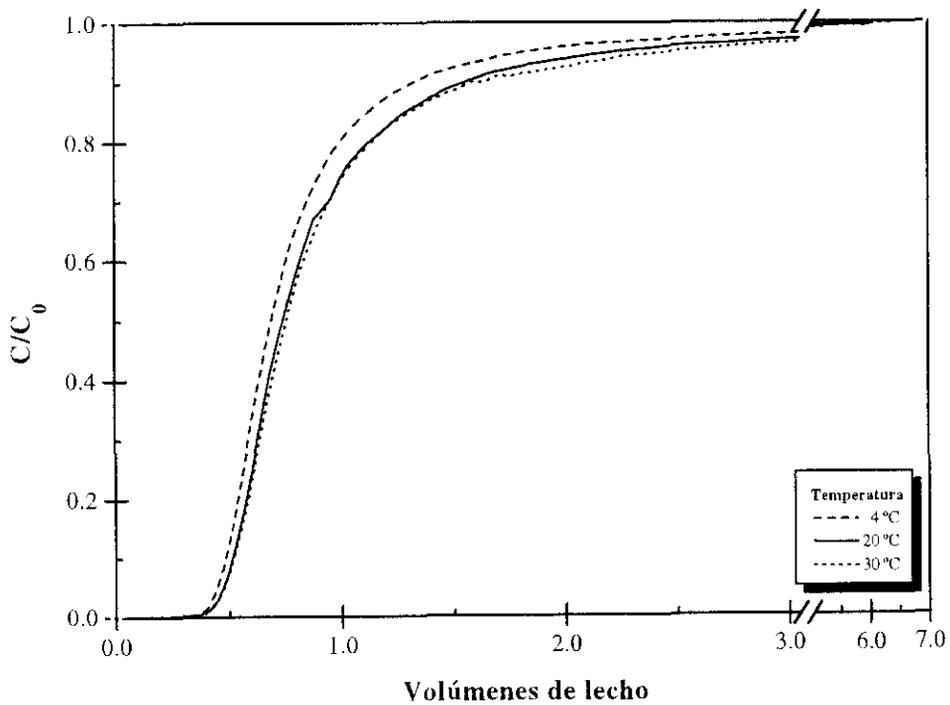


Figura 6.37: Efecto de la temperatura sobre las curvas de ruptura correspondientes a la columna de HIC para un caudal de 0.50 ml/min y una concentración de 1.00 mg/ml a 20.0 °C.

En el caso del equilibrio de adsorción de α -amilasa sobre la resina de HIC, la temperatura tiene el efecto contrario, es decir, la cantidad de enzima adsorbida aumenta al disminuir la temperatura. A partir de los experimentos correspondientes a diferentes temperaturas (figura 6.37), se determina el factor de capacidad (tabla 6.25) para cada uno de ellos, observando que el mayor valor se obtiene para el experimento desarrollado a una temperatura mayor. Esto se debe a la existencia de efectos negativos para la cinética de adsorción a medida que la temperatura disminuye. Al reducir la temperatura, la viscosidad de la fase móvil aumenta, por lo que el coeficiente de transferencia de materia externo disminuye (Wilson y Geankoplis, 1966), reduciéndose el flujo de α -amilasa que pasa al interior de las partículas de adsorbente a través de la capa límite externa que rodea a las mismas. Por otro lado, el coeficiente de difusividad molecular, definido por la ecuación de Polson (ecuación 2.4), es directamente proporcional a la temperatura e inversamente proporcional a la viscosidad de la fase fluida, lo cual conduce a valores decrecientes de D_{AB} al disminuir la temperatura.

Efecto del tamaño de partícula

La variación del coeficiente de materia externo con el diámetro de partícula viene determinada por la correlación de Wilson y Geankoplis (1966), la cual predice que, para un lecho fijo y a una determinada velocidad del fluido, el valor de k_f es proporcional a $dp^{-2/3}$, por lo que al disminuir este, el valor de aquel aumenta. Debido a ello, a igualdad del resto de las variables de operación, las curvas de ruptura correspondientes a lechos empacados con partículas de menor tamaño tendrán pendientes mayores tras el punto de ruptura, alcanzando más rápidamente la saturación.

Como puede observarse (figuras 6.38 y 6.39), para ambas resinas, el comportamiento de las curvas de ruptura obtenidas experimentalmente difiere del descrito anteriormente. La porosidad del lecho no se mantiene constante para los tres tamaños de partícula, ya que para una misma cantidad de resina, cada uno alcanza diferentes longitudes en columnas de igual diámetro. Por esta razón no se da la condición del mantenimiento del resto de los parámetros constante.

Por otro lado, el factor de capacidad aumenta al disminuir el tamaño medio de las partículas de adsorbente en el caso de ambas resinas. Al reducir el diámetro de las partículas, la variación del área superficial de la resina no varía significativamente (Smith, 1981), sin embargo, el camino que las moléculas de α -amilasa tienen que recorrer por el interior de los poros disminuye. Como ya se ha descrito (ver apartado 1.1.1), la molécula de α -amilasa puede considerarse como un elipsoide de dimensiones 80 x 45 x 35 Å. Así, se ha determinado la relación entre su tamaño y el diámetro medio de poro para la ambas resinas, obteniendo los valores que se muestran en la tabla 6.27.

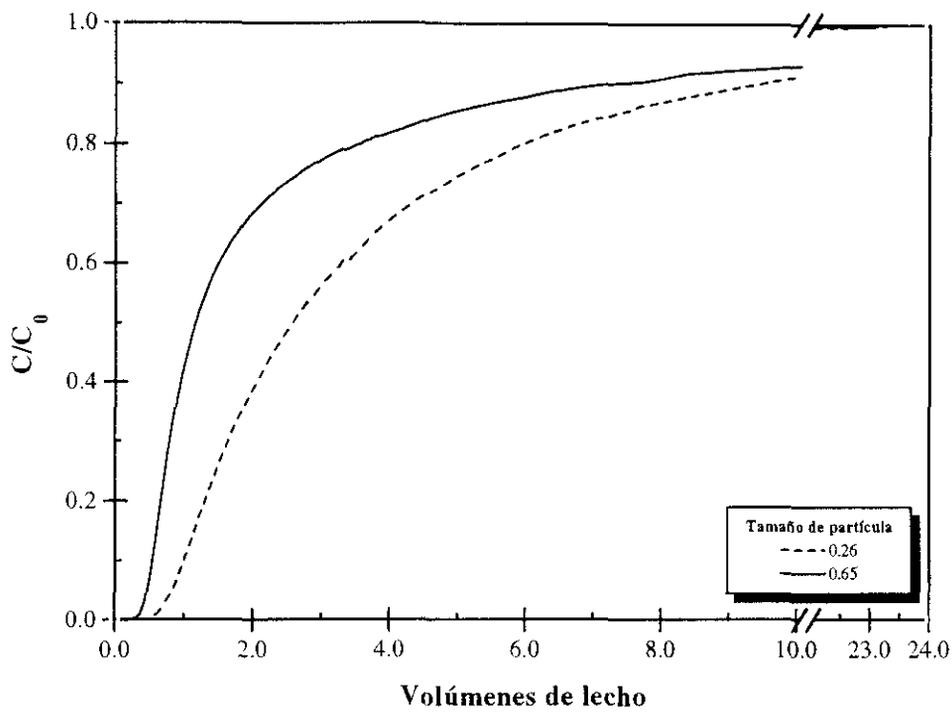


Figura 6.38: Efecto del tamaño de partícula sobre las curvas de ruptura correspondientes a la columna de HIC para un caudal de 0.50 ml/min y una concentración de 1.00 mg/ml a 20.0 °C.

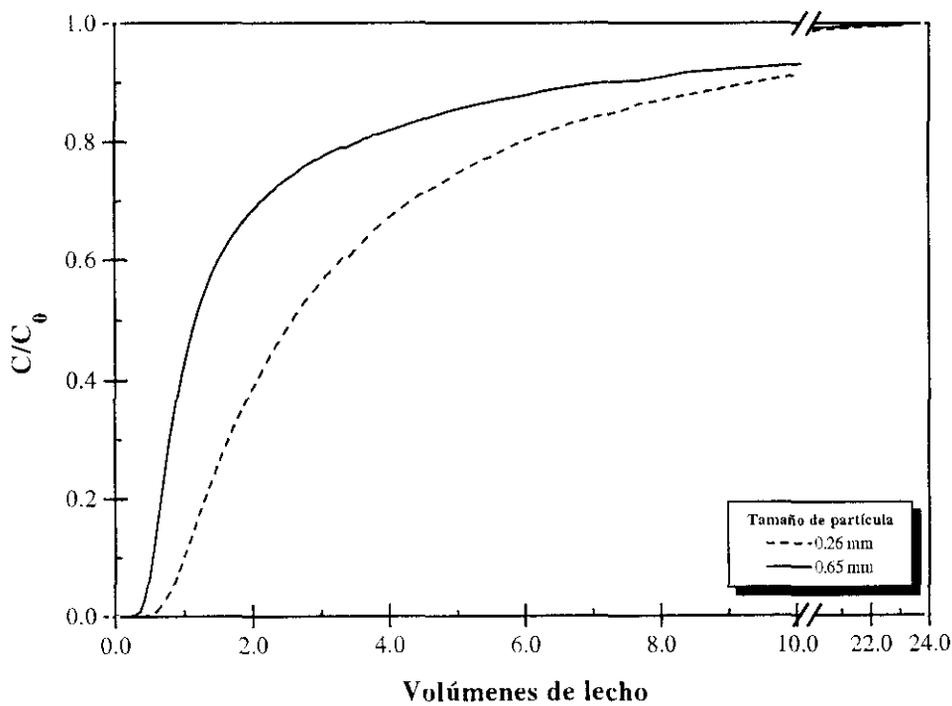


Figura 6.39: Efecto del tamaño de partícula sobre las curvas de ruptura correspondientes a la columna de IEC para un caudal de 0.50 ml/min y una concentración de 1.00 mg/ml a 25.0 °C.

Estos valores, relativamente elevados, aumentan en gran medida para la fracción significativa de poros cuyo diámetro es inferior al tamaño medio determinado (ver apartado 4.4.2) para cada uno de los adsorbentes. Por ello, las moléculas de α -amilasa que queden adsorbidas en las zonas de un poro más cercanas al exterior, podrán bloquear el paso, de forma que en el caso de utilizar tamaños de partícula mayor, el volumen de poro inaccesible será también mayor debido a que la longitud de los poros también lo es.

Tabla 6.27: Relación entre el tamaño de la α -amilasa (ϕ_{aa}) y el tamaño medio de poro (ϕ_p).

| | ϕ_p [nm] | ϕ_{aa}/ϕ_p ^{††} |
|------------|---------------|----------------------------------|
| HIC | 23.0 | 0.15 - 0.35 |
| IEC | 28.5 | 0.12 - 0.28 |

Efecto de la altura de lecho

En los dos sistemas de adsorción estudiados, a medida que la longitud de lecho disminuye, la pendiente de la curva de ruptura aumenta ligeramente, saturándose antes el lecho. En la figura 6.40 se muestra la influencia de la altura de lecho en la adsorción de α -amilasa en resina de intercambio iónico para columnas de igual diámetro interno y tamaño de partícula.

Este efecto está causado porque las pequeñas irregularidades existentes en el empaquetamiento de ambas resinas, suman una mayor cantidad en la columna de mayor longitud, aumentando el efecto de mezcla y desviándose más del flujo pistón ideal. Por ello, la curva de ruptura correspondiente al lecho de mayor longitud se ensancha, aumentando el tiempo total de saturación y disminuyendo la capacidad de la resina en el punto de ruptura (Johnston *et al.*, 1991).

Sin embargo, el factor de capacidad por unidad de masa de resina en el equilibrio es similar para ambas columnas (tablas 6.25 y 6.26), no alterándose el equilibrio por la variación de la longitud de la columna.

^{††} Calculados para las dimensiones menor y mayor, respectivamente, de la molécula de α -amilasa.

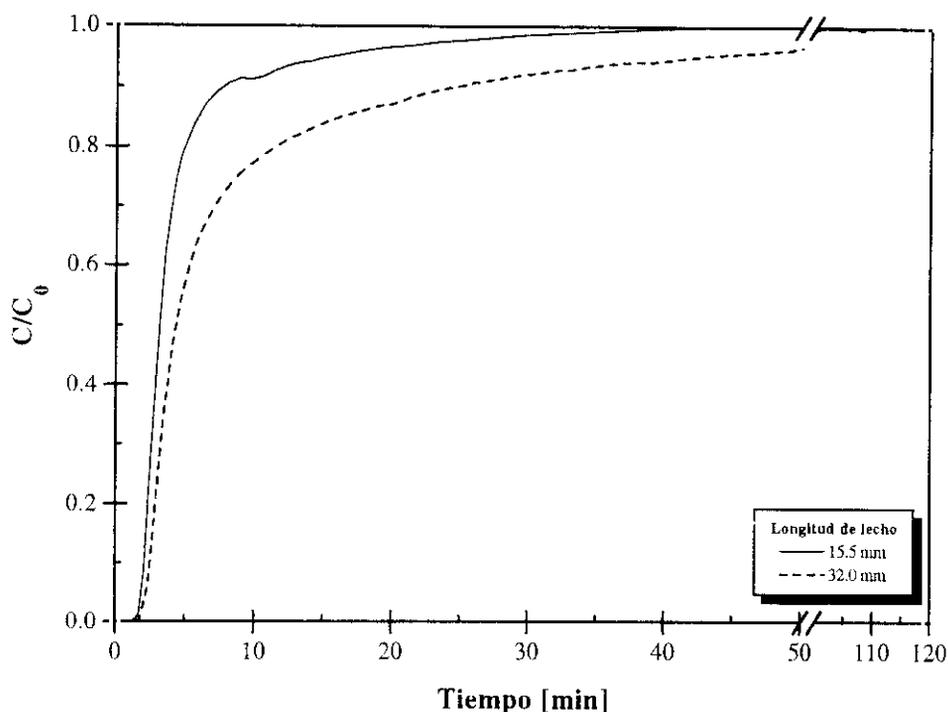


Figura 6.40: Efecto de la longitud de lecho sobre las curvas de ruptura correspondientes a la columna de IEC para un caudal de 0.50 ml/min y una concentración de 0.50 mg/ml a 20.0 °C.

6.4.3.- Estabilidad y reutilización de la columna

Generalmente, en los procesos de purificación a escala industrial se cuenta con dos o más columnas operando en paralelo. De esta manera, una de las columnas se encontrará en operación de adsorción hasta que el adsorbente haya alcanzado el nivel de saturación fijado como óptimo. En ese momento, la corriente de entrada pasa a alimentar a la otra columna, comenzando en la primera la operación de desorción para recoger la proteína purificada. Con el objetivo de conocer el comportamiento a largo plazo de cada uno de los adsorbentes, se han realizado ciclos de adsorción-desorción simulando el comportamiento real de una operación continuada. Posteriormente, se ha evaluado el factor de capacidad para cada uno de los ciclos con el fin de cuantificar la variación de la cantidad adsorbida en cada uno de ellos. Las condiciones de operación de los experimentos realizados se muestran en la tabla 6.23.

En las figuras 6.41 y 6.42 se representan las curvas de adsorción y desorción para las columnas de HIC e IEC respectivamente. En la etapa de desorción se ha utilizado como eluyente el tampón usado en la disolución de adsorción correspondiente.

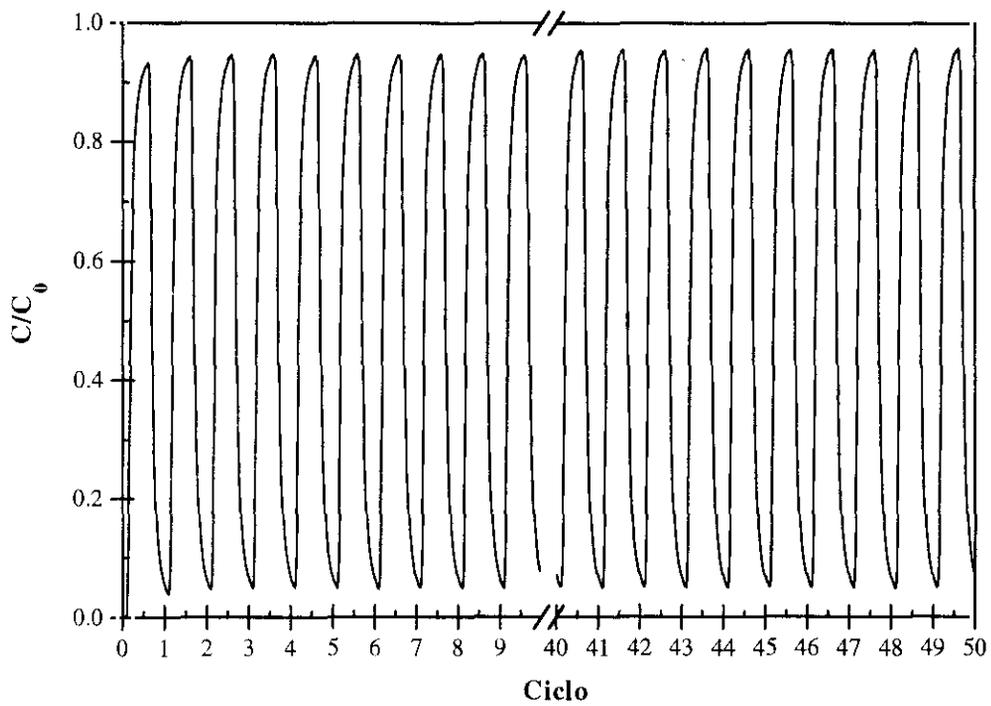


Figura 6.41: Ciclos de adsorción-desorción realizados con la resina de HIC en las siguientes condiciones de operación: $C_0 = 1.0$ mg/ml, $Q = 0.50$ ml/min, $T = 20$ °C.

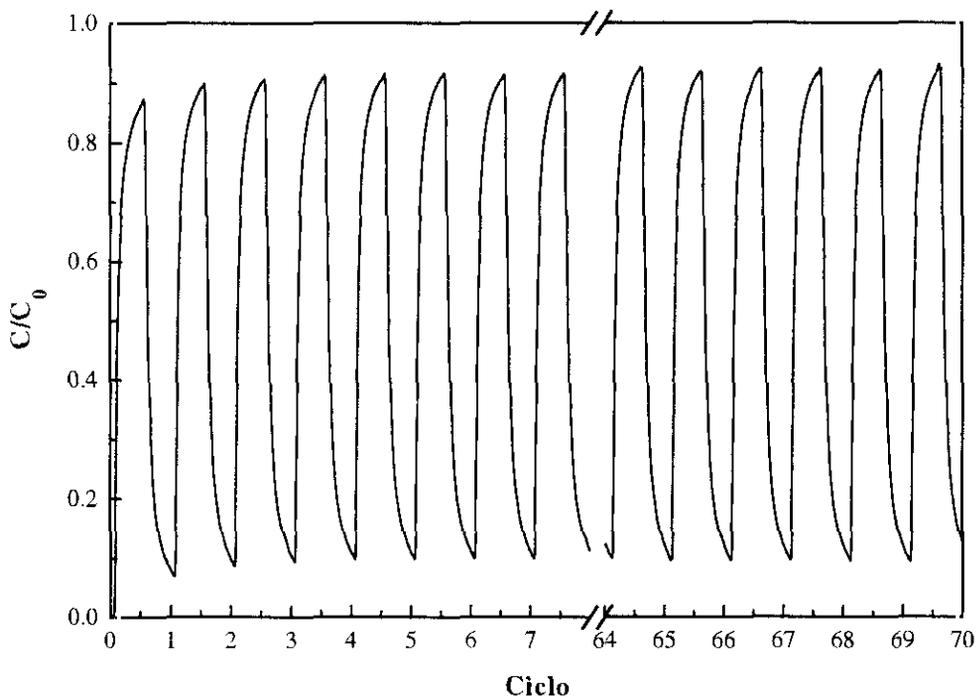


Figura 6.42: Ciclos de adsorción-desorción realizados con la resina de IEC en las siguientes condiciones de operación: $C_0 = 1.0$ mg/ml, $Q = 0.50$ ml/min, $T = 25$ °C.

En ambos casos, la cantidad retenida en el primer ciclo es mayor que en los sucesivos ciclos

debido a que se parte de una columna estabilizada y con ausencia de α -amilasa adsorbida a su superficie. La operación de adsorción-desorción se ha programado de forma que los ciclos tengan la misma duración, alcanzando niveles de saturación de α -amilasa del 90-95% en la adsorción y disminuyendo al 3-5% en la desorción.

A partir del segundo ciclo se observa que las curvas obtenidas coinciden con bastante fidelidad. Para cuantificar la semejanza y el comportamiento de ambas columnas se ha calculado el factor de capacidad para cada una de las etapas de adsorción. Los valores calculados no muestran tendencia a disminuir (o aumentar) con el tiempo de operación y el uso, variando entorno al valor medio con una desviación estándar relativamente baja (tabla 6.28).

La utilización de las mismas condiciones de pH y fuerza iónica en las etapas de adsorción y desorción ha mostrado un comportamiento reversible del proceso. La eficacia de la desorción, sin embargo, aumenta cuando se modifican las condiciones de operación (por ejemplo, aumento de la fuerza iónica en IEC o disminución en HIC) como se ha demostrado en el presente trabajo.

Tabla 6.28: Valor medio del factor de capacidad y desviación estándar para los ciclos de adsorción-desorción.

| | F.C. | σ |
|------------|------|----------|
| HIC | 0.98 | 0.08 |
| IEC | 1.82 | 0.14 |

A partir de estos resultados puede concluirse que ambos adsorbentes son adecuados para ser utilizados a escala industrial por la estabilidad que presentan y por la reversibilidad mostrada tras la aplicación de numerosos ciclos de operación sin que las columnas presenten síntomas de pérdida parcial de capacidad para la adsorción de α -amilasa en las condiciones de operación estudiadas.

6.5.- BIBLIOGRAFÍA

- Arakawa, T. y Timasheff, S.N. (1982). "Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions", *Biochemistry*, **21** (25), 6545-6552
- Bautista, L.F.; Soriano, R.; Martínez, M. y Aracil, J. (1997). "Comparative study of the adsorption of α -amylase for HIC and IEC using the HPLC technique", *LC-GC Int.*, **10** (7), 431-434
- El Rassi, Z. y Horváth, C. (1986). "Hydrophobic interaction chromatography of t-RNA's and proteins", *J. Liq. Chromatogr.*, **9** (15), 3245-3268

- Fausnaugh, J.L. y Regnier, F.E. (1986). "Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins", *J. Chromatogr.*, **359**, 131-146
- Horváth, C.; Melander, W.R. y Molnar, I.J. (1976). *J. Chromatogr.*, **125**, 129.
- Johns, D. (1989). "Columns for HPLC separation of macromolecules", en: *HPLC of macromolecules: a practical approach* (R.A.W. Oliver Ed.), IRL Press, Oxford
- Johnston, A.; Mao, Q.M. y Hearn, M.T.W. (1991). "High-performance liquid chromatography of aminoacids, peptides and proteins. CXII. Analysis of operating parameters affecting the breakthrough curves in fixed-bed chromatography of proteins using several mathematical models.", *J. Chromatogr.*, **548**, 127-145
- Katti, A.; Maa, Y.F. y Horváth, C. (1987). "Protein surface area and retention in hydrophobic interaction chromatography", *Chromatographia*, **24**, 646-650
- Kopaciewicz, M.A.R.; Fausnaugh, J. y Regnier, F.E. (1983). "Retention model for high-performance ion-exchange chromatography", *J. Chromatogr.*, **266**, 3-21
- Martínez, M.; Casillas, J.L.; Aracil, J. y Addo-Yobo, F. (1991). "Purification of bioproducts using modified resins. Discrimination of adsorbents evaluating breakthrough curves with the method of moments", en: *Upstream and downstream processing in biotechnology III*, Technologisch Instituut - K VIV, Mechanical Separation & Particle technology (Eds.), vol. 16, 3.45-3.51.
- Melander, W. y Horváth, C. (1977). "Effect of neutral salts on the formation and dissociation of protein aggregates", *J. Solid Phase Biochem.*, **2** (2), 141-161
- Melander, W.R.; Corradini, D. y Horváth, C. (1984). "Salt-mediated retention of proteins in hydrophobic-interaction chromatography. Application of solvophobic theory", *J. Chromatogr.*, **317**, 67-85
- Melander, W.R.; El Rassi, Z. y Horváth, C. (1989). "Interplay of hydrophobic and electrostatic interactions in biopolymer chromatography. Effect of salts on the retention of proteins", *J. Chromatogr.*, **469**, 3-27
- Sinanoglu, O. (1968), en: *Molecular Associations in biology* (B. Pullman Ed.), Academic Press, Nueva York
- Sinanoglu, O. y Abdunur, S. (1965). "Effect of water and other solvents on the structure of biopolymers", *Fed. Procc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **24** (2, part III), S12-S23
- Smith, J.M. (1981), en: *Chemical Engineering Kinetics* (3ª ed.), McGraw-Hill, Tokio
- Szepeszy, L. y Horváth, C. (1988). "Specific salt effects in hydrophobic interaction chromatography

of proteins”, *Chromatographia*, **26**, 13-18

- Velayudhan, A. y Horváth, C. (1988). “Preparative chromatography of proteins. Analysis of the multivalent ion- exchange formalism”, *J. Chromatogr.*, **443**, 13-29
- Wilson, E.J. y Geankoplis, C.J. (1966). “Liquid mass transfer at very low Reynolds numbers in packed beds”, *Ind. Eng. Chem., Fundam.*, **5** (1), 9-14

7. MODELADO MATEMÁTICO

7.1.- ADSORCIÓN EN TANQUE AGITADO DISCONTINUO

Una vez que se han obtenido experimentalmente las curvas cinéticas de adsorción, correspondientes a los sistemas α -amilasa/HIC y α -amilasa/IEC, los datos de aquellás se ajustan al modelo matemático propuesto en el apartado 3.3.2.

Los resultados del ajuste para cada uno de los experimentos se muestran en las tablas 7.1 y 7.2, en las que se incluyen, junto con las variables de operación, los valores del coeficiente de difusión en los poros (D_p), del factor de tortuosidad (τ) calculado mediante la ecuación 2.7 y de la función objetivo utilizada en la optimación del ajuste (Φ) y descrita en la ecuación A.16 del anexo A.

A la vista de los resultados, se observa que la temperatura influye en el valor de D_p , aumentando para valores crecientes de aquella, para el caso de ambos adsorbentes, de acuerdo con lo previsto por la teoría de Stokes-Einstein para la difusión molecular (Álvarez *et al.*, 1982).

Por otra parte, se observa que existe variabilidad en los valores de D_p calculados para cada concentración inicial a una temperatura determinada. Esta es mayor en el caso de la adsorción sobre la

resina de IEC. Los valores del coeficiente de difusión en los poros correspondientes a la concentración inferior (0.10 mg/ml) se alejan de los obtenidos para las otras dos concentraciones. Esto puede ser debido al error en la estimación de la isoterma de adsorción a bajas concentraciones, según se ha comentado en el apartado 6.3.2.

Tabla 7.1: Resultados del modelado matemático de la adsorción de α -amilasa en la resina de HIC (Duolite XAD-761) en tanque agitado discontinuo.

| T [°C] | C ₀ [mg/ml] | D _p [m ² /s] | τ | Φ |
|--------|------------------------|------------------------------------|--------|----------------------|
| 4 | 0.10 | $2.32 \cdot 10^{-11}$ | 1.9 | $2.72 \cdot 10^{-3}$ |
| | 0.25 | $1.50 \cdot 10^{-11}$ | 3.0 | $1.29 \cdot 10^{-4}$ |
| | 0.50 | $1.32 \cdot 10^{-11}$ | 3.4 | $1.29 \cdot 10^{-4}$ |
| 20 | 0.10 | $3.72 \cdot 10^{-11}$ | 2.0 | $1.22 \cdot 10^{-3}$ |
| | 0.25 | $1.76 \cdot 10^{-11}$ | 4.2 | $3.15 \cdot 10^{-4}$ |
| | 0.50 | $1.52 \cdot 10^{-11}$ | 4.8 | $3.85 \cdot 10^{-5}$ |
| 30 | 0.10 | $1.10 \cdot 10^{-11}$ | 8.7 | $9.13 \cdot 10^{-4}$ |
| | 0.25 | $2.15 \cdot 10^{-11}$ | 4.4 | $1.21 \cdot 10^{-4}$ |
| | 0.50 | $2.11 \cdot 10^{-11}$ | 4.5 | $1.24 \cdot 10^{-5}$ |

Tabla 7.2: Resultados del modelado matemático de la adsorción de α -amilasa en la resina de IEC (Duolite A-568) en tanque agitado discontinuo.

| T [°C] | C ₀ [mg/ml] | D _p [m ² /s] | τ | Φ |
|--------|------------------------|------------------------------------|--------|----------------------|
| 20 | 0.10 | $5.20 \cdot 10^{-11}$ | 1.4 | $2.08 \cdot 10^{-3}$ |
| | 0.25 | $2.21 \cdot 10^{-11}$ | 3.3 | $7.04 \cdot 10^{-4}$ |
| | 1.00 | $2.08 \cdot 10^{-11}$ | 2.6 | $2.29 \cdot 10^{-5}$ |
| 25 | 0.10 | $6.02 \cdot 10^{-11}$ | 1.4 | $1.86 \cdot 10^{-3}$ |
| | 0.25 | $2.41 \cdot 10^{-11}$ | 3.5 | $3.71 \cdot 10^{-4}$ |
| | 1.00 | $2.55 \cdot 10^{-11}$ | 3.3 | $1.60 \cdot 10^{-5}$ |
| 30 | 0.10 | $7.41 \cdot 10^{-11}$ | 1.3 | $6.01 \cdot 10^{-3}$ |
| | 0.25 | $2.80 \cdot 10^{-11}$ | 3.4 | $4.15 \cdot 10^{-4}$ |
| | 1.00 | $2.75 \cdot 10^{-11}$ | 3.5 | $2.78 \cdot 10^{-5}$ |

Para todas las temperaturas estudiadas, la difusividad de la α -amilasa en la resina de IEC es mayor que en la resina hidrofóbica. Este hecho podría explicarse en términos de las características porosas de ambos adsorbentes. El tamaño medio de poro en las partículas de la resina de intercambio

iónico (28.5 nm) es mayor que el de la hidrofóbica (23.0 nm), facilitando así el transporte de las moléculas de α -amilasa a través de los poros. Además, la mayor resistencia a la transferencia de materia (de α -amilasa) en el interior de la resina de HIC puede estar de acuerdo con una mayor complejidad de la estructura porosa de la misma, caracterizada por el factor de tortuosidad, τ , según se indica en las tablas 7.1 y 7.2. Lo anteriormente comentado, se ve apoyado por los datos de la caracterización de ambas resinas mediante porosimetría de mercurio (ver apartado 4.4.2), en los que se detecta una fracción significativa del volumen de poro de la resina de HIC que corresponde a tamaños inferiores a 20 nm.

En las tablas 7.3 y 7.4 se resumen los valores medios[†] del coeficiente de difusión en los poros y del factor de tortuosidad. Estos serán los utilizados en la simulación de los procesos de adsorción de α -amilasa en las resinas de HIC e IEC y se usarán como valores iniciales en la estimación de los parámetros cinéticos durante la etapa de modelado en lecho fijo.

Tabla 7.3: Valores medios resultado del modelado matemático para la adsorción de α -amilasa en la resina de HIC en tanque agitado.

| T [°C] | D_p [m^2/s] | τ |
|--------|----------------------|--------|
| 4 | $1.4 \cdot 10^{-11}$ | 3.2 |
| 20 | $1.6 \cdot 10^{-11}$ | 4.6 |
| 30 | $2.1 \cdot 10^{-11}$ | 4.5 |

Tabla 7.4: Valores medios resultado del modelado matemático para la adsorción de α -amilasa en la resina de IEC en tanque agitado.

| T [°C] | D_p [m^2/s] | τ |
|--------|----------------------|--------|
| 20 | $2.1 \cdot 10^{-11}$ | 3.5 |
| 25 | $2.5 \cdot 10^{-11}$ | 3.4 |
| 30 | $2.8 \cdot 10^{-11}$ | 3.4 |

Estos valores del coeficiente de difusión en los poros son del mismo orden que los obtenidos para la difusión de proteínas en resinas macroporosas, pese a la escasez de datos experimentales sobre la materia. Se ha descrito unos valores de la difusividad efectiva de la insulina en el interior de los poros de resinas sintéticas hidrofóbicas de $2.6 - 3.4 \cdot 10^{-11} m^2/s$ (Firouztale *et al.*, 1992) y, para el caso de seroalbúmina bovina en resinas de intercambio iónico, de $1.0 - 2.7 \cdot 10^{-11} m^2/s$ (Yoshida *et al.*, 1994)

[†] No se han utilizado los valores correspondientes a los experimentos de concentración inicial más baja, 0.10 mg/ml.

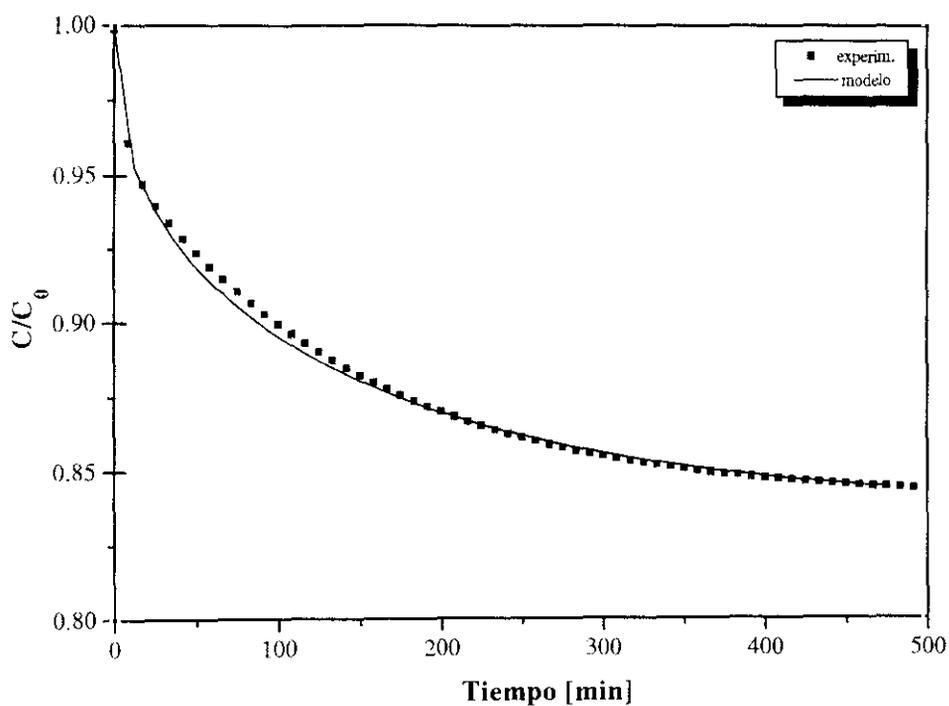


Figura 7.1: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 1.50 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 a 4 °C y una concentración inicial de 0.25 mg/ml.

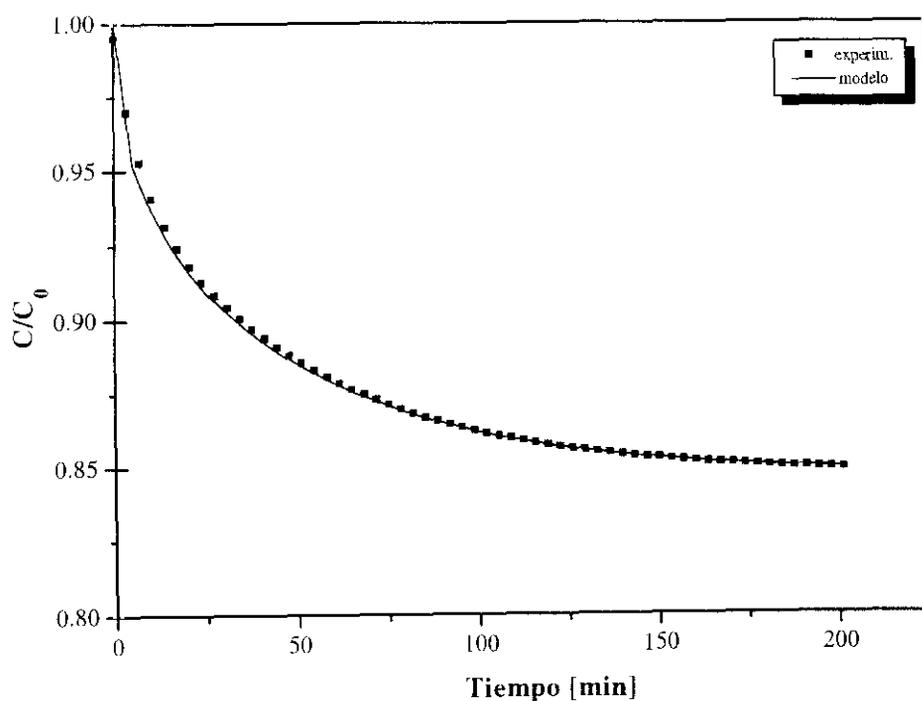


Figura 7.2: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 2.75 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 a 30 °C y una concentración inicial de 1.00 mg/ml.

La bondad del ajuste puede comprobarse en las figuras 7.1 y 7.2, en las que se muestran la curva predicha por el modelo junto con la correspondiente al experimento realizado en las mismas condiciones de operación para las resinas de HIC e IEC respectivamente. El resto de las curvas de ajuste al modelo cinético se encuentran en el anexo C (figuras C.9 a C.24). En la figura C.33 (Anexo A) se muestra, como ejemplo, la representación gráfica de la optimización (minimización) de la función objetivo respecto al valor de D_p utilizado.

7.2.- ADSORCIÓN EN LECHO FIJO

Cada una de las curvas de ruptura obtenidas en los experimentos de adsorción de α -amilasa sobre las resinas de HIC e IEC en lecho fijo se han ajustado al modelo matemático, para esta operación, propuesto en el apartado 3.3.3. Los valores del coeficiente de difusión en los poros (D_p) y de transferencia de materia externo (k_f) se han determinado mediante optimización de dichos parámetros a partir de la metodología descrita en el apartado A.3 del anexo A.

Tabla 7.5: Parámetros cinéticos y condiciones experimentales para la adsorción de α -amilasa en un lecho fijo sobre resina de HIC.

| C_0 [mg/ml] | Q [ml/min] | T [°C] | D_p [m^2/s] | k_f [m/s] | Error [%] |
|---------------|--------------|----------|----------------------|---------------------|-----------|
| 0.5 | 0.25 | 20 | $1.3 \cdot 10^{-11}$ | $5.4 \cdot 10^{-6}$ | 5.6 |
| 0.5 | 0.50 | 20 | $1.8 \cdot 10^{-11}$ | $8.9 \cdot 10^{-6}$ | 5.8 |
| 0.5 | 1.00 | 20 | $1.8 \cdot 10^{-11}$ | $1.3 \cdot 10^{-5}$ | 9.8 |
| 1.0 | 0.25 | 20 | $1.8 \cdot 10^{-11}$ | $2.7 \cdot 10^{-6}$ | 4.4 |
| 1.0 | 0.50 | 20 | $2.0 \cdot 10^{-11}$ | $9.0 \cdot 10^{-6}$ | 3.6 |
| 1.0 | 1.00 | 20 | $1.9 \cdot 10^{-11}$ | $1.7 \cdot 10^{-5}$ | 5.3 |
| 2.5 | 0.25 | 20 | $2.0 \cdot 10^{-11}$ | $2.8 \cdot 10^{-6}$ | 1.7 |
| 2.5 | 0.50 | 20 | $2.0 \cdot 10^{-11}$ | $8.1 \cdot 10^{-6}$ | -1.7 |
| 2.5 | 1.00 | 20 | $2.8 \cdot 10^{-11}$ | $1.8 \cdot 10^{-5}$ | -2.7 |
| 1.0 | 0.50 | 4 | $1.5 \cdot 10^{-11}$ | $7.1 \cdot 10^{-6}$ | 2.4 |
| 1.0 | 0.50 | 30 | $2.4 \cdot 10^{-11}$ | $9.2 \cdot 10^{-6}$ | -1.8 |

En las tablas 7.5 y 7.6 se muestran los resultados obtenidos de D_p y k_f correspondientes a cada uno de los experimentos desarrollados en las condiciones de operación que figuran en dichas tablas, con un tamaño medio de partícula de 0.41 mm para ambos adsorbentes.

Los resultados mostrados en las tablas 7.5 y 7.6 señalan, para ambos adsorbentes, una

tendencia en la que el coeficiente de transferencia de materia externo aumenta con el caudal de la fase móvil. La resistencia al transporte de materia a través de la película externa que rodea a las partículas está caracterizada por el número adimensional de Sherwood, pudiendo correlacionarse este en función de los números de Reynolds y Schmit (Wilson y Geankoplis, 1966; Wakao y Funazkri, 1978). A partir de estas correlaciones se deduce un aumento del número de Sherwood con la velocidad de la fase móvil en un lecho fijo y por tanto, una disminución de la resistencia a la transferencia de materia externa, lo cual se observa en los resultados experimentales obtenidos (ver tabla 7.7).

Tabla 7.6: Parámetros cinéticos y condiciones experimentales para la adsorción de α -amilasa en un lecho fijo sobre resina de IEC.

| C_0 [mg/ml] | Q [ml/min] | T [°C] | D_p [m ² /s] | k_f [m/s] | Error [%] |
|---------------|--------------|----------|---------------------------|---------------------|-----------|
| 0.5 | 0.25 | 25 | $1.6 \cdot 10^{-11}$ | $9.9 \cdot 10^{-7}$ | 5.2 |
| 0.5 | 0.50 | 25 | $2.0 \cdot 10^{-11}$ | $3.1 \cdot 10^{-6}$ | 8.4 |
| 0.5 | 1.00 | 25 | $1.8 \cdot 10^{-11}$ | $5.1 \cdot 10^{-6}$ | 5.2 |
| 1.0 | 0.25 | 25 | $2.5 \cdot 10^{-11}$ | $1.5 \cdot 10^{-6}$ | 3.4 |
| 1.0 | 0.50 | 25 | $2.6 \cdot 10^{-11}$ | $2.3 \cdot 10^{-6}$ | -0.9 |
| 1.0 | 1.00 | 25 | $3.1 \cdot 10^{-11}$ | $2.5 \cdot 10^{-6}$ | -3.0 |
| 2.5 | 0.25 | 25 | $1.6 \cdot 10^{-11}$ | $6.3 \cdot 10^{-7}$ | 5.6 |
| 2.5 | 0.50 | 25 | $1.9 \cdot 10^{-11}$ | $1.7 \cdot 10^{-6}$ | 8.5 |
| 2.5 | 1.00 | 25 | $1.8 \cdot 10^{-11}$ | $4.1 \cdot 10^{-6}$ | -2.2 |
| 0.5 | 0.50 | 20 | $1.7 \cdot 10^{-11}$ | $1.3 \cdot 10^{-6}$ | 3.1 |
| 0.5 | 0.50 | 30 | $2.5 \cdot 10^{-11}$ | $4.5 \cdot 10^{-6}$ | 2.5 |

Tabla 7.7: Valores medios de k_f en función de la velocidad intersticial del fluido para cada una de las resinas utilizadas.

| v [m/s] | HIC k_f [m/s] | v [m/s] | IEC k_f [m/s] |
|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| $9.83 \cdot 10^{-5}$ | $3.6 \cdot 10^{-6}$ | $9.50 \cdot 10^{-5}$ | $1.0 \cdot 10^{-6}$ |
| $1.97 \cdot 10^{-4}$ | $8.7 \cdot 10^{-6}$ | $1.90 \cdot 10^{-4}$ | $2.4 \cdot 10^{-6}$ |
| $3.93 \cdot 10^{-4}$ | $1.6 \cdot 10^{-5}$ | $3.78 \cdot 10^{-4}$ | $3.9 \cdot 10^{-6}$ |

El valor del coeficiente de difusión en los poros aumenta con la temperatura de acuerdo con los modelos basados en la teoría de Stokes-Einstein que predicen un incremento del coeficiente de difusividad molecular con la temperatura. En las tablas 7.8 y 7.9 se muestran los valores del coeficiente de difusión en los poros y del factor de tortuosidad correspondientes a las temperaturas

estudiadas. El valor medio del factor de tortuosidad para la resina de HIC es 3.6 y para la resina de IEC, 4.0. Los valores de D_p calculados son del mismo orden que los obtenidos para la difusión de otras proteínas (Firouztale *et al.*, 1992; Sridhar *et al.*, 1994; Yoshida *et al.*, 1994) en resinas macroporosas tanto de intercambio iónico como hidrofóbicas.

Tabla 7.8: Valores medios resultado del modelado matemático para la adsorción de α -amilasa en la resina de HIC en lecho fijo.

| T [°C] | D_p [m^2/s] | τ |
|--------|-----------------------------|--------|
| 4 | $1.5 \cdot 10^{-11}$ | 3.0 |
| 20 | $1.9 \cdot 10^{-11\dagger}$ | 3.9 |
| 30 | $2.4 \cdot 10^{-11}$ | 4.0 |

Tabla 7.9: Valores medios resultado del modelado matemático para la adsorción de α -amilasa en la resina de IEC en lecho fijo.

| T [°C] | D_p [m^2/s] | τ |
|--------|-----------------------|--------|
| 20 | $1.7 \cdot 10^{-11}$ | 4.3 |
| 25 | $2.1 \cdot 10^{-11§}$ | 4.0 |
| 30 | $2.5 \cdot 10^{-11}$ | 3.8 |

Con el objetivo de cuantificar la desviación de la curva que predice el modelo respecto a la obtenida experimentalmente se ha calculado el error a partir de los factores de capacidad para la curva de ruptura experimental ($F.C_{exp}$) y teórica obtenida mediante el modelo ($F.C_{teo}$), de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{Error } [\%] = 100 \cdot \frac{F.C_{exp} - F.C_{teo}}{F.C_{exp}} \quad [7.1]$$

Los valores de este parámetro se muestran en la tabla 7.5 para la adsorción de α -amilasa en la resina de HIC y en la tabla 7.6 para la resina de IEC. Se comprueba que los errores son siempre inferiores al 10%, teniendo un valor absoluto medio de 4.1% para el modelado de la adsorción sobre la resina hidrofóbica y del 4.4% para el correspondiente a la de intercambio iónico.

[†] Valor medio de los experimentos realizados a 20 °C

[§] Valor medio de los experimentos realizados a 25 °C

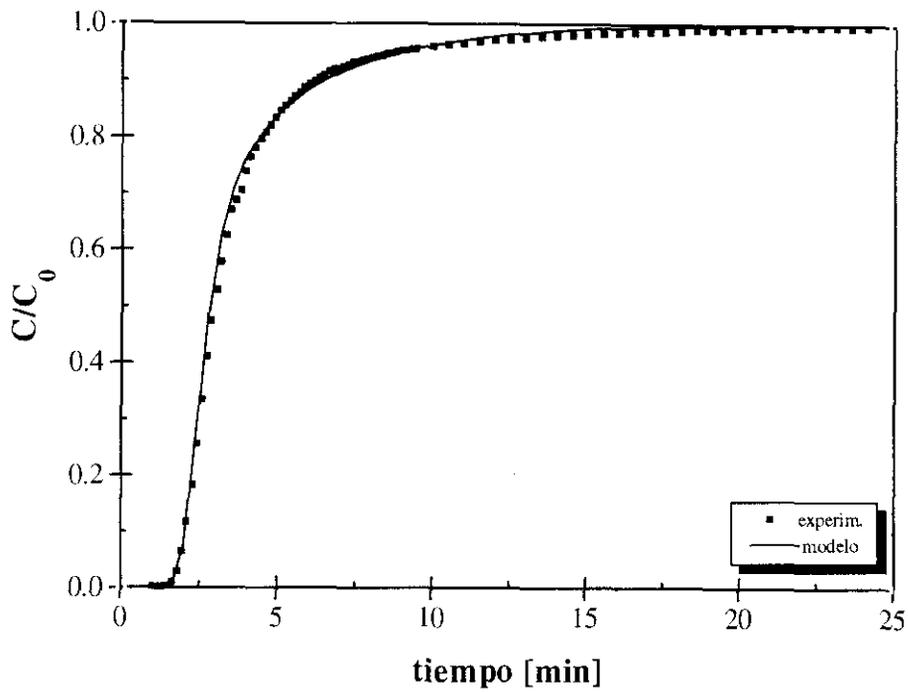


Figura 7.3: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de HIC en las siguientes condiciones: $C_0 = 1.00$ mg/ml; $Q = 0.50$ ml/min; $T = 20$ °C.

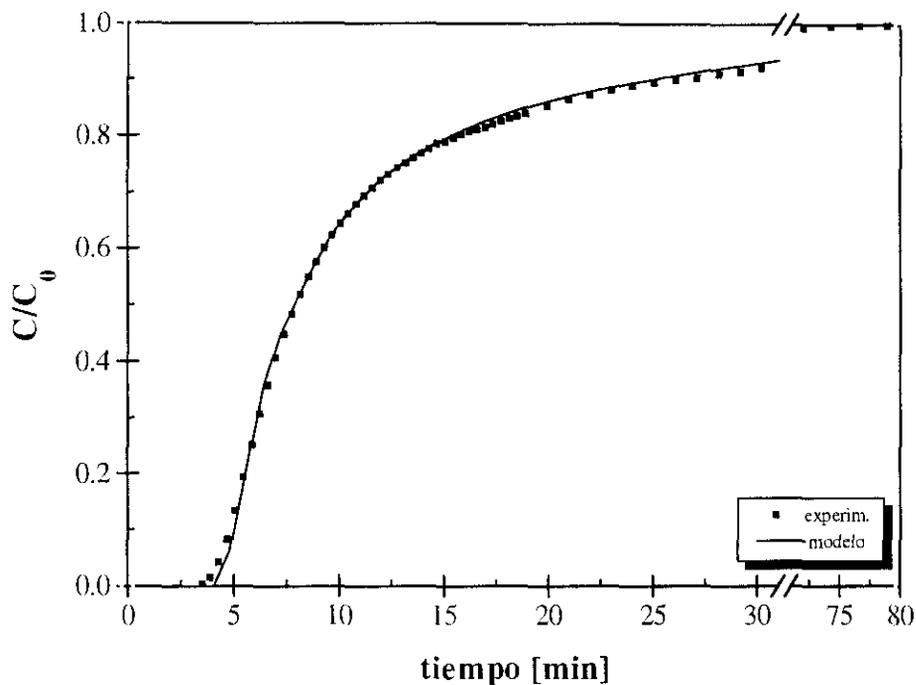


Figura 7.4: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de IEC en las siguientes condiciones: $C_0 = 2.50$ mg/ml; $Q = 0.25$ ml/min; $T = 25$ °C.

Para comprobar la bondad de los ajustes de las curvas de ruptura experimentales al modelo

matemático, a continuación se muestran dos de las gráficas (figuras 7.3 y 7.4) en las que se comparan los datos obtenidos experimentalmente con la curva teórica predicha por el modelo a partir de los valores de D_p y k_f que producen un mejor ajuste. El ajuste se ha realizado mediante la optimización de la función objetivo (Φ) respecto de los dos coeficientes cinéticos mencionados de acuerdo al procedimiento expuesto en el anexo A. El resto de las gráficas comparativas se muestran en el apartado C4 del anexo C (figuras C.34 a C.51).

Los resultados del modelado matemático de la adsorción de α -amilasa sobre las resinas de HIC e IEC para los sistemas de tanque agitado discontinuo y de lecho fijo (tablas 7.3, 7.4, 7.8 y 7.9) muestran un acuerdo satisfactorio. Las diferencias obtenidas, para cada temperatura, son ligeramente más elevadas para el caso de la adsorción sobre la resina de intercambio iónico, siendo del 16% la diferencia mayor entre los valores obtenidos por ambas técnicas y del 6% la menor.

7.3.- BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, R.; Bueno, J.L. y Andrés, L.J. (1982). "Coeficientes de difusión molecular en fase líquida. I - Ecuaciones de predicción y de correlación en sistemas binarios", *Ingeniería Química*, **154**, 137-155
- Firouztale, E.; Scott, A.P.; Dalvie S.K. y Von Blohn, G.M. (1992). "Experimental and theoretical study of key parameters of adsorption on reverse phase macroporous resin", *AIChE Symp. Ser.*, **88** (290), 25-33
- Sridhar, P.; Sastri, N.V.S.; Modak, J.M. y Mukherjee, A.K. (1994). "Mathematical simulation of bioseparation in an affinity packed column", *Chem. Eng. Technol.*, **17**, 422-429
- Wakao, N. y Funazkri, T. (1978). "Effect of fluid dispersion coefficients on particle-to-fluid mass transfer coefficients in packed beds", *Chem. Eng. Sci.*, **33**, 1375-1384
- Wilson, E.J. y Geankoplis, C.J. (1966). "Liquid mass transfer at very low Reynolds numbers in packed beds", *Ind. Eng. Chem., Fundam.*, **5** (1), 9-14
- Yoshida, H.; Yoshikawa, M. y Kataoka, T. (1994). "Parallel transport of BSA by surface and pore diffusion in strongly basic chitosan", *AIChE J.*, **40** (12), 2034-2044

8. ESCALADO Y SIMULACIÓN DEL PROCESO DE ADSORCIÓN EN LECHO FIJO

8.1.- ESCALADO DEL PROCESO DE ADSORCIÓN EN LECHO FIJO

En el capítulo anterior se ha realizado el modelado matemático de la adsorción de α -amilasa en lecho fijo, esto es, la obtención de los parámetros cinéticos característicos del modelo propuesto mediante el ajuste y optimación de las curvas teóricas a los resultados experimentales. A partir de ellos se han obtenido unos ajustes cuya bondad se ha comprobado y se ha considerado adecuada.

A continuación, con el propósito de verificar que los parámetros obtenidos (D_p , k_f , isoterma) reproducen el comportamiento de otros sistemas experimentales de dimensiones distintas y funcionando en condiciones de operación diferentes, se ha procedido a simular un proceso de adsorción en una columna cuyo tamaño es más de diez veces mayor que los utilizados en la etapa de

modelado y comparar los resultados con los obtenidos en un experimento realizado en las mismas condiciones.

La concentración elegida ha sido de 2.5 mg/ml, mayor que en los experimentos utilizados en el modelado con el fin de comprobar la validez del modelo fuera del intervalo en el que se han obtenido los parámetros. Además este valor de la concentración es del orden en el que la α -amilasa se produce en los fermentadores a escala industrial y de planta piloto por lo que el funcionamiento de la columna se encontrará en unas condiciones más cercanas a las utilizadas industrialmente.

Las condiciones de operación y características físicas del sistema utilizado se recogen en la tabla 8.1. y los parámetros cinéticos y termodinámicos usados en la simulación figuran en la tabla 8.2, los cuales corresponden a los obtenidos en el apartado 6.2 (parámetros de la isoterma de Langmuir) y 7.2 (coeficientes de difusión externa y en el interior de los poros).

Tabla 8.1: condiciones de operación y características del sistema.

| | |
|---------------------------------|---|
| Adsorbato | α -Amilasa (<i>A. oryzae</i>) |
| Adsorbente | Duolite A-568 (IEC) |
| Fase móvil | Tampón Tris/HCl 0.05M pH 7.0, fuerza iónica 0.60 |
| L [cm] | 16.3 |
| Φ_C [cm] | 1.60 |
| R [mm] | 0.41 |
| ϵ | 0.58 |
| C_0 [mg/ml] | 2.50 |
| Q [ml/min] | 5.00 |
| T [°C] | 25.0 |

Tabla 8.2: Parámetros de la simulación.

| Parámetro | Valor |
|---------------------------|-----------------------|
| D_p [m ² /s] | $2.10 \cdot 10^{-11}$ |
| k_f [m/s] | $8.2 \cdot 10^{-6}$ |
| q_m [mg/g] | 45.40 |
| b | 0.84 |

En la figura 8.1 se muestra el resultado de la comparación entre la simulación realizada y el experimento desarrollado en las mismas condiciones.

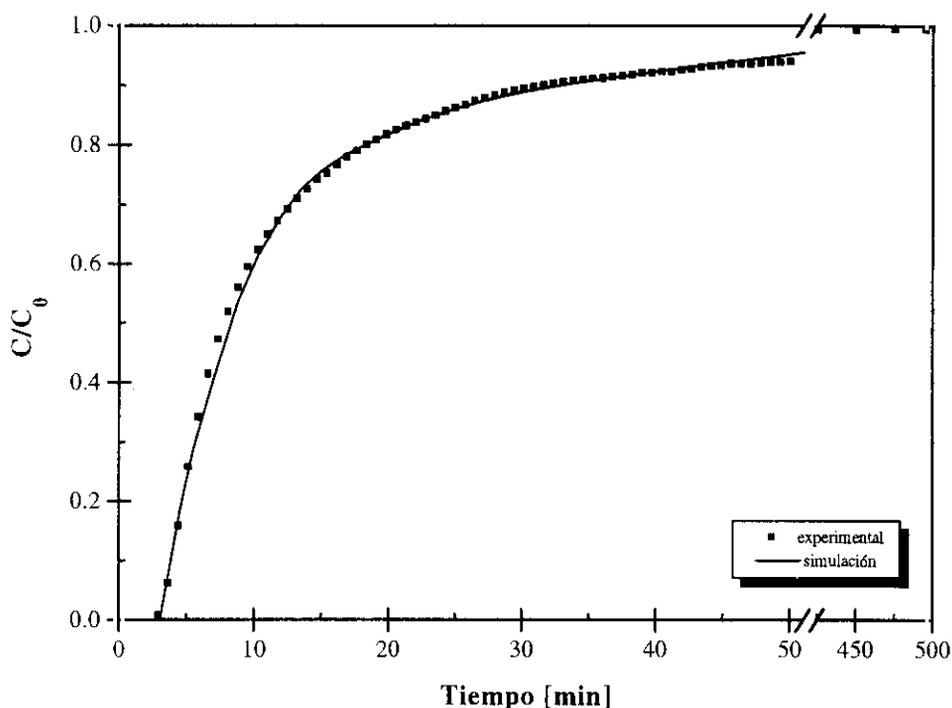


Figura 8.1: Comparación de la curva de ruptura experimental con la obtenida por simulación.

La concordancia entre ambas curvas es buena, por lo que para cuantificar el grado de ajuste, se ha procedido a calcular el factor de capacidad correspondiente tanto a la curva de ruptura experimental como a la obtenida por simulación. Como puede observarse, el error es inferior al 10% si se considera el proceso de adsorción hasta la saturación completa de la columna. Sin embargo, en operación industrial no se alcanza ese grado de saturación, ya que esto supondría una importante pérdida de adsorbato en el efluente, lo que haría disminuir la rentabilidad económica del proceso hasta hacerlo inviable. Si se calcula el error entre la α -amilasa adsorbida experimentalmente y la que predice el modelo al 95% de la saturación, el error se reduce drásticamente hasta un valor de 0.08%, siendo aun inferior para niveles inferiores de saturación.

La diferencia entre ambas curvas se localiza en la zona cercana a la asíntota correspondiente a la saturación de la capacidad de adsorción de la resina. Para valores de concentración adimensional (C/C_0) superiores a 0.97, la curva experimental se acerca muy lentamente a 1.0 mientras que la correspondiente a la simulación alcanza ese valor más rápidamente. Esto podría estar causado por la lenta velocidad de transporte de materia por difusión en el interior de los poros cuando estos se encuentran prácticamente cubiertos de adsorbato sobre su superficie.

De acuerdo con estos resultados, puede concluirse que el modelo matemático propuesto para describir el comportamiento de los procesos de adsorción de α -amilasa en lecho fijo es adecuado y

reproduce los resultados experimentales con un grado de aproximación elevado, pudiendo ser utilizado como herramienta para el diseño y escalado de estas operaciones a nivel industrial.

Tabla 8.3: Factores de capacidad y error de la simulación.

| | F.C. (experimental) | F.C. (simulación) | Error [†] [%] |
|---------------------------|------------------------|----------------------|---------------------------|
| al 99.9% de la saturación | 190.7 | 173.1 | 9.2 |
| al 95.0% de la saturación | 164.1 | 164.3 | -0.08 |

8.2.- SIMULACIÓN TEÓRICA DEL PROCESO DE ADSORCIÓN EN LECHO FIJO

Como se ha comprobado y expuesto previamente en el presente trabajo, el modelo matemático que describe el proceso de adsorción de α -amilasa en un lecho fijo mediante los mecanismos de interacción hidrofóbica e intercambio iónico, describe adecuadamente los resultados experimentales obtenidos.

En el modelo matemático se han incluido las etapas de transporte de materia por difusión externa e interna así como la existencia de flujo no ideal debida a efectos de dispersión axial, encontrándose, cada uno de los procesos anteriores, caracterizado por un parámetro cinético (k_f , D_p y D_L). La experimentación llevada a cabo ha permitido la obtención de los mismos así como de los parámetros termodinámicos correspondientes a la isoterma de equilibrio, que en el caso de la adsorción de α -amilasa en las resinas estudiadas ha mostrado un comportamiento no ideal.

Para desarrollar la simulación y diseño de procesos de adsorción en lecho fijo a partir del modelo matemático propuesto, es necesario conocer las características físicas del adsorbente (porosidad, densidad, tamaño de poro y de partícula), del adsorbato (difusividad molecular) y del sistema experimental (dimensiones y porosidad del lecho) así como las condiciones de operación definidas para la realización de los experimentos (caudal, temperatura y concentración de alimentación). Los ensayos de caracterización del adsorbente son los comúnmente utilizados para tal fin (ver capítulo 4), mientras que la difusividad molecular del adsorbato puede obtenerse a partir de diversas correlaciones (Álvarez *et al.*, 1982).

Los mecanismos de adsorción estudiados, interacción hidrofóbica e intercambio iónico, son de aplicación general y no suponen unión bioespecífica entre la α -amilasa y el adsorbente

[†] Calculado mediante la ecuación 7.1

correspondiente. Todas las proteínas contienen zonas hidrofóbicas y residuos con grupos funcionales cargados eléctricamente en su superficie que permiten, en función de las condiciones de operación, la adsorción a los ligandos unidos a la matriz de la fase estacionaria. Por ello, es de esperar que el modelo propuesto pueda aplicarse a la adsorción de otras proteínas a resinas de HIC e IEC.

Tras la etapa de modelado, la simulación de un proceso permite determinar que variables y de que forma influyen en el mismo, conduciendo, de esta forma, a un mejor y más completo conocimiento del proceso de adsorción de un soluto en un lecho fijo. La simulación matemática, por otro lado, permitirá el diseño de nuevos procesos así como la optimización de otros ya existentes. En el presente apartado se realiza un estudio teórico de la influencia de las variables que intervienen en el proceso en base al modelo matemático desarrollado y cuya validez se ha comprobado.

En la tabla 8.3 se indican los valores utilizados para la simulación en el estudio teórico realizado. En cada caso, se mantendrán constantes todos los parámetros excepto aquél cuya influencia se esté estudiando.

Tabla 8.4: Parámetros de la simulación.

| Parámetro | Valor |
|-----------------------------|----------------------|
| L [cm] | 10.0 |
| Φ_C [cm] | 2.0 |
| ϵ | 0.60 |
| ρ [kg/m ³] | 1890 |
| ϵ_p | 0.50 |
| q_m [mg/g] | 45.40 |
| C_0 [mg/cm ³] | 2.50 |
| D_p [m ² /s] | $2.1 \cdot 10^{-11}$ |
| k_f [m ² /s] | $2.0 \cdot 10^{-5}$ |

En la figura 8.2 se muestra la variación de las curvas de ruptura con el valor del coeficiente de difusión en los poros. A medida que este aumenta, el punto de ruptura se retrasa, obteniéndose curvas más estilizadas cuya pendiente es mayor, alcanzando la saturación de la columna más rápidamente. Para valores pequeños de D_p , la forma sigmoideal de la curva de ruptura se hace más ancha, perdiendo la simetría que presenta, respecto del punto de inflexión, a valores superiores. Para adsorbatos de elevada masa molecular (M_A), como es el caso de las proteínas, la difusividad molecular es proporcional a $M_A^{-1/3}$ (ecuación 2.4), por lo que su valor se encuentra, a temperatura ambiente, dentro del orden de 10^{-11} m²/s para proteínas de pequeño tamaño, hasta $3 \cdot 10^{-12}$ m²/s para las mayores

proteínas. Por esta razón, las curvas de ruptura de la α -amilasa en las resinas de HIC e IEC obtenidas en el presente trabajo, presentan este comportamiento caracterizado por la baja simetría de las mismas. Las moléculas de proteína, tras atravesar la capa límite externa que rodea a las partículas, sufren una lenta difusión en el interior de los poros hasta los sitios de adsorción debido a su gran tamaño y, por tanto, al pequeño valor de D_p .

La variación del coeficiente de transferencia de materia externa (figura 8.3) modifica el comportamiento del sistema de manera que para valores bajos del mismo, las moléculas de soluto no tienen el tiempo de residencia suficiente como para atravesar la capa límite y entrar en el interior de los poros de las partículas. Así, se produce un aumento rápido de la concentración de salida debido a las moléculas que no se han difundido hacia los poros, disminuyendo la eficacia de la operación. A medida que aumenta el valor de k_f , la ruptura se retrasa, permitiendo un mayor flujo de adsorbato a través de la capa límite.

La capacidad de adsorción de la resina viene dada por el valor de q_m correspondiente a la ecuación de la isoterma de Langmuir (ecuación 2.13). Como puede observarse en la figura 8.4, un mayor número de sitios de adsorción accesibles requiere mayor tiempo para que el adsorbato llegue a saturar los centros de adsorción del adsorbente.

En la figura 8.5 se examina el efecto de la porosidad del lecho. En ella se advierte que un aumento de ϵ desplaza la curva de ruptura hacia la izquierda, reduciendo la utilización de la capacidad de la resina, la cual está relacionada con el área por encima de la curva de ruptura (según figura en el apartado 6.5.2). Manteniendo constante el valor de la densidad del adsorbente y la distribución de tamaños de partícula, un aumento de la porosidad de la columna estará causado por un empaquetamiento defectuoso, lo cual genera un aumento de las zonas de mezcla en el interior de la columna, disminuyendo la eficacia de la operación de adsorción.

La porosidad de las partículas tiene un efecto importante en el comportamiento de la adsorción y, por tanto, en la forma de las curvas de ruptura. El factor de tortuosidad, τ , caracteriza, en parte, la estructura porosa de las partículas de adsorbente, dependiendo de la porosidad interna de las mismas. Además, el coeficiente de difusividad efectivo es directamente proporcional al valor de τ (ecuación 2.7). Por otro lado, manteniendo constantes el resto de las características de la resina, el aumento de ϵ_p conduce a una menor masa de resina en la columna y de capacidad. El efecto global de estas influencias se representa en la figura 8.6, observándose un aumento de la eficacia de la adsorción con la disminución de la porosidad interna.

En la figura 8.7 se muestra el efecto del caudal de alimentación en las curvas de ruptura. Para una misma columna, el caudal es directamente proporcional a la velocidad del fluido por lo que, al aumentar aquel, también lo hace el coeficiente de transferencia de materia externo (Hidajat *et al.*,

1987) ya que este es proporcional a $v^{1/3}$. La ruptura se produce antes para caudales mayores, aumentando la anchura de la curva y la eficacia de la adsorción a medida que disminuye el caudal, ya que, de esta manera, se aumenta el tiempo de contacto entre las fases permitiendo que se alcance una situación más cercana al equilibrio local.

Respecto a la concentración de adsorbato en la fase móvil, se observa (figura 8.8) que afecta considerablemente a la forma y posición de las curvas de ruptura. A medida que aumenta el valor de C_0 , se alcanza antes la saturación del lecho. El cálculo de los factores de capacidad (ecuación 6.8) para cada una de las curvas obtenidas por simulación indica que, al aumentar la concentración, el factor de capacidad también aumenta.

La influencia de las dimensiones del lecho en el proceso de adsorción en lecho fijo puede observarse en las figuras 8.9 y 8.10. En la primera de ellas se observa el comportamiento de las curvas de ruptura en función de la altura de lecho. Según se aumenta L , la pendiente de la curva, tras la ruptura, va disminuyendo hasta alcanzar un valor constante. A partir de ese valor, la forma de las curvas de ruptura no varía, desplazándose estas progresivamente hacia la derecha. Este desplazamiento está causado únicamente por la mayor cantidad de adsorbente que habrá en la columna de mayor tamaño por lo que la cantidad de adsorbato que se une será proporcional al aumento de longitud ya que el resto de los parámetros del proceso permanecen constantes. Para columnas de menor tamaño, la curva de ruptura se muestra asimétrica, debido a que las resistencias difusionales del sistema permiten que existan moléculas de adsorbato que atraviesen la columna sin haberse difundido hasta el interior de las partículas. Este efecto llega a ser poco significativo a partir de determinada altura de columna, en la que las moléculas tienen el suficiente tiempo de residencia en el interior del lecho como para terminar difundiéndose hasta los sitios de adsorción de la resina.

La variación del diámetro de la columna, Φ_C , a caudal constante (figura 8.10), produce una variación de la velocidad intersticial del fluido en sentido contrario que es proporcional a $(\Phi_C)^2$ o, lo que es lo mismo, al área transversal de la columna. Como se ha comentado anteriormente, la velocidad de la fase móvil afecta positivamente el valor de k_f y un aumento del diámetro, manteniendo constante el caudal, hará disminuir la velocidad, permitiendo un mayor tiempo de contacto del adsorbato con la fase estacionaria y, por ello, una mayor eficacia del proceso de adsorción, aunque el tiempo de operación aumenta considerablemente.

La variación del tamaño de las partículas del adsorbente (figura 8.11) también afecta al valor de k_f , siendo este proporcional a $R^{-0.45}$ (Hidajat *et al.*, 1995). La disminución del tamaño de partícula aumenta la eficacia del proceso y retrasa el punto de ruptura, haciendo las curvas más estilizadas. Junto a esto, para el escalado de este proceso se deberá tener en cuenta que tamaños de partículas decrecientes harán aumentar la pérdida de carga a lo largo del lecho, de acuerdo a la ecuación de

Carman-Kozeny, proporcionalmente a R^{-2} .

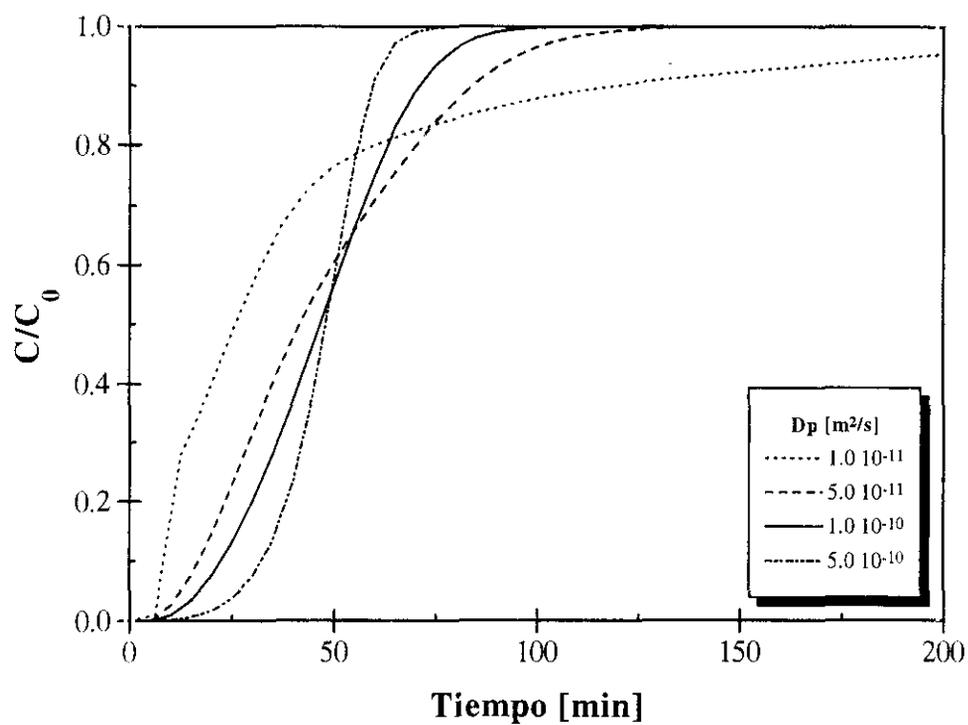


Figura 8.2: Influencia del coeficiente de difusión en los poros.

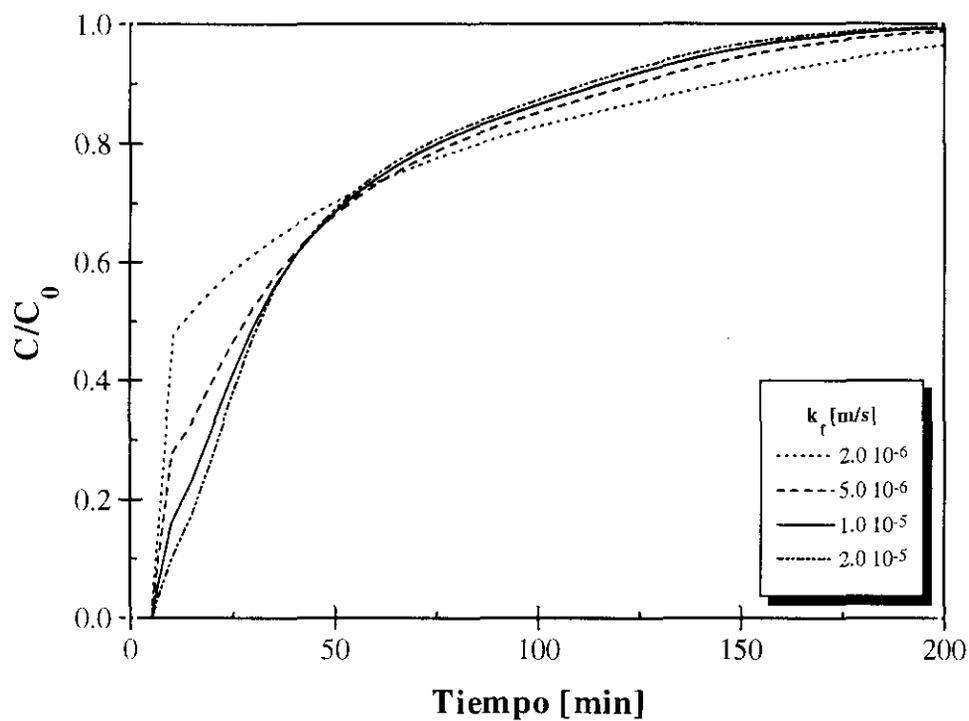


Figura 8.3: Influencia del coeficiente de transferencia de materia externa.

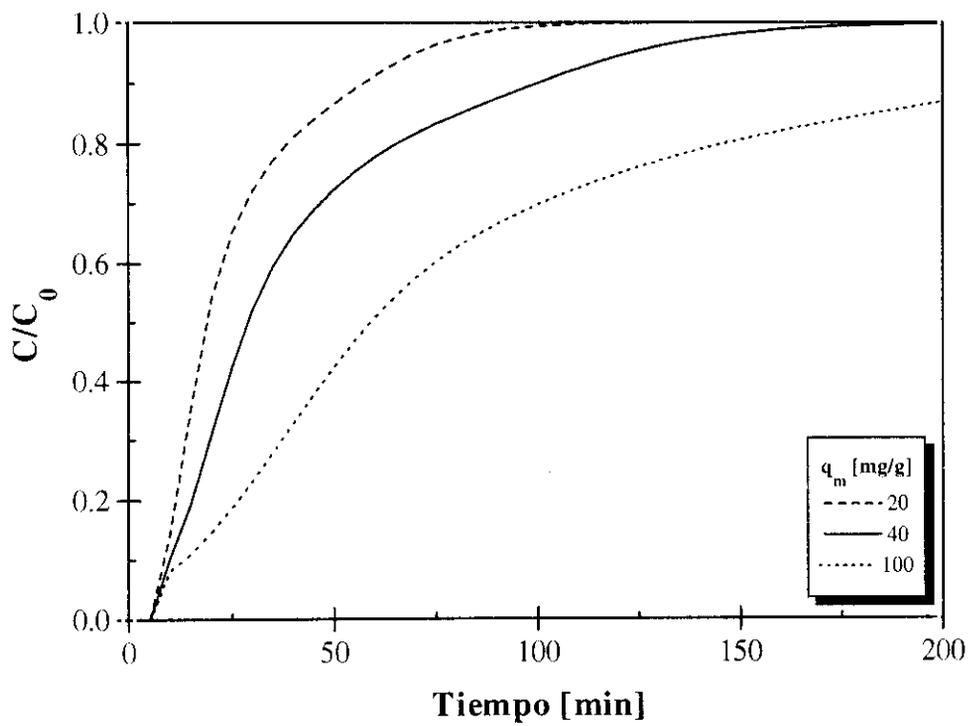


Figura 8.4: Influencia de la capacidad del adsorbente.

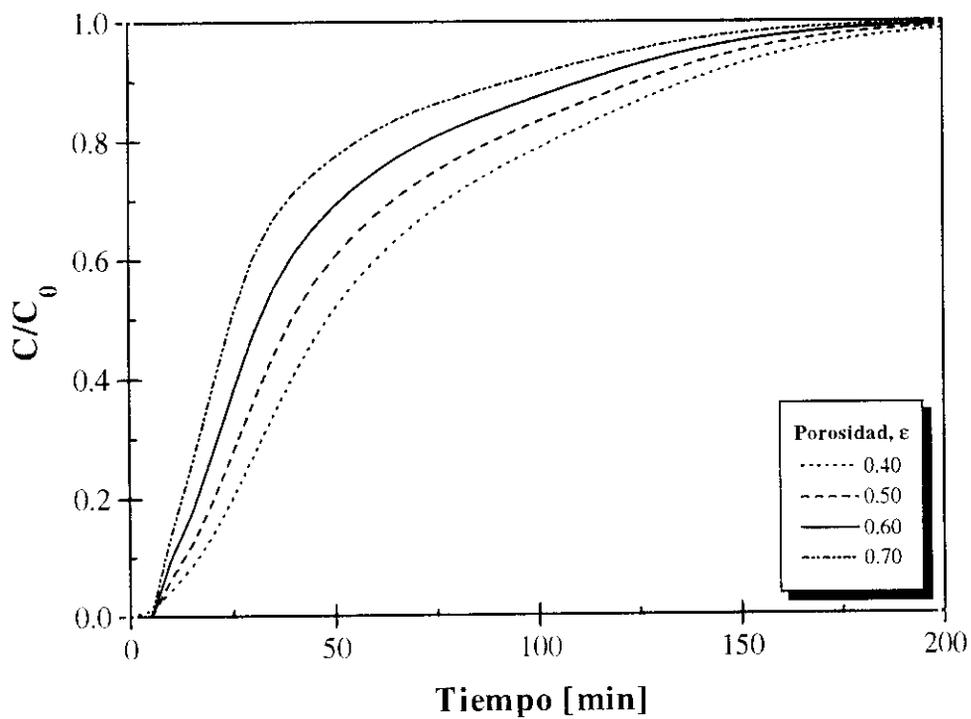


Figura 8.5: Influencia de la porosidad del lecho.

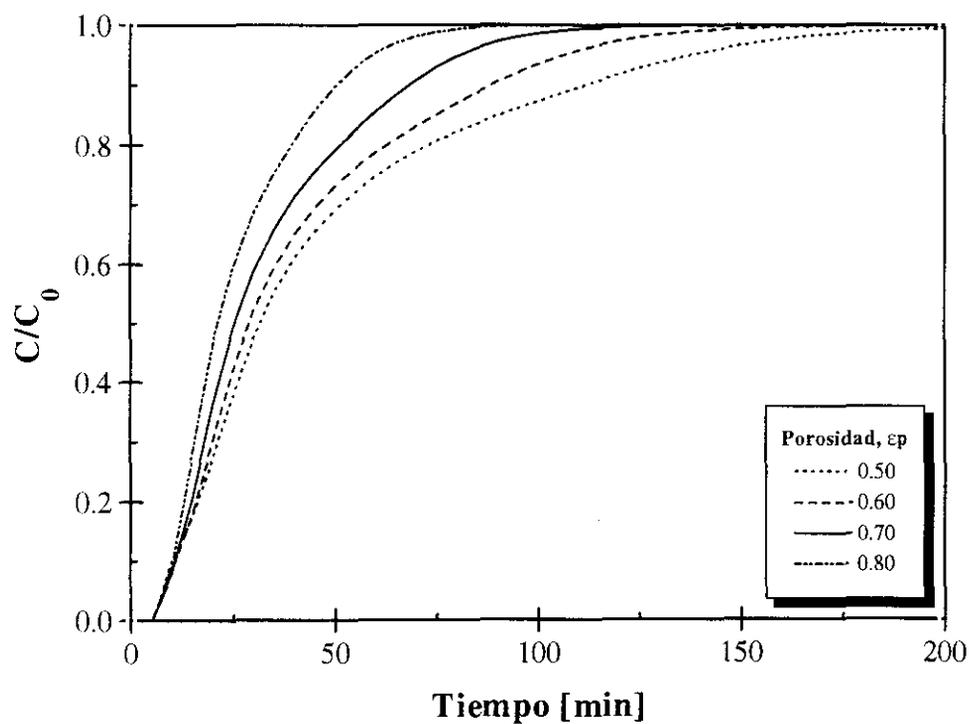


Figura 8.6: Influencia de la porosidad de partícula.

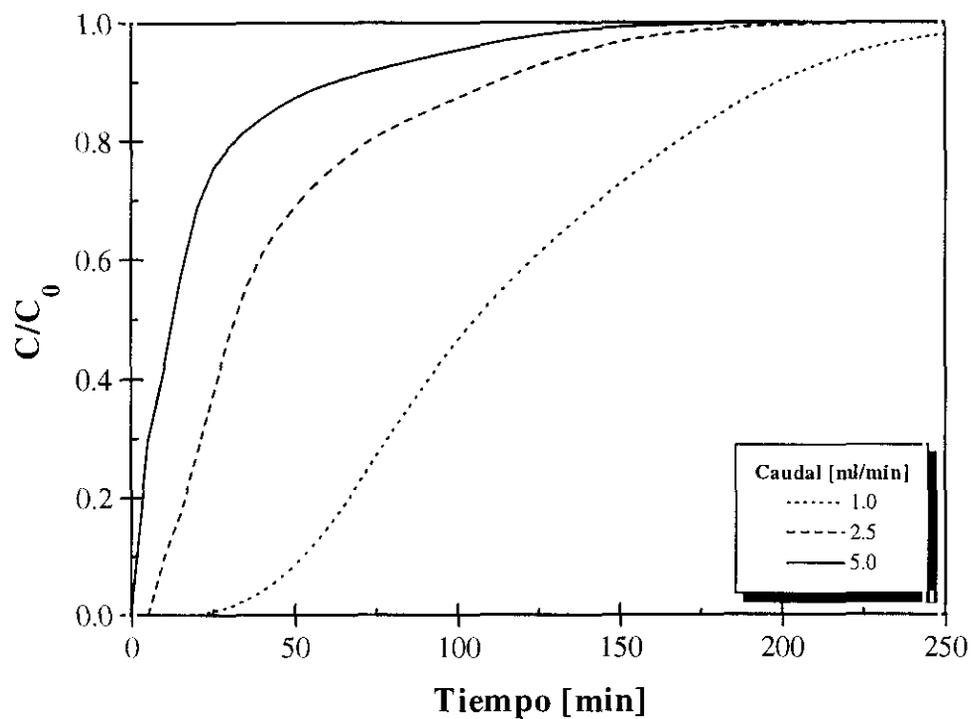


Figura 8.7: Influencia del caudal.

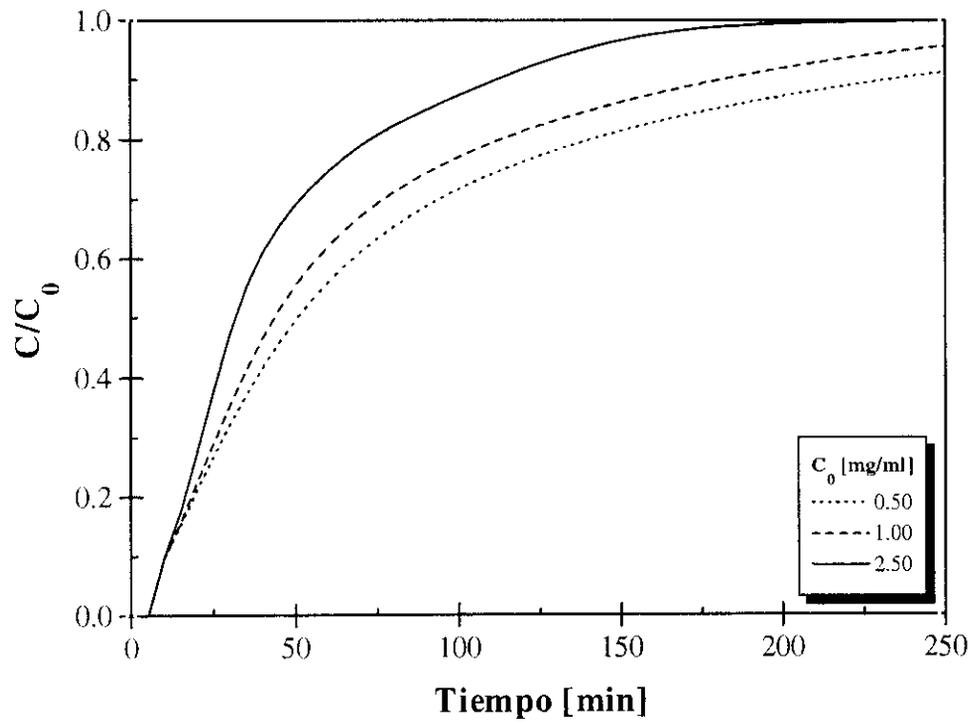


Figura 8.8: Influencia de la concentración de alimentación.

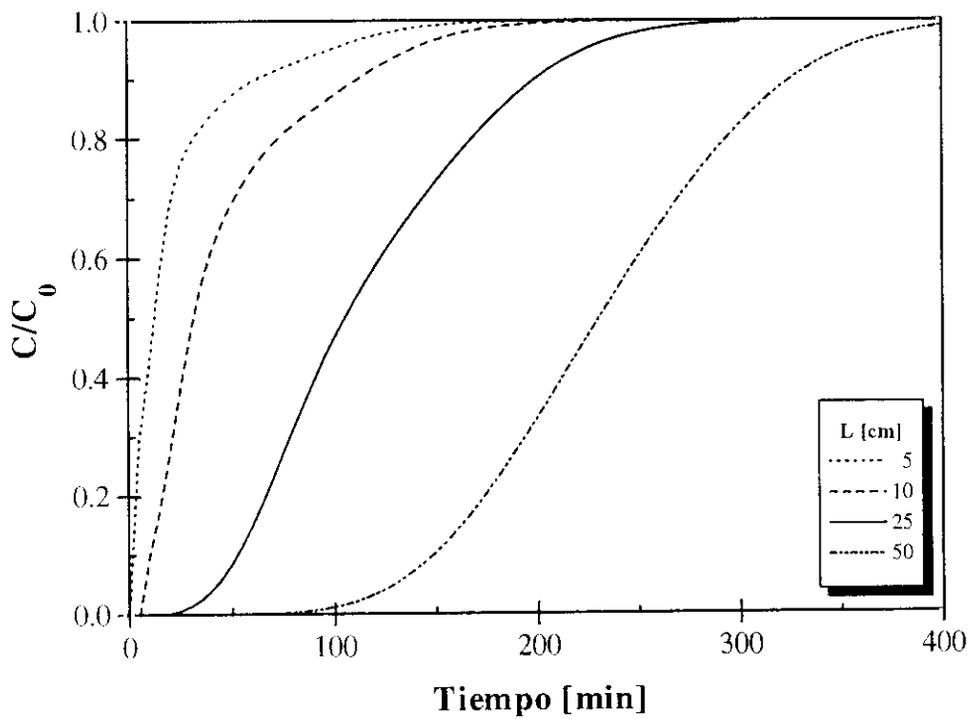


Figura 8.9: Influencia de la longitud de columna.

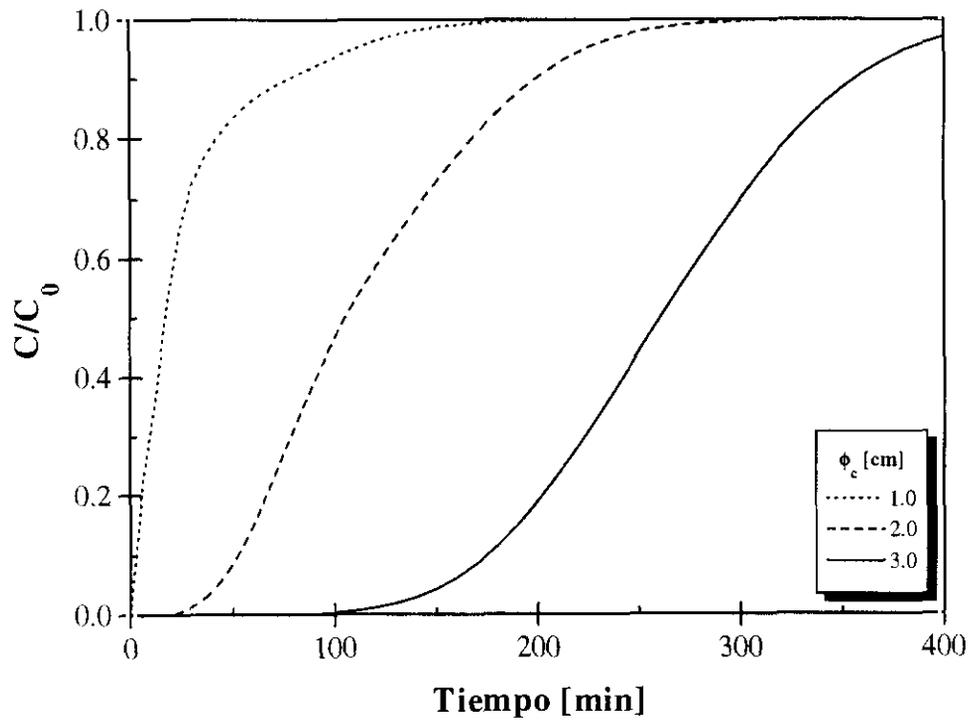


Figura 8.10: Influencia del diámetro de la columna.

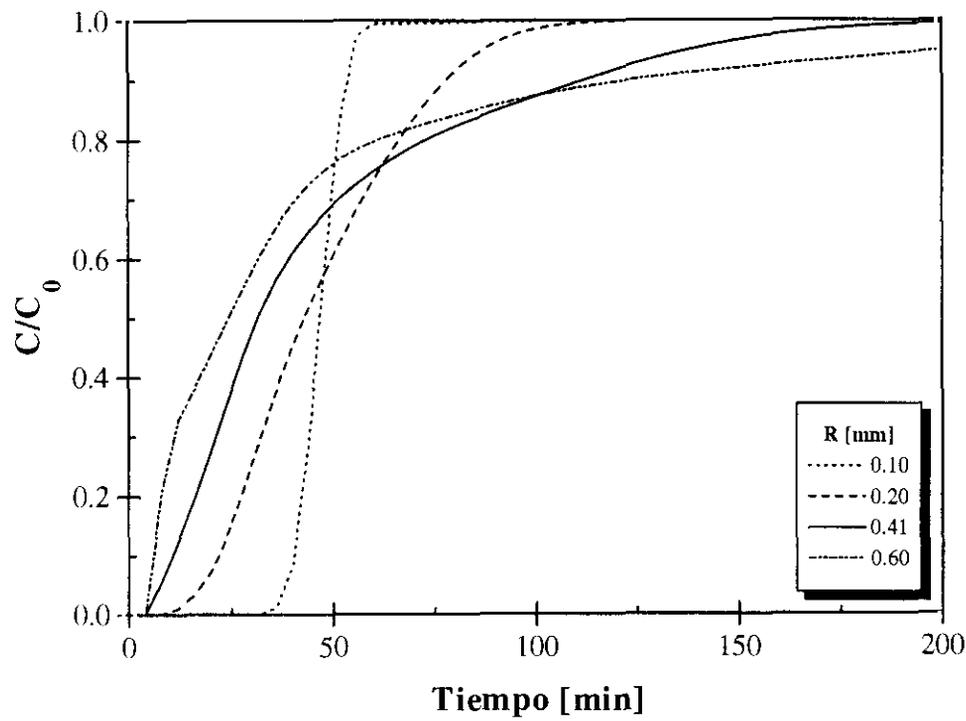


Figura 8.11: Influencia del diámetro de partícula.

8.3.- PREDICCIÓN TEÓRICA DEL CAMBIO DE ESCALA

En los apartados anteriores se ha comprobado que el modelo matemático planteado reproduce los resultados experimentales dentro y fuera del intervalo de condiciones de operación en el cual se determinaron los parámetros característicos del mismo; posteriormente se ha estudiado la influencia de las condiciones de operación (concentración, temperatura, caudal), características físicas del sistema (dimensiones de la columna, porosidad del lecho y del adsorbente) y parámetros cinéticos (coeficiente de transferencia de materia externa y de difusión en los poros) y termodinámicos (isoterma) en el comportamiento del proceso de adsorción en un lecho fijo.

Tabla 8.5: Parámetros de la simulación.

| Parámetro | Valor |
|-----------------------------|------------|
| L [m] | 5.0 - 10.0 |
| Φ_c [m] | 2.0 |
| ϵ | 0.60 |
| ρ [kg/m ³] | 1890 |
| ϵ_p | 0.50 |

Una vez completadas las etapas del presente estudio, descritas anteriormente, se ha realizado la simulación de una columna de adsorción con la resina de intercambio iónico (Duolite A-568), a escala industrial, con las características que se indican en la tabla 8.5.

Las condiciones de operación elegidas han sido las que se indican en la tabla 8.6. Los parámetros del modelo (ver tabla 8.7) han sido los determinados en la etapa de modelado matemático a partir de los resultados experimentales.

Tabla 8.6: Condiciones de operación para la simulación a escala industrial.

| Parámetro | Valor |
|-----------------------------|---------------------|
| C_0 [mg/cm ³] | 5.00 |
| Caudal [m ³ /s] | $1.0 \cdot 10^{-3}$ |
| T [°C] | 25.0 |

Tabla 8.7: Parámetros del modelo para la simulación a escala industrial.

| Parámetro | Valor |
|---------------------------|----------------------|
| q_m [mg/g] | 45.40 |
| D_p [m ² /s] | $2.1 \cdot 10^{-11}$ |
| k_f [m/s] | $2.0 \cdot 10^{-5}$ |

En la figura 8.12 se muestra el resultado de la simulación. Se observa que las curvas de ruptura correspondientes a las dos columnas de diferente longitud presentan una forma y una pendiente similar, aunque desplazadas en el tiempo ya que al contener diferente cantidad de

adsorbente, el tiempo necesario para la ruptura también, varía. Estos resultados se corresponden con los estudios teóricos llevados a cabo en el apartado anterior.

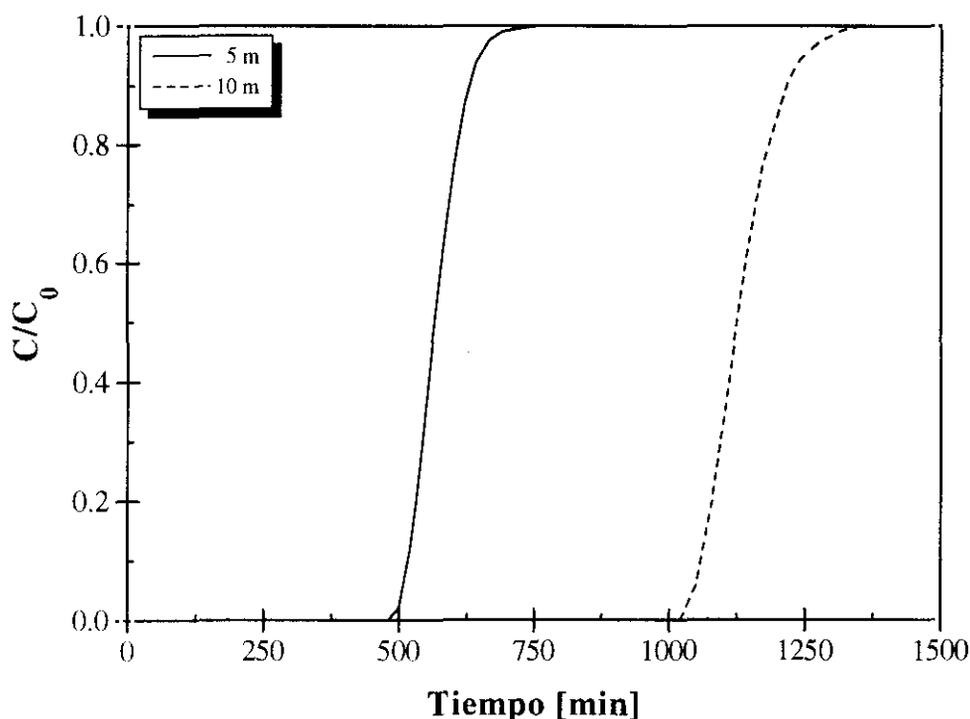


Figura 8.12: Simulación del comportamiento de dos columnas de adsorción de diferente altura, a escala industrial, para el sistema α -amilasa/Duolite A-568.

En operación a escala industrial no se llega a alcanzar la saturación completa de la capacidad del adsorbente ($C/C_0 = 1$) ya que esto supondría una importante pérdida de producto en la corriente del efluente que sale de la columna. En función de la optimización técnica (estabilidad del producto de interés, rendimientos, etc.) y económica (costes de producción, costes de materias primas y productos, etc.) se deberá determinar el tiempo de operación y el porcentaje de saturación adecuado para realizar la purificación de cada producto.

A partir de las simulaciones realizadas, se han calculado el tiempo de operación y la cantidad de α -amilasa adsorbida por cada una de las columnas correspondientes a la saturación completa y al 20% de la misma ($C/C_0 = 0.2$).

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8.8. Como puede comprobarse, para la columna de 5 metros, con un aumento del tiempo de operación del 30% (desde el 20% al 100% de la capacidad máxima), se consigue un incremento de la cantidad de α -amilasa adsorbida de sólo el 7.6%. Para la columna de 10 metros de altura, el aumento del 20% en el tiempo de operación supone un 5.2% de aumento de la cantidad de α -amilasa adsorbida.

Tabla 8.8: Resultados de la simulación del proceso de adsorción de α -amilasa sobre Duolite A-568 a escala industrial.

| | Saturación [%] | Columna de 5 m | Columna de 10 m |
|----------------------------------|----------------|----------------|-----------------|
| tiempo de operación [h] | 20 | 8.8 | 18.0 |
| α -amilasa adsorbida [kg] | | 158 | 322.3 |
| tiempo de operación [h] | 100 | 12.7 | 22.5 |
| α -amilasa adsorbida [kg] | | 171 | 340 |

Por lo anteriormente comentado, junto al hecho de que el aumento del nivel de saturación al final de la operación de adsorción supone un aumento de las pérdidas de producto, sería aconsejable, en operación real, detener el proceso de adsorción (comenzando la operación de desorción) a valores reducidos de la concentración del adsorbato en el efluente de la columna.

8.4.- BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, R.; Bueno, J.L. y Andrés, L.J. (1982). "Coeficientes de difusión molecular en fase líquida. I - Ecuaciones de predicción y de correlación en sistemas binarios", *Ingeniería Química*, **154**, 137-155.
- Hidajat, K.; Aracil, J.; Carberry, J.J. y Kenney, C.N. (1987). "Laboratory catalytic studies: the role of transport phenomena", *J. Catal.*, **105**, 245-248.
- Hidajat, K.; Aracil, J.; Carberry, J.J. y Kenney, C.N. (1995). "Interphase fluid-particle mass transport at low Reynolds numbers", *Catal. Letters*, **30**, 213-217.

9. RESUMEN, CONCLUSIONES Y FUTUROS TRABAJOS

A continuación se resume la investigación desarrollada y expuesta en la presente memoria junto con las conclusiones que de ella se han extraído:

- Se ha desarrollado una metodología que permite un acercamiento y conocimiento progresivo de los mecanismos y parámetros que intervienen en el proceso de purificación por adsorción de α -amilasa sobre resinas de interacción hidrofóbica e intercambio mediante experimentación en HPLC, tanque agitado discontinuo y lecho fijo.
- Mediante experimentación en HPLC, se han identificado y cuantificado los factores que influyen en el proceso de adsorción de α -amilasa sobre la resina de interacción hidrofóbica Duolite XAD-761 y la de intercambio iónico Duolite A-568. Se ha determinado que dichos parámetros son pH, temperatura fuerza iónica y los propios de las condiciones de operación de cada uno de los sistemas experimentales utilizados (concentración, caudal, diámetro de partícula del adsorbente, dimensiones del lecho).

- Se ha aplicado el método de momentos al estudio de la adsorción mediante cromatografía de impulso en un sistema de HPLC. Se han obtenido los parámetros cinéticos (coeficiente de difusión en los poros) y termodinámicos (constante de adsorción, factor de capacidad, altura equivalente de un plato teórico, entalpías y entropías de adsorción).
- Se han determinado las isotermas de adsorción de α -amilasa sobre ambas resinas, observando un comportamiento no lineal. Los resultados experimentales se han ajustado a la ecuación de Langmuir, obteniendo los parámetros característicos por optimización.
- Se ha propuesto un modelo matemático que describe de forma adecuada el proceso de adsorción en tanque agitado discontinuo, teniendo como parámetro el coeficiente de difusión en los poros, determinándose su valor en función de la temperatura.
- Se ha propuesto un modelo matemático que describe de forma adecuada el proceso de adsorción en lecho fijo, teniendo como parámetros el coeficiente de difusión en los poros y el de transferencia de materia externa. Ambos se han determinado para el sistema experimental estudiado.
- El modelo de adsorción en lecho fijo ha demostrado su capacidad para predecir el comportamiento de la adsorción de α -amilasa, por lo que puede ser utilizado como herramienta en el diseño y escalado de la operación de adsorción en lecho fijo.
- Se ha realizado un estudio teórico utilizando el modelo anterior para conocer en profundidad la influencia de las variables de operación, las características físicas del sistema y los parámetros cinéticos y termodinámicos que intervienen en el proceso.



El número de productos obtenidos a través de procesos biotecnológicos se encuentra en constante aumento. Además, las especificaciones de pureza a las que se encuentran sujetos dichos productos son, cada vez, más exigentes. Por ello y a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se propone la continuación de la investigación a través de las siguientes líneas:

- Estudiar y modelar la adsorción de otras proteínas y sustancias que, típicamente, acompañan a la α -amilasa en los caldos de fermentación donde esta se produce. Esta etapa deberá comprender el estudio de la adsorción de cada uno de ellos, tanto de forma individual como conjunta.
- A partir de la etapa anterior, desarrollar un modelo matemático que describa el comportamiento de cada uno de los adsorbatos en los procesos de adsorción multicomponente.

- Con objeto de generalizar el uso de los modelos matemáticos propuestos para el diseño de procesos de purificación en biotecnología, se deberá verificar que describen, satisfactoriamente, los procesos de adsorción en los que intervienen proteínas y biomoléculas con diferentes características y adsorbentes de diversa naturaleza.
- La purificación por adsorción mediante la operación en lecho expandido permite eliminar etapas primarias de separación con el consiguiente aumento de la eficacia global y reducción de costes de proceso. Esta operación, de reciente aplicación a la biotecnología, se encuentra en un estado de desarrollo empírico por lo que sería de gran interés desarrollar modelos matemáticos que describan dicha operación, en base al modelo propuesto en el presente trabajo de investigación para la adsorción en lecho fijo.

ANEXO A. RESOLUCIÓN NUMÉRICA DE LOS MODELOS DE ADSORCIÓN

A.1.- ANÁLISIS DE MOMENTOS

A continuación se muestra la secuencia de cálculo para la determinación, mediante el análisis de momentos, de los parámetros cinéticos y termodinámicos característicos del modelo.

En primer lugar, a partir de las curvas de respuesta experimentales, se calcula el primer y segundo momento central mediante las ecuaciones 3.1 y 3.2. La integración se realiza numéricamente utilizando el método de Gill y Miller (1972).

A continuación se ajustan linealmente, por mínimos cuadrados, los datos del primer momento frente a L/v para los experimentos realizados en iguales condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura. A partir de la ecuación 3.3, la pendiente de dicha regresión vendrá dada por:

$$\text{pendiente} = 1 + \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) k \quad [\text{A.1}]$$

calculando directamente la constante de equilibrio aparente, k , y con la ecuación 3.4, la constante de equilibrio, K_A .

Estimando la altura equivalente de un plato teórico mediante la ecuación 3.9 y de acuerdo con la expresión 3.10, la regresión lineal de los valores de AEPT frente a la velocidad intersticial, v , generará una recta cuya ordenada en el origen y pendiente corresponderán a las siguientes relaciones:

$$\text{ordenada en origen} = \frac{2 D_L}{v} \quad [\text{A.2}]$$

$$\text{pendiente} = 2 \left(\frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) \left(\frac{R^2}{15 \varepsilon_p D_p} \right) \left(1 + \frac{\varepsilon}{(1 - \varepsilon) k} \right)^{-2} \quad [\text{A.3}]$$

a partir de las cuales puede determinarse el valor del coeficiente de dispersión axial, D_L , y de difusión en los poros, D_p , respectivamente.

A.2.- MODELO DE ADSORCIÓN EN TANQUE AGITADO DISCONTINUO

Con objeto de simplificar la resolución del modelo, en primer lugar, las variables de operación correspondientes al modelo planteado se transforman en las siguientes variables adimensionales:

$$\omega = \frac{c}{C_0} \quad ; \quad z = \frac{r}{R_p} \quad ; \quad \tau = \frac{t}{(R_p^2 / D_p)} \quad ; \quad U = \frac{C}{C_0} \quad [\text{A.4}]$$

Así, el balance de materia en una sección radial de la partícula, queda de la siguiente manera:

$$\frac{\partial \omega}{\partial \tau} = \frac{1}{\left[1 + \left(\frac{1 - \varepsilon_p}{\varepsilon_p} \right) \frac{dq}{dc} \right]} \left(\frac{\partial^2 \omega}{\partial z^2} + \frac{2}{z} \frac{\partial \omega}{\partial z} \right) \quad [\text{A.5}]$$

La velocidad de desaparición de adsorbato en la fase líquida viene dada por:

$$\frac{dU}{d\tau} = \frac{k_f R_p}{\varepsilon_p D_p} \left(\frac{3V_p}{V} \right) \varepsilon_p (U - \omega|_{z=1}) = \text{Sh} \left(\frac{3V_p}{V} \right) \varepsilon_p (U - \omega|_{z=1}) \quad [\text{A.6}]$$

Las condiciones de contorno pueden escribirse de la siguiente forma:

$$\left. \frac{\partial \omega}{\partial z} \right|_{z=0} = 0 \quad [\text{A.7}]$$

$$\left. \frac{\partial \omega}{\partial z} \right|_{z=1} = \text{Sh} \left(U - \omega \Big|_{z=1} \right) \quad [\text{A.8}]$$

Las condiciones iniciales, de esta forma, son:

$$\begin{array}{lll} \omega = 0 & \tau = 0 & 0 \leq z \leq 1 \\ q = 0 & \tau = 0 & 0 \leq z \leq 1 \\ U = 1 & \tau = 0 & \end{array} \quad [\text{A.9}]$$

La solución del modelo matemático planteado para la adsorción en tanque agitado no es posible de forma analítica, salvo para el caso de que el equilibrio cumpla la ley de Henry y, por tanto, la isoterma sea lineal. Por ello, se procede a resolver numéricamente las ecuaciones de balances de materia mediante la aplicación de incrementos finitos.

De esta forma, el sistema de ecuaciones diferenciales parabólicas se convierte en un sistema de ecuaciones ordinarias mediante la aplicación de los incrementos finitos. A continuación, este sistema se resuelve mediante integración numérica llevada a cabo a través de un programa de ordenador realizado en lenguaje Fortran, utilizando el paquete de subrutinas de análisis matemático NAG Fortran Library (Numerical Algorithms Group Inc., Downers Grove, IL, EE.UU.).

La obtención del valor del coeficiente de difusión en los poros D_p se realizó mediante optimización uniparamétrica de una función objetivo utilizando el algoritmo de Coggins (Kuester y Mize, 1973). La función objetivo mencionada que hay que minimizar es la siguiente:

$$\Phi = \sum_{i=1}^{i=N} (C_i^{\text{exp}} - C_i)^2 \quad [\text{A.10}]$$

siendo N el número de puntos experimentales, C^{exp} y C son la concentración medida experimentalmente y la predicha por el modelo correspondientes para cada instante, i .

A.3.- MODELO DE ADSORCIÓN EN LECHO FIJO

De igual forma que en el caso anterior, es necesaria la resolución por métodos numéricos del sistema de ecuaciones diferenciales que forman la descripción del modelo matemático de la adsorción en un lecho fijo.

Transformando en adimensionales las variables del modelo, se obtiene:

$$\begin{aligned} \omega &= \frac{C}{C_0} \quad ; \quad u = \frac{c}{C_0} \quad ; \quad \tau = \frac{D_p t}{R_p^2} \\ Q &= \frac{q}{C_0} \quad ; \quad x = \frac{r}{R_p} \quad ; \quad Z = \frac{z}{L} \end{aligned} \quad [\text{A.11}]$$

Sustituyendo estas variables en las ecuaciones del balance de materia en una sección radial de la partícula, se tiene:

$$-\frac{\partial \omega}{\partial \tau} = \frac{1}{1 + \left(\frac{1 - \varepsilon_p}{\varepsilon_p} \right) \frac{\partial Q}{\partial \omega}} \left(\frac{\partial^2 \omega}{\partial x^2} + \frac{2}{x} \frac{\partial \omega}{\partial x} \right) \quad [\text{A.12}]$$

Las condiciones de contorno para el balance de materia anterior, quedan de la siguiente forma:

En el centro de la partícula:

$$\left. \frac{\partial \omega}{\partial x} \right|_{x=0} = 0 \quad [\text{A.13}]$$

En la superficie exterior de la partícula:

$$\left. \frac{\partial \omega}{\partial x} \right|_{x=1} = \frac{k_f R_p}{\varepsilon_p D_p} (U - \omega|_{x=1}) \quad [\text{A.14}]$$

La transformación de la ecuación del balance de materia en una sección transversal en el lecho y sus correspondientes condiciones de contorno, con las variables adimensionales, produce:

$$\frac{\partial u}{\partial \tau} = \frac{D_L R_p^2}{L^2 D_p} \frac{\partial^2 \omega}{\partial Z^2} - \frac{u R_p^2}{L D_p} \frac{\partial U}{\partial Z} - \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{3 k_f R_p}{D_p} (U - \omega|_{x=1}) \quad [\text{A.15}]$$

A la entrada de la columna:

$$\left. \frac{\partial U}{\partial Z} \right|_{Z=0} = \frac{u L}{D_L} (1 - U|_{Z=0}) \quad [\text{A.16}]$$

A la salida de la columna:

$$\left. \frac{\partial U}{\partial Z} \right|_{Z=L} = 0 \quad [\text{A.17}]$$

Las condiciones iniciales quedan ahora como:

$$\begin{array}{lll}
 U = 0 & 0 \leq Z \leq 1 & \tau \leq 0 \\
 U = 1 & 0 \leq Z & \tau > 0 \\
 \omega = 0 & 0 \leq Z \leq 1 & \tau \leq 0 \\
 Q = 0 & 0 \leq Z \leq 1 & \tau \leq 0
 \end{array} \quad [A.18]$$

Al igual que en el caso de la adsorción en tanque agitado, la resolución del modelo planteado para lecho fijo deberá realizarse de forma numérica para el caso de que la isoterma de equilibrio no sea lineal. El sistema de ecuaciones diferenciales planteado se resuelve mediante el método de colocación ortogonal (Carey y Finlayson, 1975; Villadsen y Stewart, 1967).

En este caso, también se procede a la determinación de los valores óptimos del coeficiente de transferencia de materia externa, k_f y del coeficiente de difusión en los poros, D_p . Se utiliza el método del simplex con 3 puntos ($2N+1$, siendo $N=2$, el número de variables independientes, en este caso k_f y D_p). La función objetivo elegida es la A.16 y los valores óptimos de los parámetros corresponden a la situación en la que se cumple la siguiente condición:

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N+1} (\Phi_i - \Phi_m)^2}{N+1}} < 10^{-10} \quad [A.25]$$

siendo, para cada tanteo, Φ_i cada uno de los valores de la función objetivo en los vértices del simplex y Φ_m el valor medio de los mismos.

La resolución numérica de los modelos, así como el ajuste de los datos experimentales y la optimización de los parámetros de cada uno de los modelos se ha realizado a través de un programa de ordenador escrito en lenguaje Fortran, utilizando el paquete de subrutinas NAG Fortran Library.

A.4.- BIBLIOGRAFÍA

- Carey, G.F. y Finlayson, B.A. (1975). "Orthogonal collocation of finite elements", *Chem. Eng. Sci.*, **30**, 587-596.
- Gill, P.E. y Miller, G.F. (1972). An algorithm for the integration of unequally spaced data", *Comp. J.*, **15**, 80-83.
- Kuester, J.L. y Mize, J.H. (1973), en: *Optimization techniques with Fortran*, McGraw-Hill, Nueva York.
- Villadsen, J.V. y Stewart, W.E. (1967). "Solution of boundary-value problems by orthogonal collocation", *Chem. Eng. Sci.*, **22**, 1483-1501.

ANEXO B. AJUSTE DE LAS ISOTERMAS DE ADSORCIÓN. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A continuación se presenta el análisis estadístico correspondiente al ajuste a las isothermas de Langmuir y Freundlich de los datos experimentales de las isothermas de adsorción de α -amilasa sobre Duolite XAD-761 y Duolite A-568 a diferentes temperaturas.

Los residuos representados se han calculado de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\varepsilon_R = \frac{q_{\text{exp}} - q_{\text{teo}}}{q_{\text{exp}}} \quad [\text{B.1}]$$

donde q_{exp} es el valor, determinado experimentalmente, de la concentración de α -amilasa adsorbida en la resina y q_{teo} es el valor calculado mediante la ecuación de la isoterma correspondiente.

En las tablas B.1 a B.6 se indican, en porcentaje, los valores del residuo medio y de la desviación estándar de los residuos para cada uno de los ajustes. Los números entre paréntesis

corresponden a los errores calculados para los puntos de concentración de equilibrio mayor de 0.20 mg/ml.

Como se ha indicado en el apartado 6.3.1, para valores de concentración inferiores a la anterior, se utilizará un ajuste lineal de la isoterma utilizando sólo los valores de baja concentración, que tienen una tendencia lineal. Los resultados de la constante de adsorción (constante de Henry), así obtenidos, se muestran en las tabla B.7 y B.8.

Tabla B.1: Errores de cada uno de los ajustes de las isotermas de adsorción en Duolite XAD-761 a 4 °C.

| Isoterma | ϵ_R medio [%] | σ [%] |
|------------|------------------------|--------------|
| Langmuir | -3.5 (0.6) | 11.3 (5.8) |
| Freundlich | 2.3 | 6.6 |

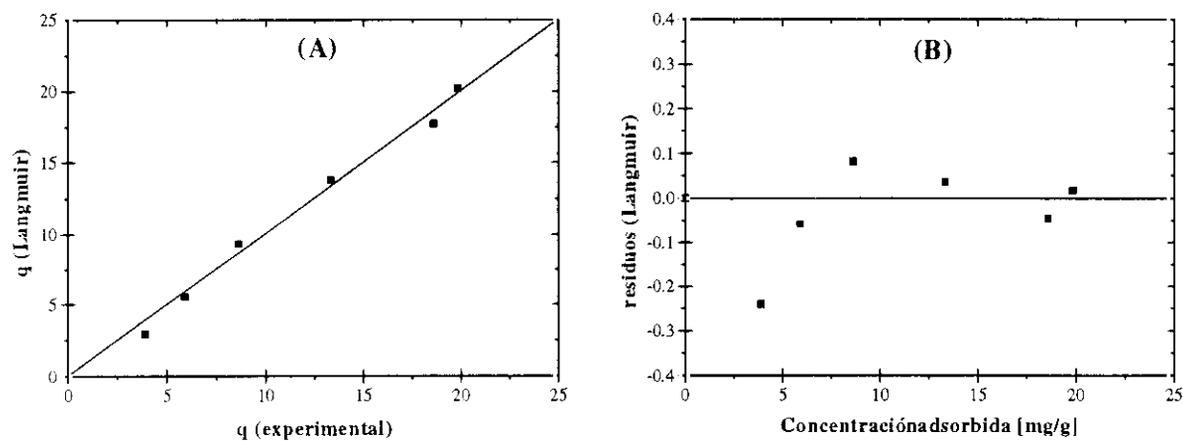
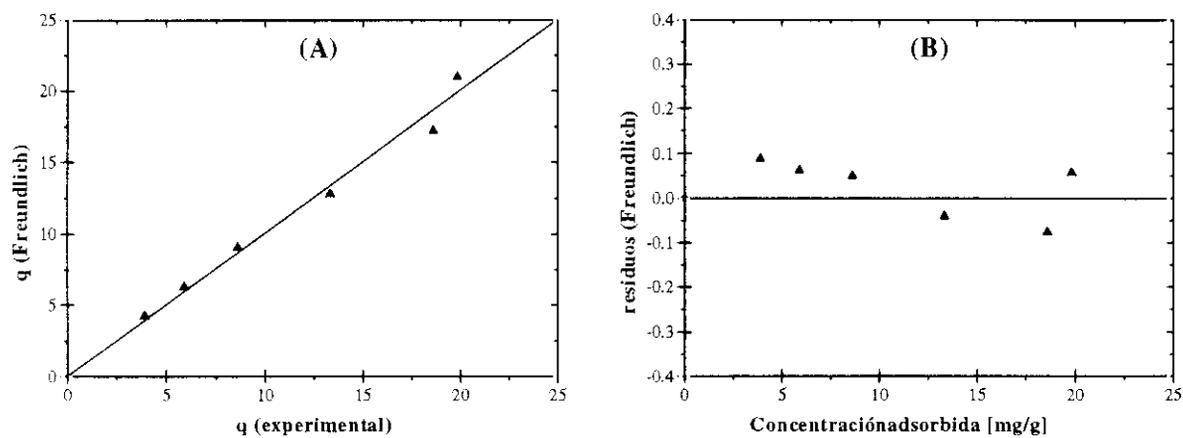
**Figura B.1:** Ajuste a la isoterma de Langmuir para la resina de HIC a 4 °C: (A) Valores de q predichos por el ajuste frente a los obtenidos experimentalmente y (B) análisis de residuos.**Figura B.2:** Ajuste a la isoterma de Freundlich para la resina de HIC a 4 °C: (A) Valores de q predichos por el ajuste frente a los obtenidos experimentalmente y (B) análisis de residuos.

Tabla B.2: Errores de cada uno de los ajustes de las isotermas de adsorción en Duolite XAD-761 a 20 °C.

| Isoterma | ϵ_R medio [%] | σ [%] |
|------------|------------------------|--------------|
| Langmuir | -1.0 (0.6) | 5.7 (2.9) |
| Freundlich | 3.7 | 11.2 |

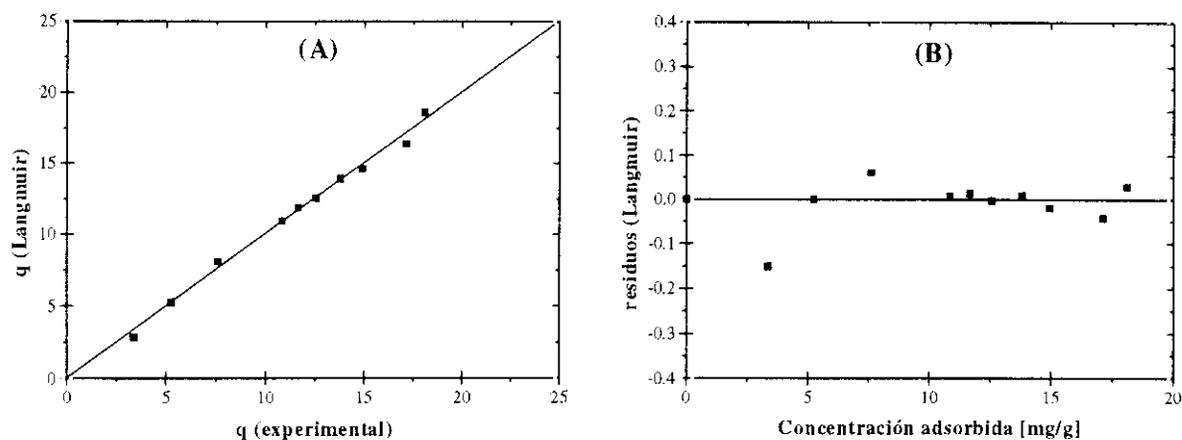


Figura B.3: Ajuste a la isoterma de Langmuir para la resina de HIC a 20 °C: (A) Valores de q predichos por el ajuste frente a los obtenidos experimentalmente y (B) análisis de residuos.

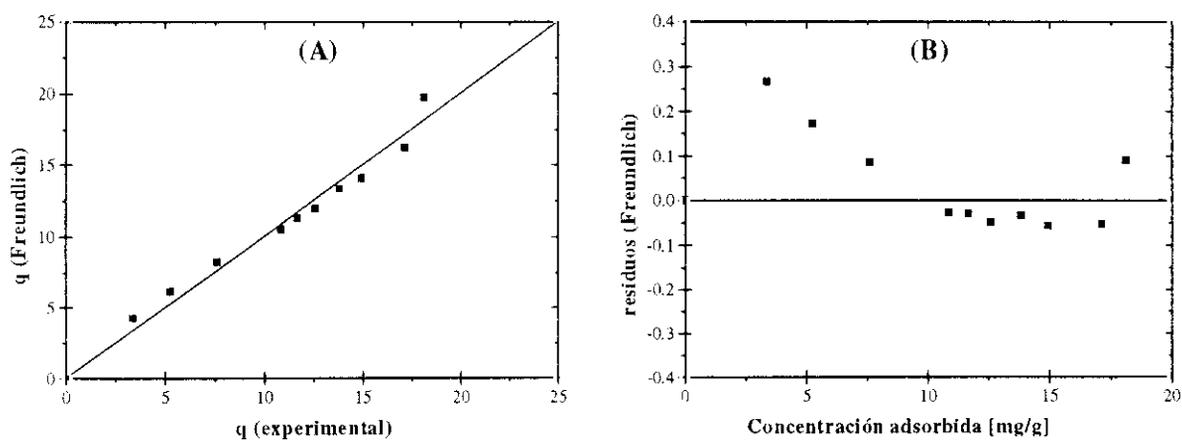


Figura B.4: Ajuste a la isoterma de Freundlich para la resina de HIC a 20 °C: (A) Valores de q predichos por el ajuste frente a los obtenidos experimentalmente y (B) análisis de residuos.

Tabla B.3: Errores de cada uno de los ajustes de las isotermas de adsorción en Duolite XAD-761 a 30 °C.

| Isoterma | ϵ_R medio [%] | σ [%] |
|------------|------------------------|--------------|
| Langmuir | 2.2 (2.2) | 7.0 (7.0) |
| Freundlich | 8.6 | 19.4 |

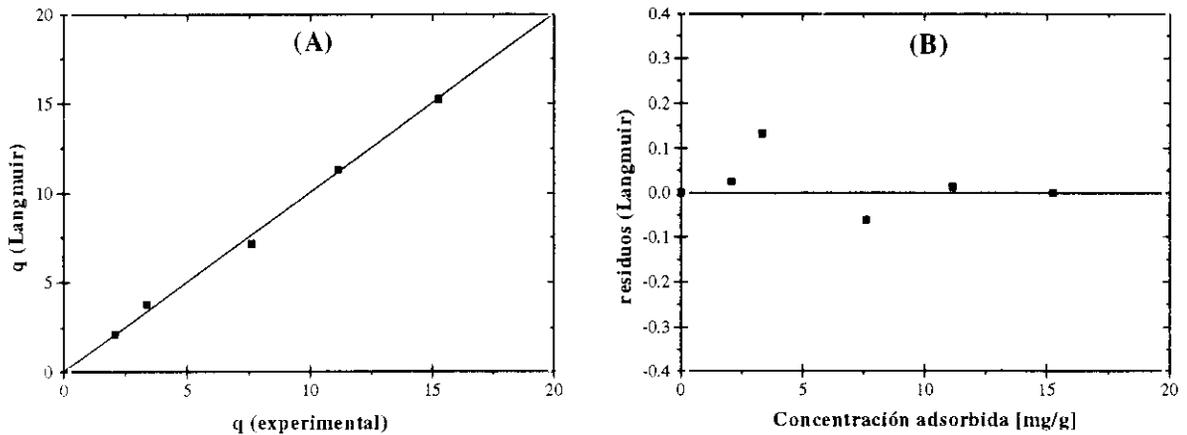
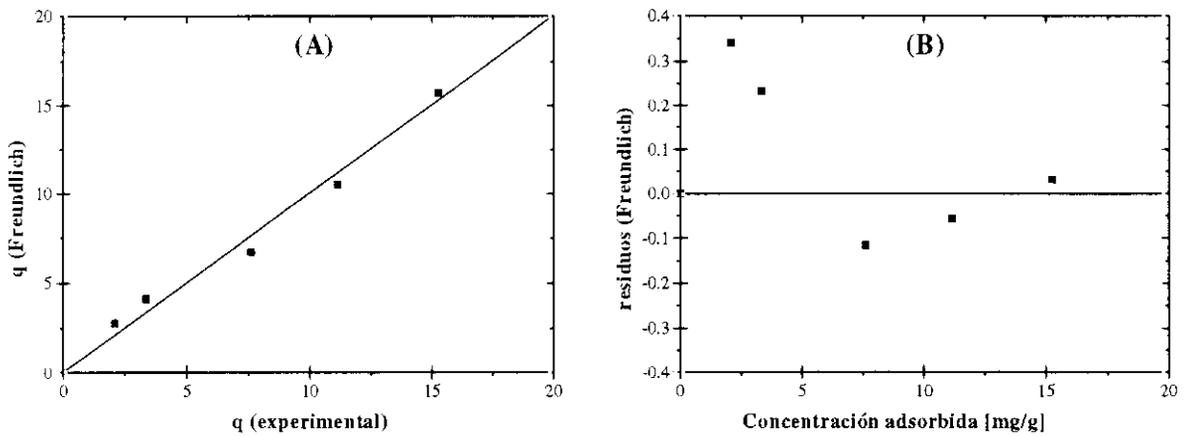
**Figura B.5:** Ajuste a la isoterma de Langmuir para la resina de HIC a 30 °C: (A) Valores de q predichos por el ajuste frente a los obtenidos experimentalmente y (B) análisis de residuos.**Figura B.6:** Ajuste a la isoterma de Freundlich para la resina de HIC a 30 °C: (A) Valores de q predichos por el ajuste frente a los obtenidos experimentalmente y (B) análisis de residuos.

Tabla B.4: Errores de cada uno de los ajustes de las isotermas de adsorción en Duolite A-568 a 20 °C.

| Isoterma | ε_R medio [%] | σ [%] |
|------------|---------------------------|--------------|
| Langmuir | -6.8 (2.0) | 17.7 (4.0) |
| Freundlich | 1.1 | 6.1 |

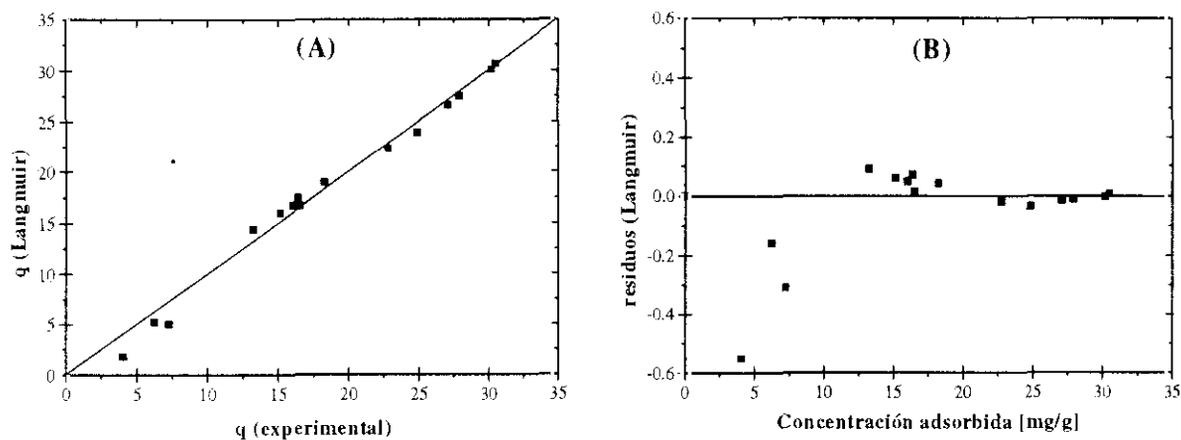


Figura B.7: Ajuste a la isoterma de Langmuir para la resina de IEC a 20 °C: (A) Valores de q predichos por el ajuste frente a los obtenidos experimentalmente y (B) análisis de residuos.

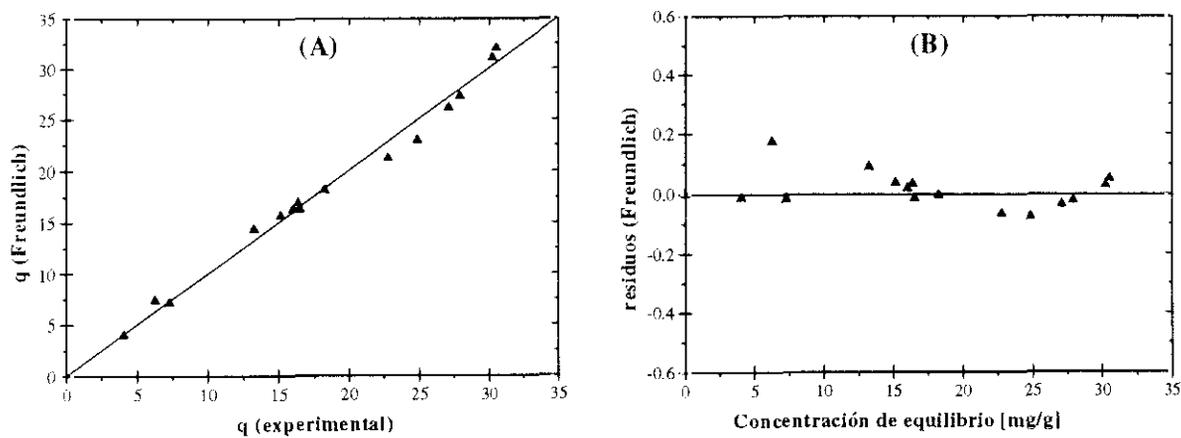


Figura B.8: Ajuste a la isoterma de Freundlich para la resina de IEC a 20 °C: (A) Valores de q predichos por el ajuste frente a los obtenidos experimentalmente y (B) análisis de residuos.

Tabla B.5: Errores de cada uno de los ajustes de las isothermas de adsorción en Duolite A-568 a 25 °C.

| Isoterma | ε_R medio [%] | σ [%] |
|------------|---------------------------|--------------|
| Langmuir | -3.6 (-1.1) | 9.0 (5.1) |
| Freundlich | 6.4 | 14.1 |

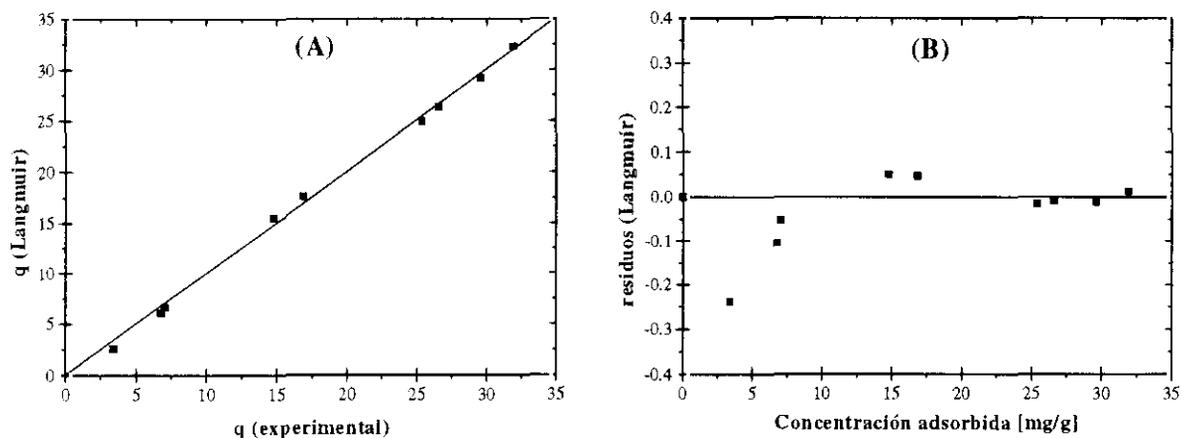
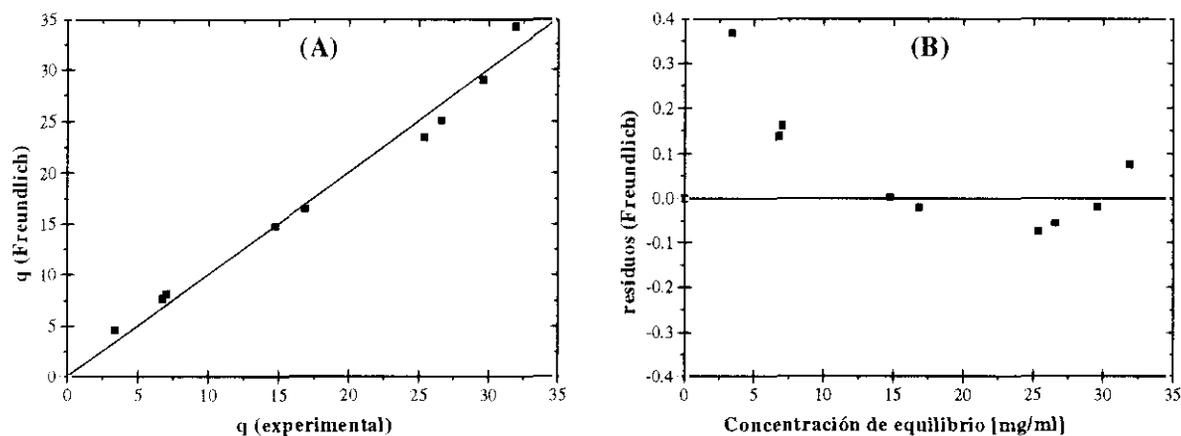
**Figura B.9:** Ajuste a la isoterma de Langmuir para la resina de IEC a 25 °C: (A) Valores de q predichos por el ajuste frente a los obtenidos experimentalmente y (B) análisis de residuos.**Figura B.10:** Ajuste a la isoterma de Freundlich para la resina de IEC a 25 °C: (A) Valores de q predichos por el ajuste frente a los obtenidos experimentalmente y (B) análisis de residuos.

Tabla B.6: Errores de cada uno de los ajustes de las isothermas de adsorción en Duolite A-568 a 30 °C.

| Isoterma | ϵ_R medio [%] | σ [%] |
|------------|------------------------|--------------|
| Langmuir | -4.4 (1.8) | 9.6 (3.1) |
| Freundlich | 4.9 | 12.6 |

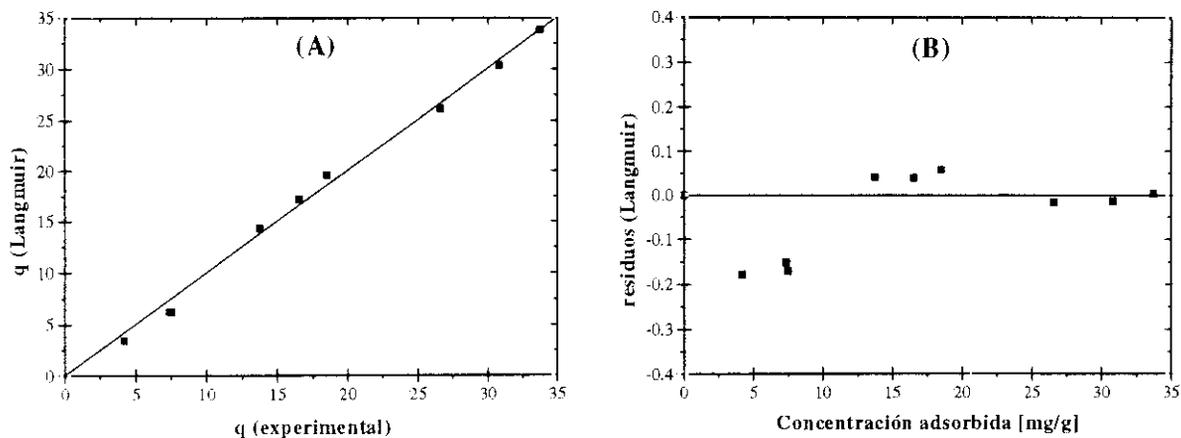


Figura B.11: Ajuste a la isoterma de Langmuir para la resina de IEC a 30 °C: (A) Valores de q predichos por el ajuste frente a los obtenidos experimentalmente y (B) análisis de residuos.

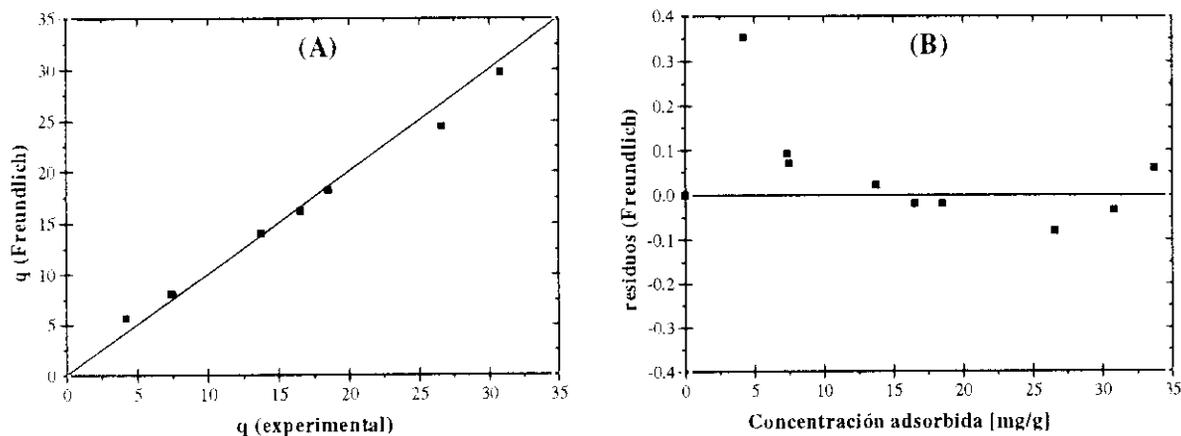


Figura B.12: Ajuste a la isoterma de Freundlich para la resina de IEC a 30 °C: (A) Valores de q predichos por el ajuste frente a los obtenidos experimentalmente y (B) análisis de residuos.

Tabla B.7: Constantes de equilibrio de Henry válidas para baja concentración en el sistema α -amilasa/HIC .

| Temperatura [°C] | K_A |
|------------------|----------------|
| 4.0 | 17.8 ± 0.4 |
| 20.0 | 14.1 ± 0.6 |
| 30.0 | 8.4 ± 0.1 |

Tabla B.8: Constantes de equilibrio de Henry válidas para baja concentración en el sistema α -amilasa/IEC .

| Temperatura [°C] | K_A |
|------------------|----------------|
| 20.0 | 35.2 ± 3.2 |
| 25.0 | 36.2 ± 1.8 |
| 30.0 | 42.8 ± 0.8 |

ANEXO C. FIGURAS

C.1.- EXPERIMENTOS DE ADSORCIÓN EN TANQUE AGITADO

A continuación se representan los resultados experimentales de la adsorción de α -amilasa en las resinas de HIC e IEC (figuras C.1 a C.8). En las figuras C.9 a C.24 se muestran los ajustes de los datos experimentales al modelo matemático propuesto. Por último, en la figura C.25 se representa gráficamente un ejemplo de la optimización llevada a cabo para la determinación del coeficiente de difusión en los poros en la que se minimiza el valor de la función objetivo, Φ , decrita en la ecuación A.16 del anexo A.

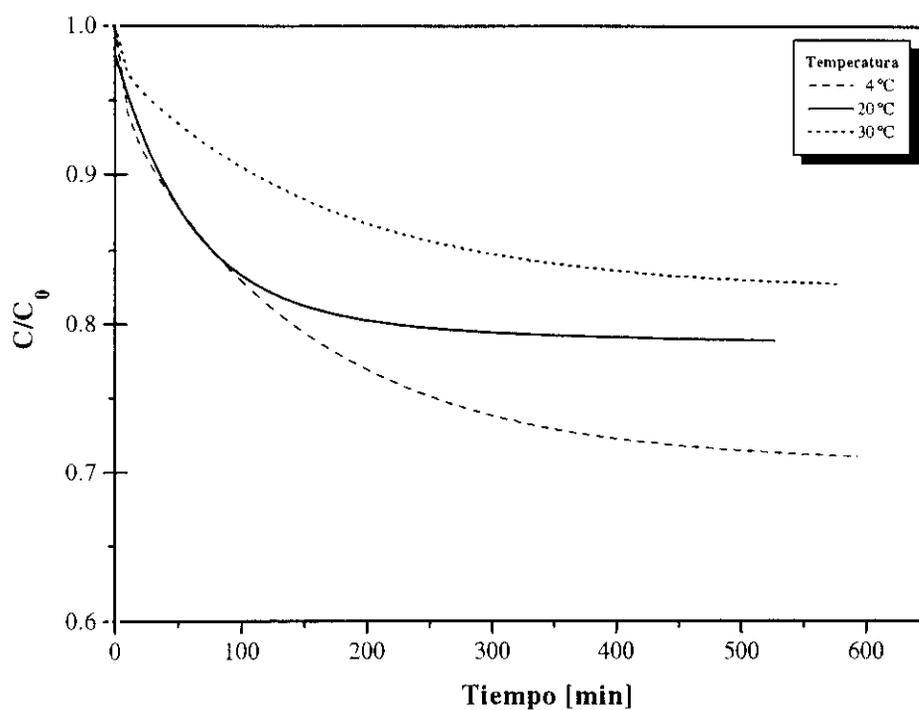


Figura C.1: Comparación de la cinética de adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 a diferentes temperaturas para una concentración inicial de 0.10 mg/ml.

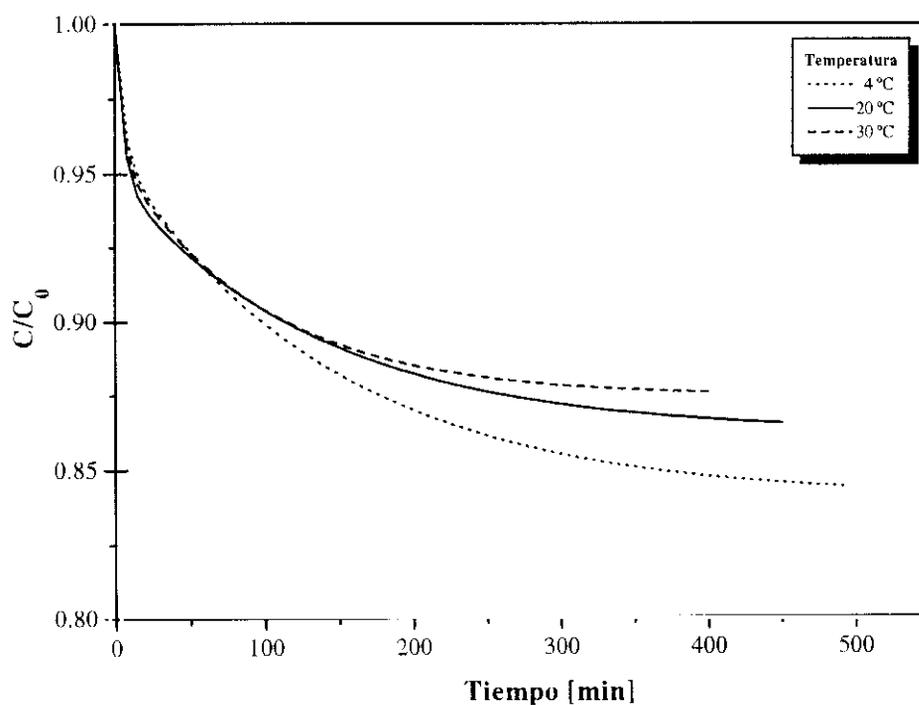


Figura C.2: Comparación de la cinética de adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 a diferentes temperaturas para una concentración inicial de 0.25 mg/ml.

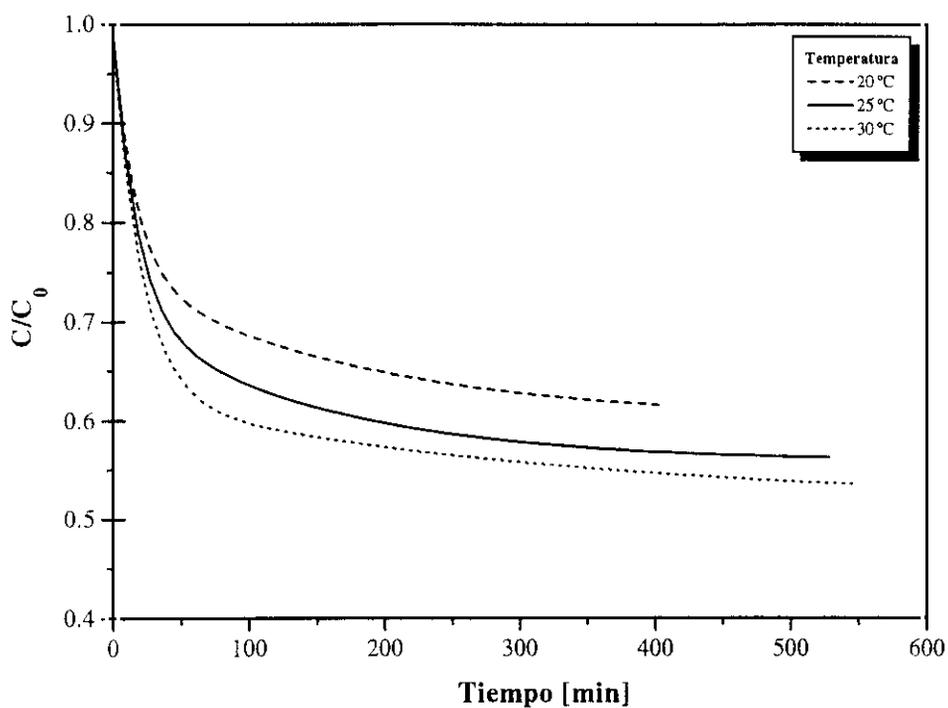


Figura C.3: Comparación de la cinética de adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 a diferentes temperaturas para una concentración inicial de 0.10 mg/ml.

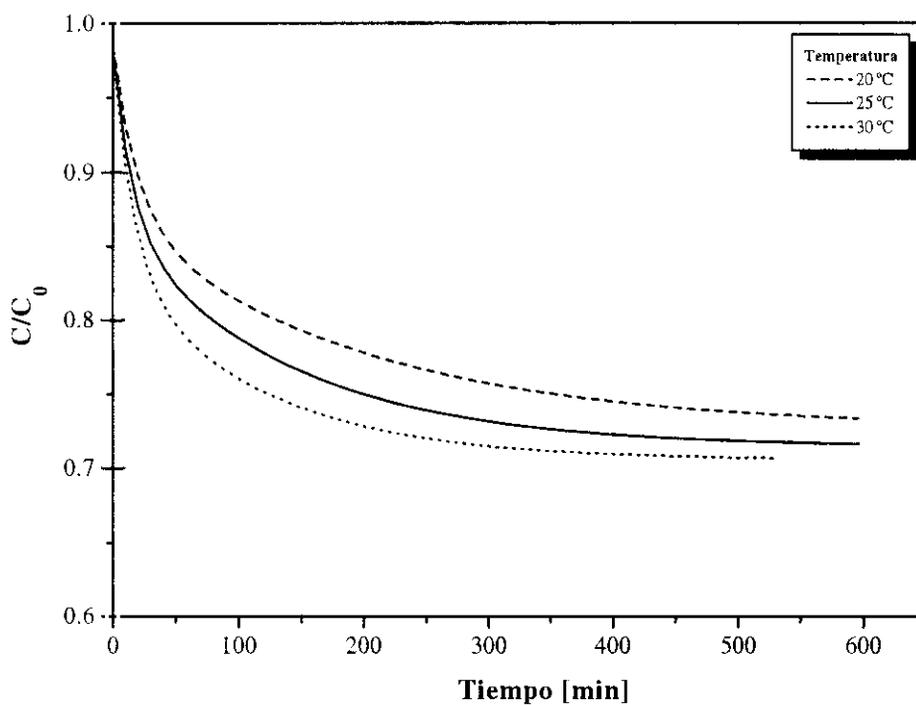


Figura C.4: Comparación de la cinética de adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 a diferentes temperaturas para una concentración inicial de 0.25 mg/ml.

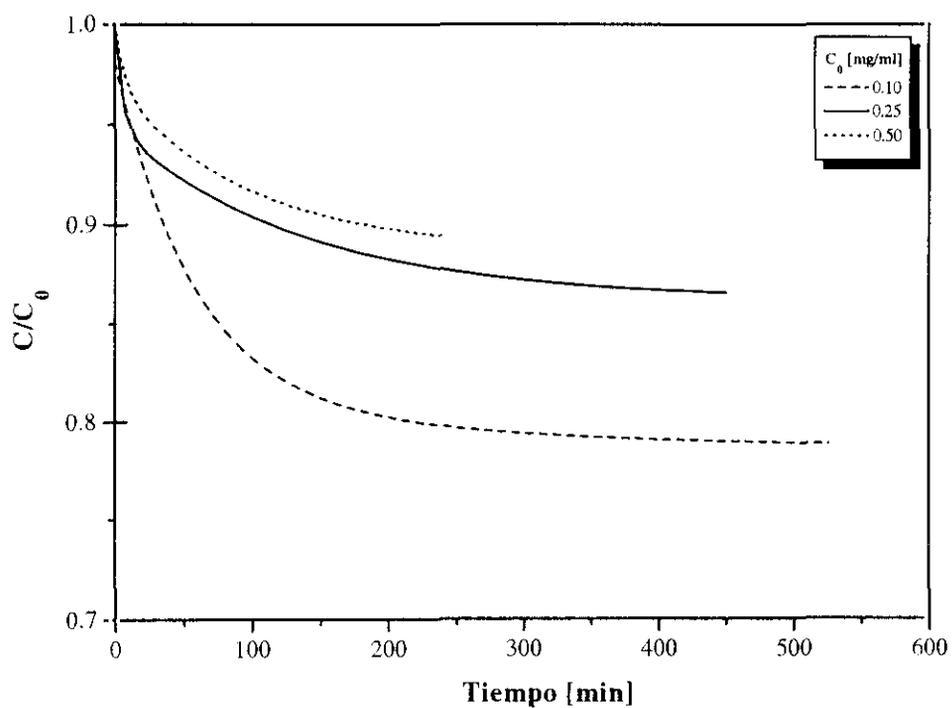


Figura C.5: Comparación de la cinética de adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 para diferentes concentraciones iniciales de adsorbato llevadas a cabo a 20 °C.

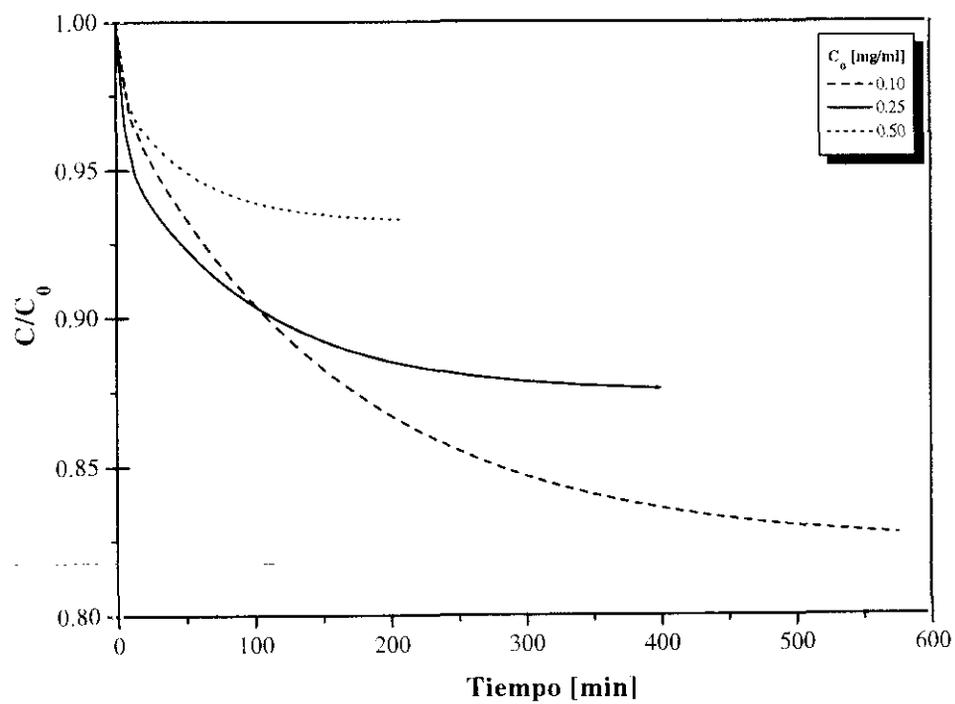


Figura C.6: Comparación de la cinética de adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 para diferentes concentraciones iniciales de adsorbato llevadas a cabo a 30 °C.

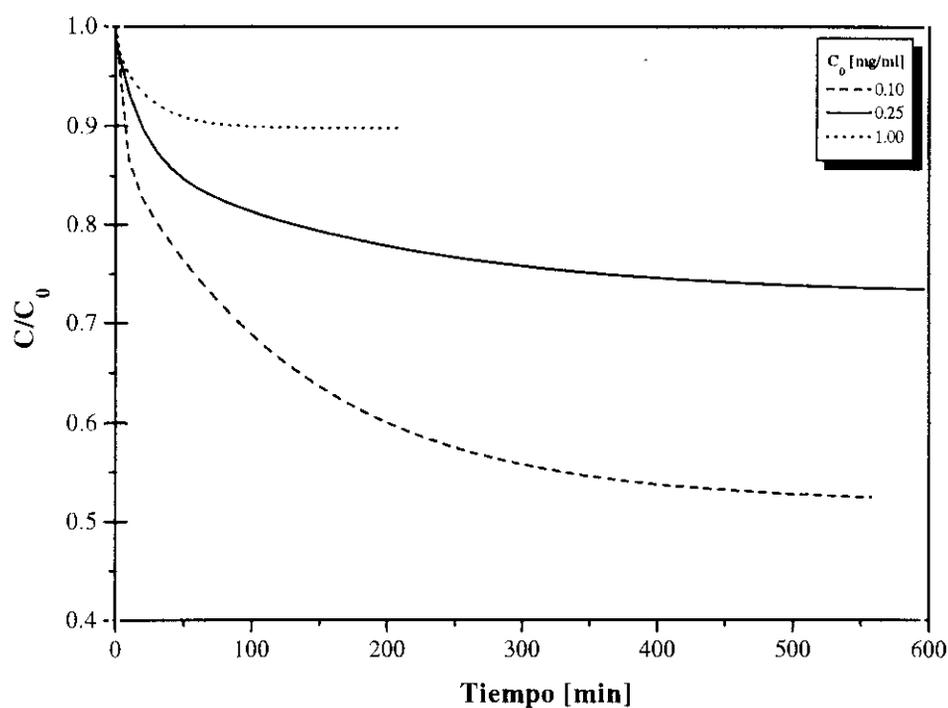


Figura C.7: Comparación de la cinética de adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 para diferentes concentraciones iniciales de adsorbato llevadas a cabo a 20 °C.

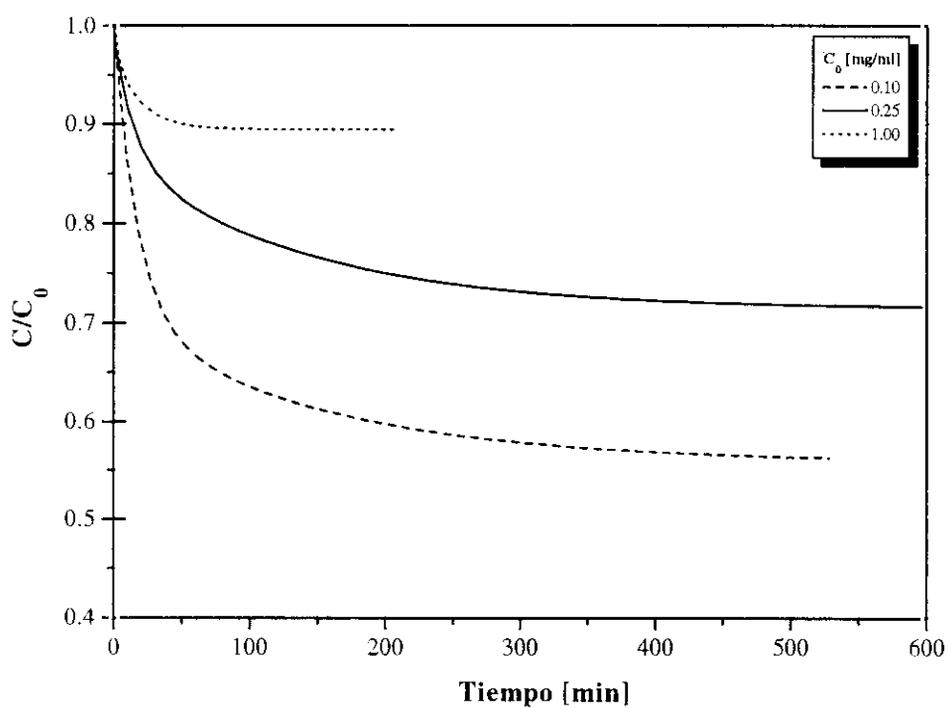


Figura C.8: Comparación de la cinética de adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 para diferentes concentraciones iniciales de adsorbato llevadas a cabo a 25 °C.

C.2.- EXPERIMENTOS DE ADSORCIÓN EN LECHO FIJO

En el presente apartado se muestran las gráficas correspondientes a las curvas de ruptura experimentales para cada uno de los dos adsorbentes en las condiciones de operación estudiadas. Se compara la influencia del caudal, la temperatura, la concentración a la entrada de la columna, el tamaño de partícula y la altura del lecho. La explicación y comentario de las gráficas que a continuación se muestran se encuentra en el apartado 6.4.

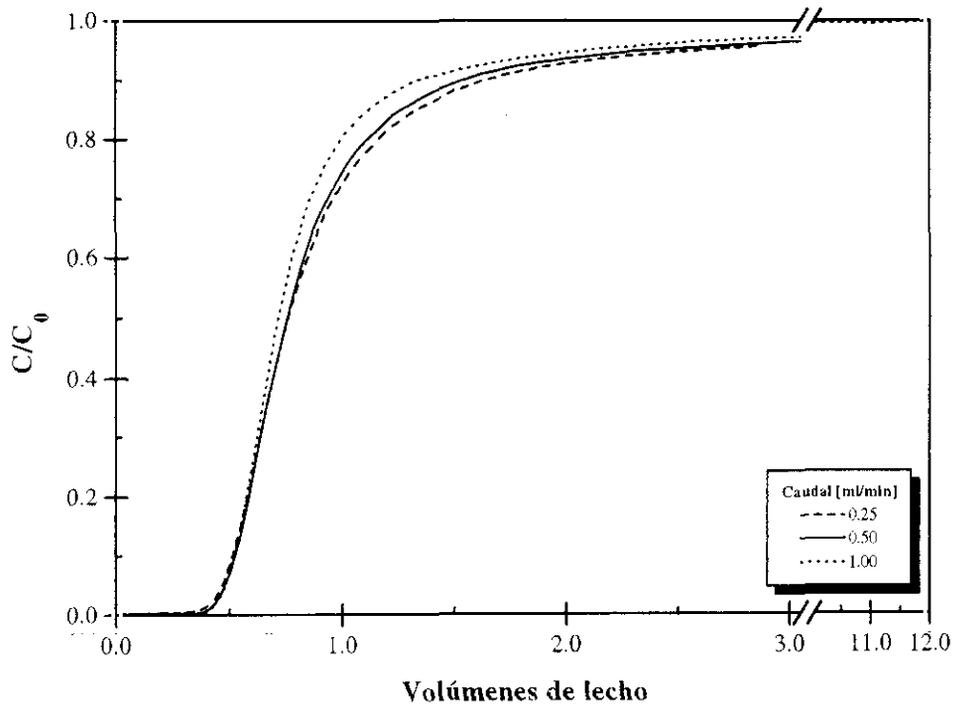


Figura C.9: Efecto del caudal sobre las curvas de ruptura correspondientes a la columna de HIC para una concentración de entrada de 0.50 mg/ml a 20.0 °C.

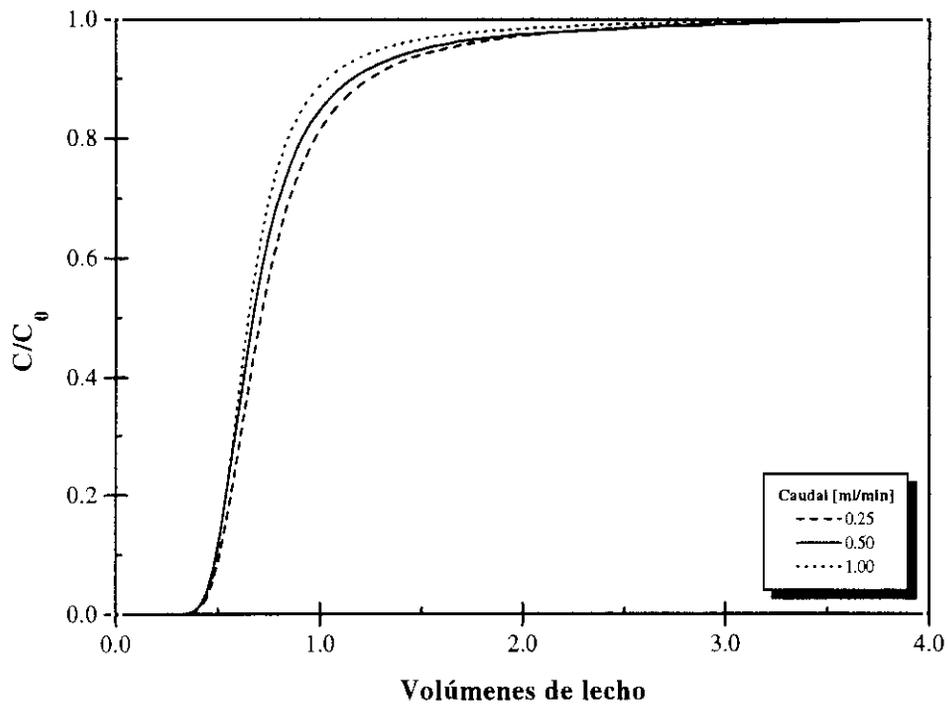


Figura C.10: Efecto del caudal sobre las curvas de ruptura correspondientes a la columna de HIC para una concentración de entrada de 2.50 mg/ml a 20.0 °C.

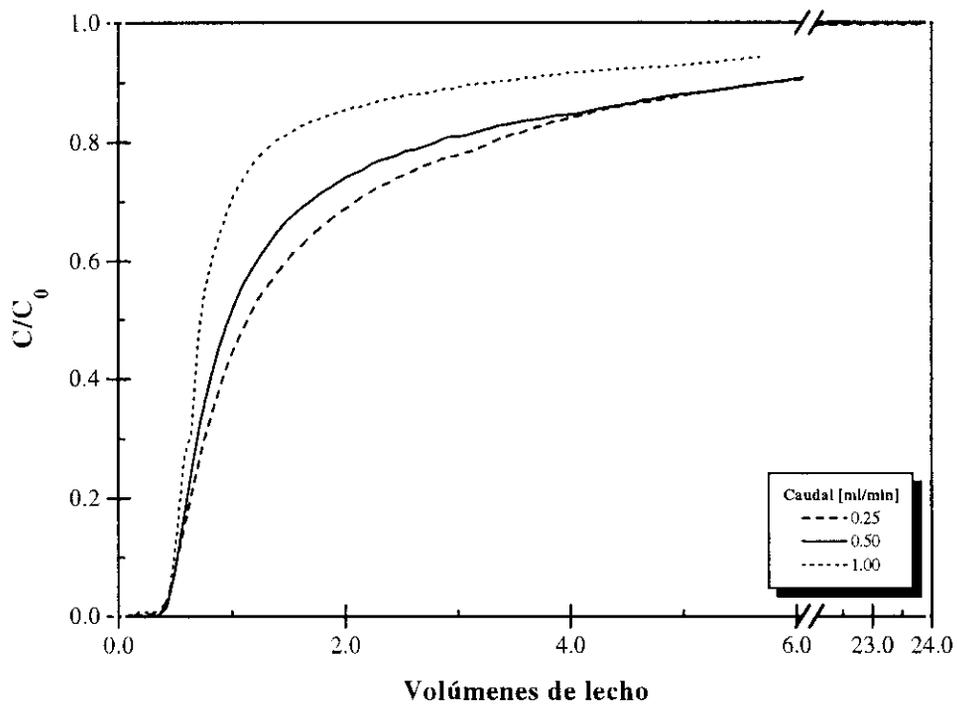


Figura C.11: Efecto del caudal sobre las curvas de ruptura correspondientes a la columna de IEC para una concentración de entrada de 0.50 mg/ml a 25.0 °C.

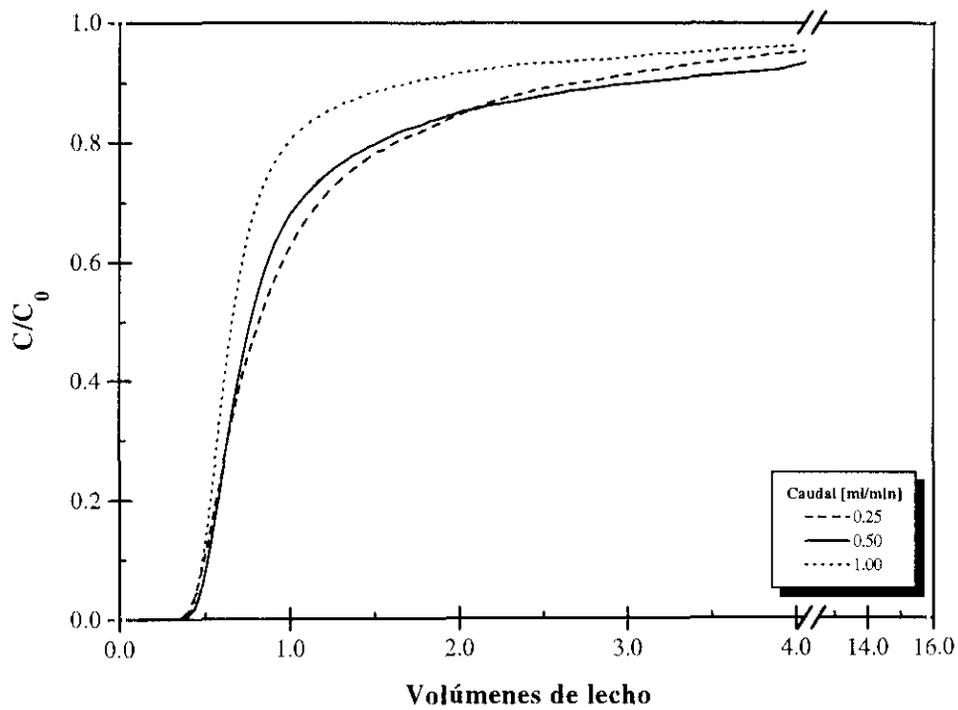


Figura C.12: Efecto del caudal sobre las curvas de ruptura correspondientes a la columna de IEC para una concentración de entrada de 2.50 mg/ml a 25.0 °C.

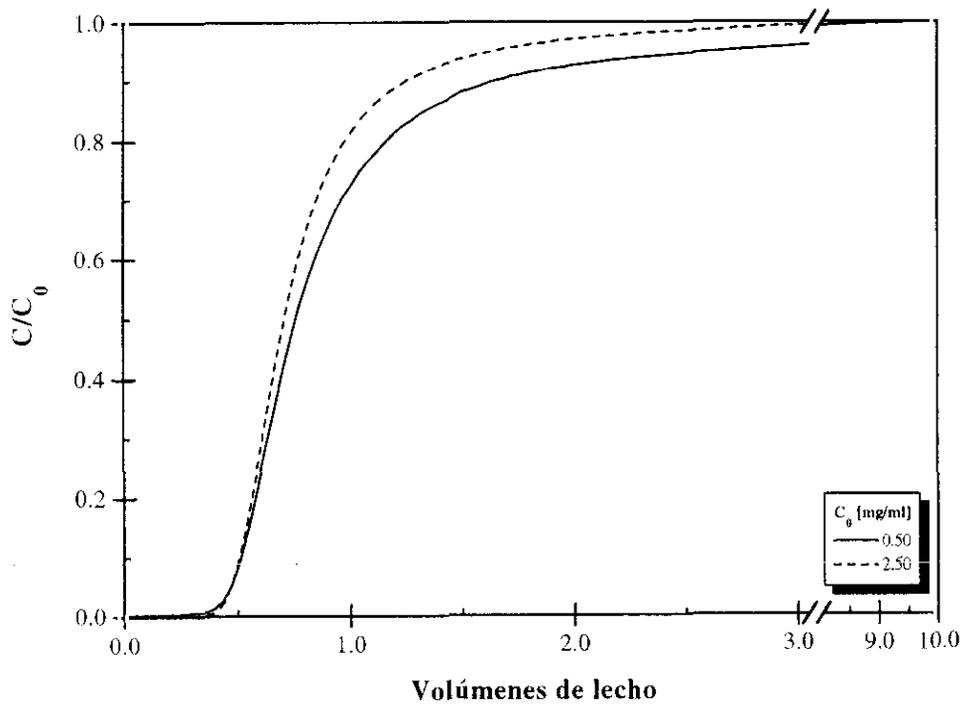


Figura C.13: Efecto de la concentración de alimentación sobre las curvas de ruptura correspondientes a la columna de HIC para un caudal de 0.25 ml/min a 20.0 °C.

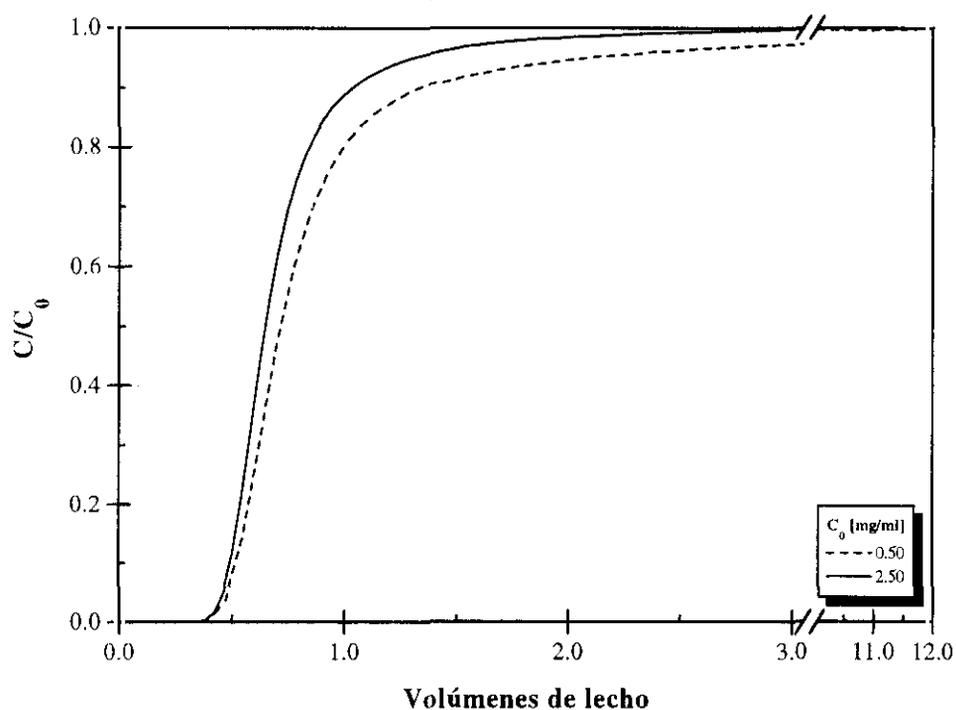


Figura C.14: Efecto de la concentración de alimentación sobre las curvas de ruptura correspondientes a la columna de HIC para un caudal de 1.00 ml/min a 20.0 °C.

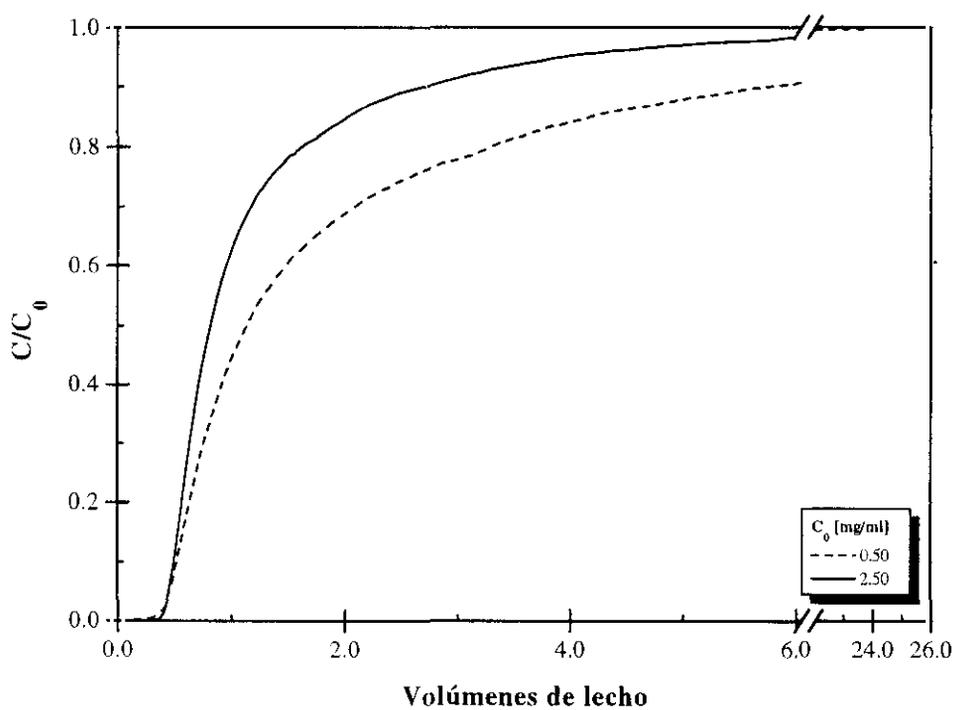


Figura C.15: Efecto de la concentración de alimentación sobre las curvas de ruptura correspondientes a la columna de IEC para un caudal de 0.25 ml/min a 25.0 °C.

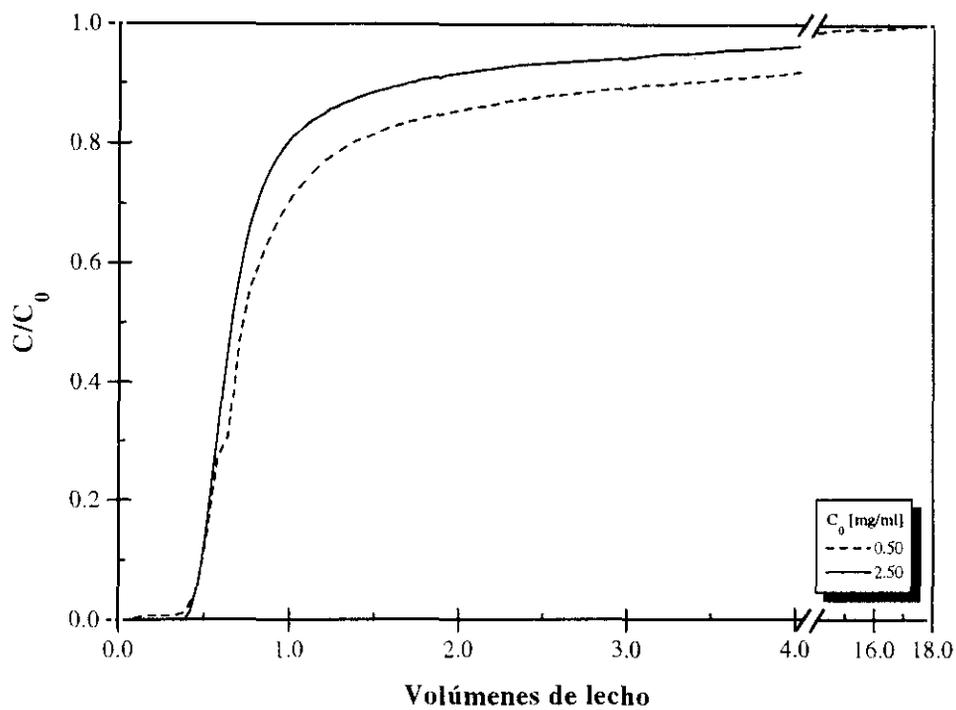


Figura C.16: Efecto de la concentración de alimentación sobre las curvas de ruptura correspondientes a la columna de IEC para un caudal de 1.00 ml/min a 25.0 °C.

C.3.- MODELADO DE LA ADSORCIÓN EN TANQUE AGITADO DISCONTINUO

A continuación se presentan las gráficas en las que se comparan las curvas obtenidas experimentalmente con las correspondientes predichas por el modelo matemático con el valor del coeficiente de difusión en los poros obtenido mediante optimación.

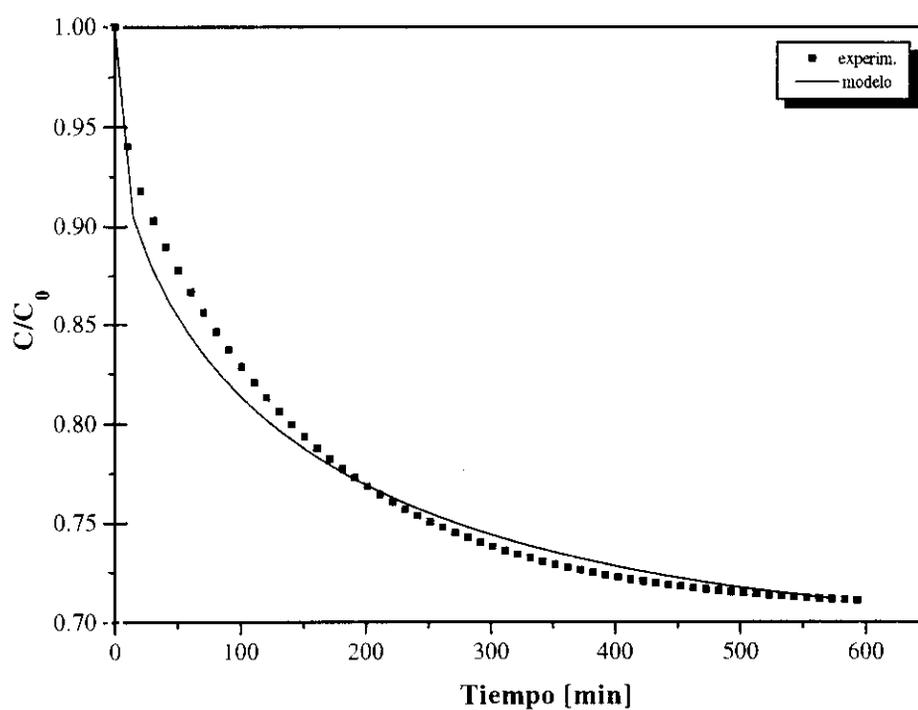


Figura C.17: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 2.32 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 a 4 °C y una concentración inicial de 0.10 mg/ml.

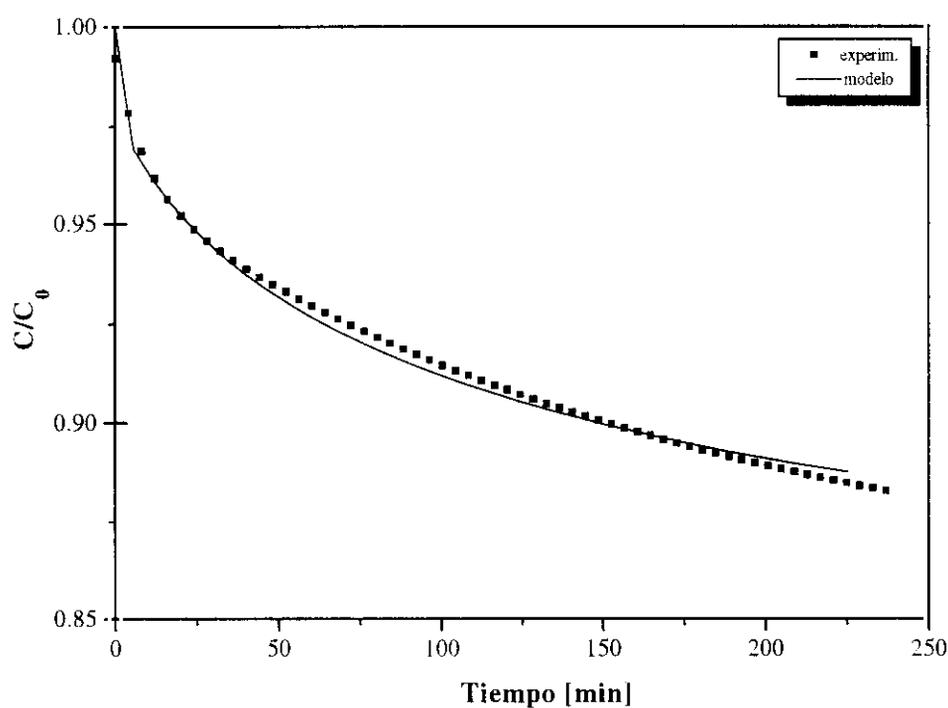


Figura C.18: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 1.32 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 a 4 °C y una concentración inicial de 0.50 mg/ml.

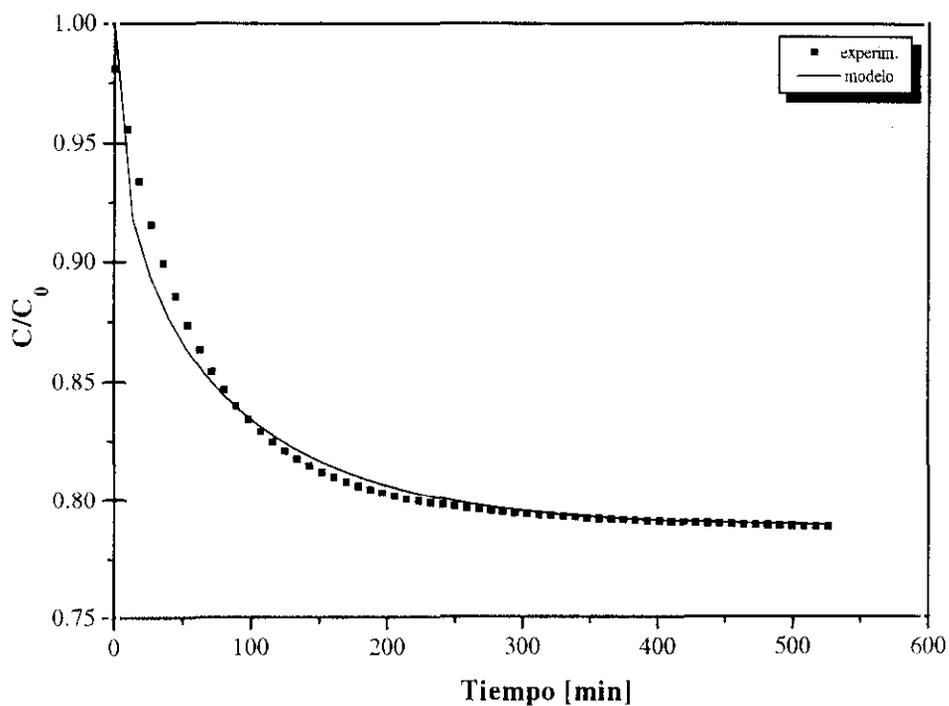


Figura C.19: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 3.72 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 a 20 °C y una concentración inicial de 0.10 mg/ml.

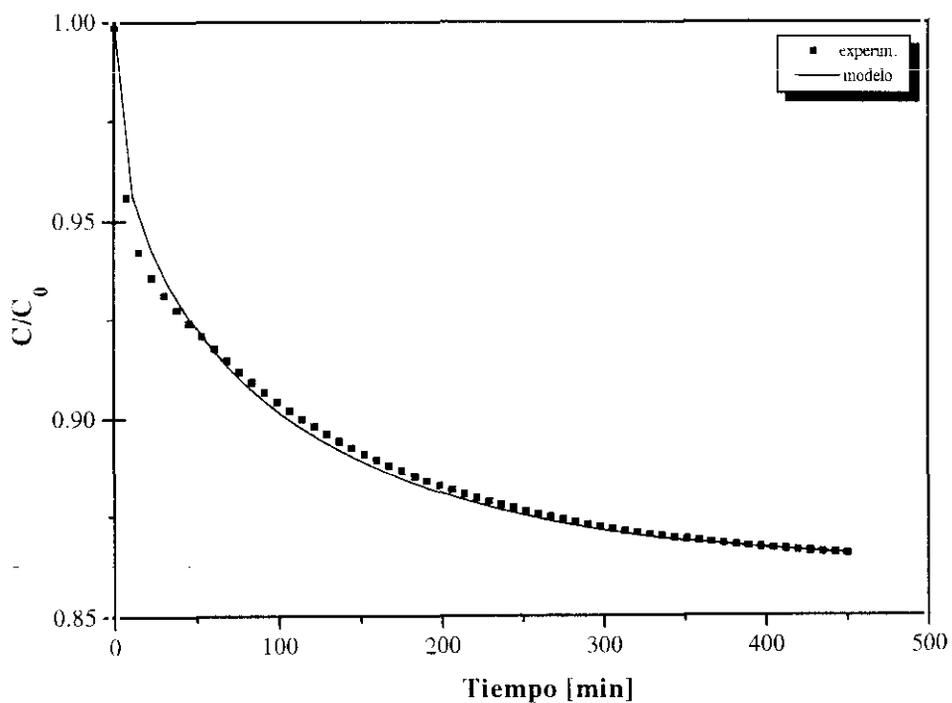


Figura C.20: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 1.76 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 a 20 °C y una concentración inicial de 0.25 mg/ml.

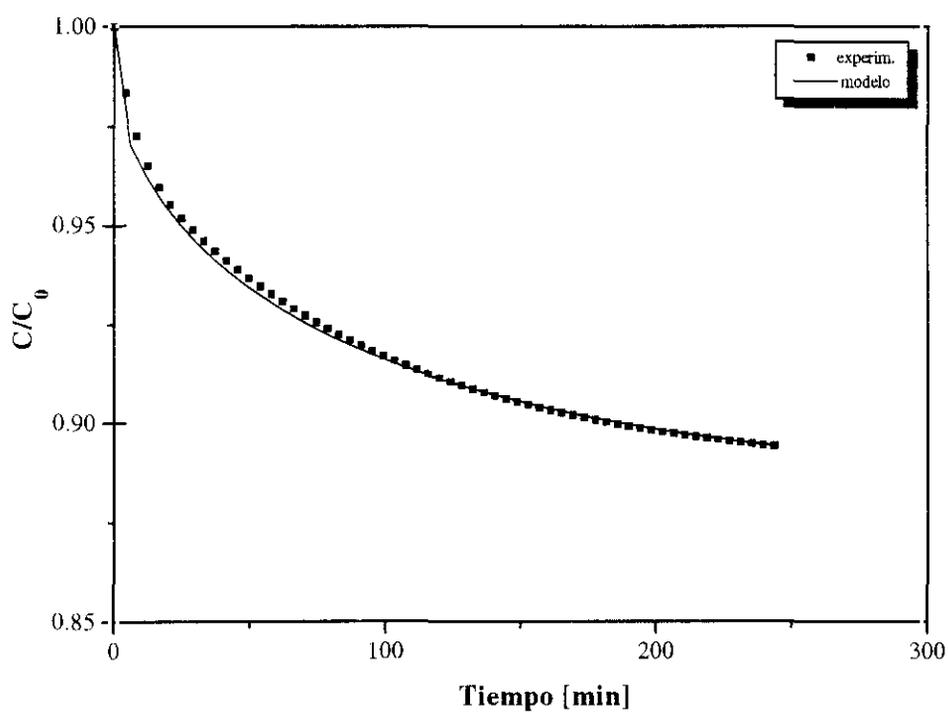


Figura C.21: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 1.52 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 a 20 °C y una concentración inicial de 0.50 mg/ml.

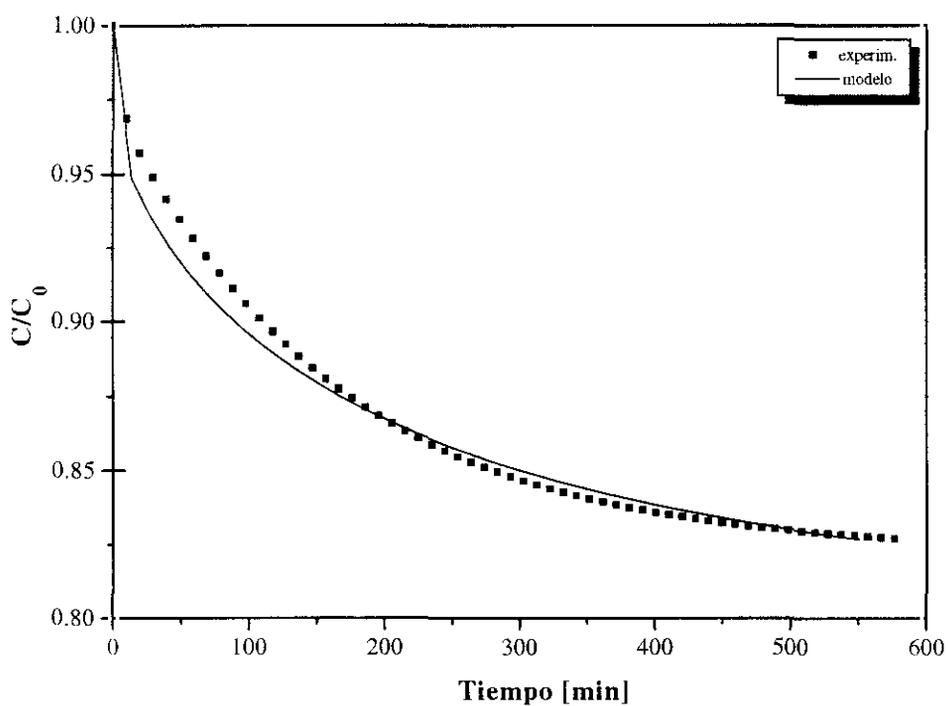


Figura C.22: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 1.10 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 a 30 °C y una concentración inicial de 0.10 mg/ml.

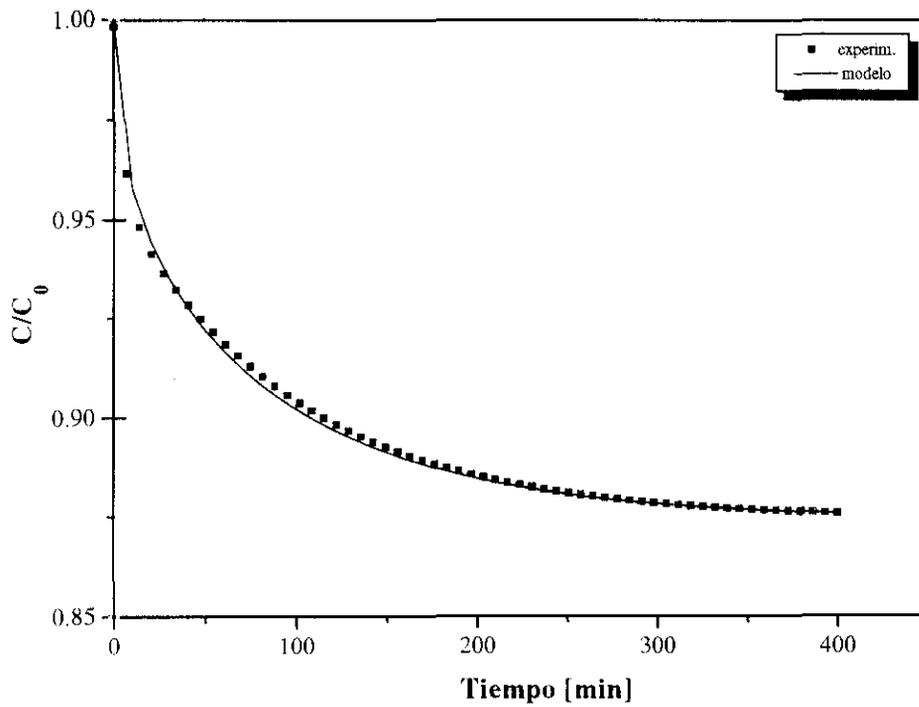


Figura C.23: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 2.15 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 a 30 °C y una concentración inicial de 0.25 mg/ml.

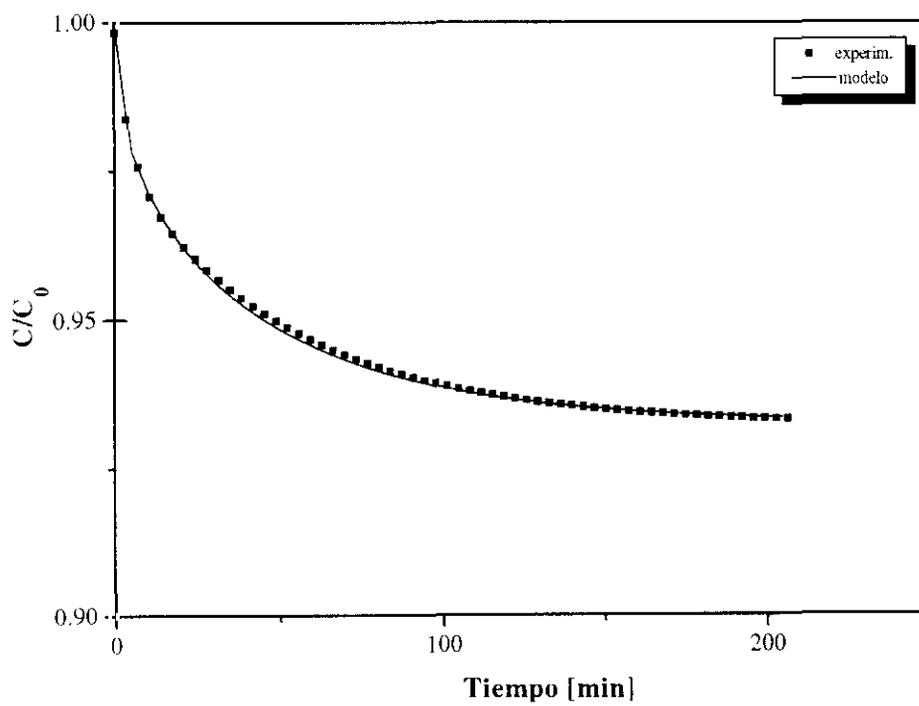


Figura C.24: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 2.11 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite XAD-761 a 30 °C y una concentración inicial de 0.50 mg/ml.

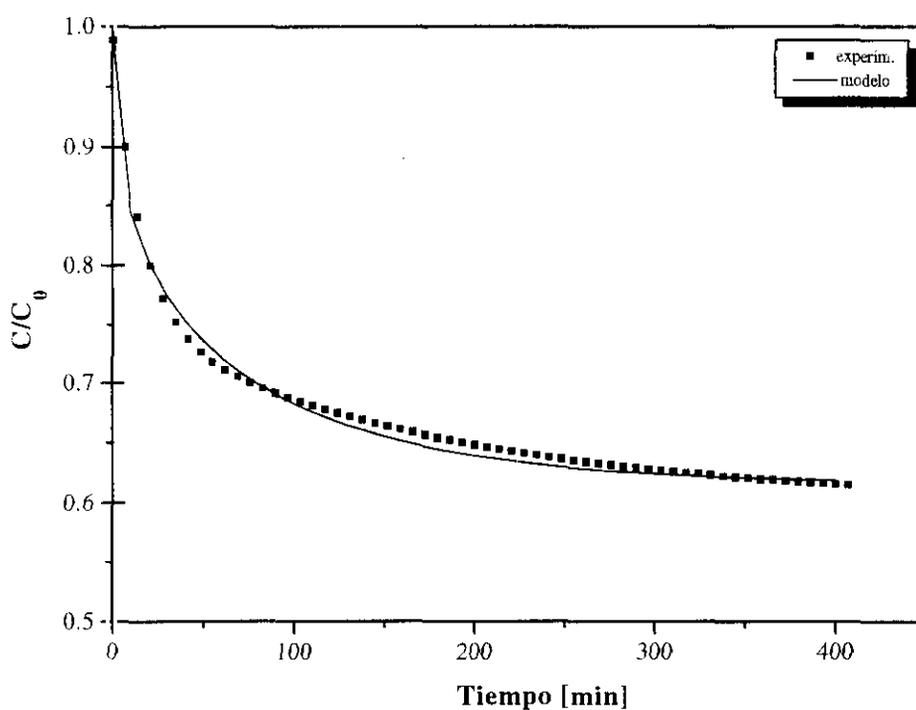


Figura C.25: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 5.20 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 a 20 °C y una concentración inicial de 0.10 mg/ml.

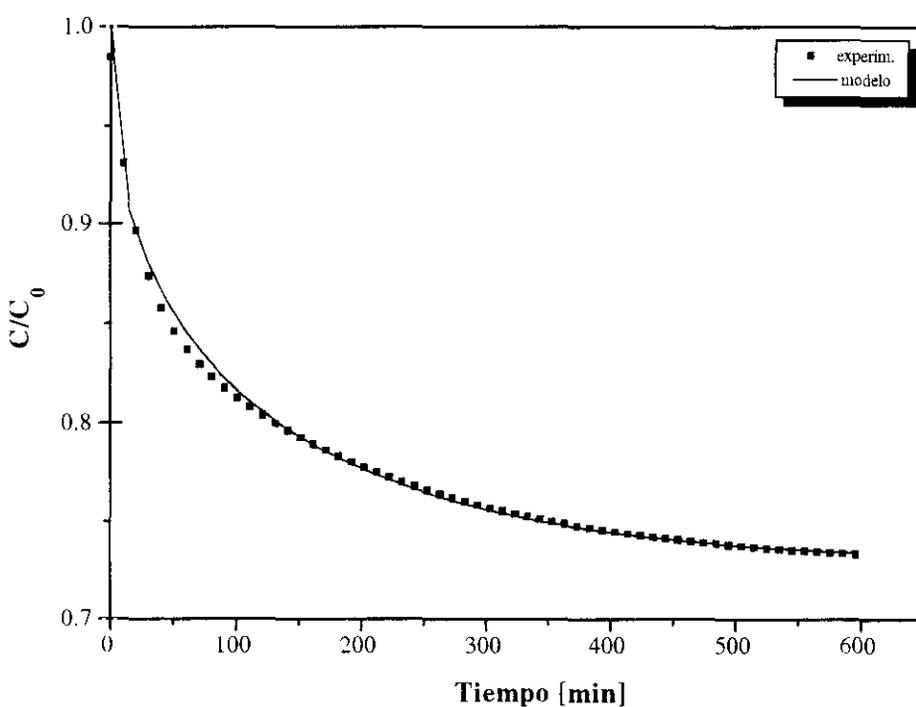


Figura C.26: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 2.21 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 a 20 °C y una concentración inicial de 0.25 mg/ml.

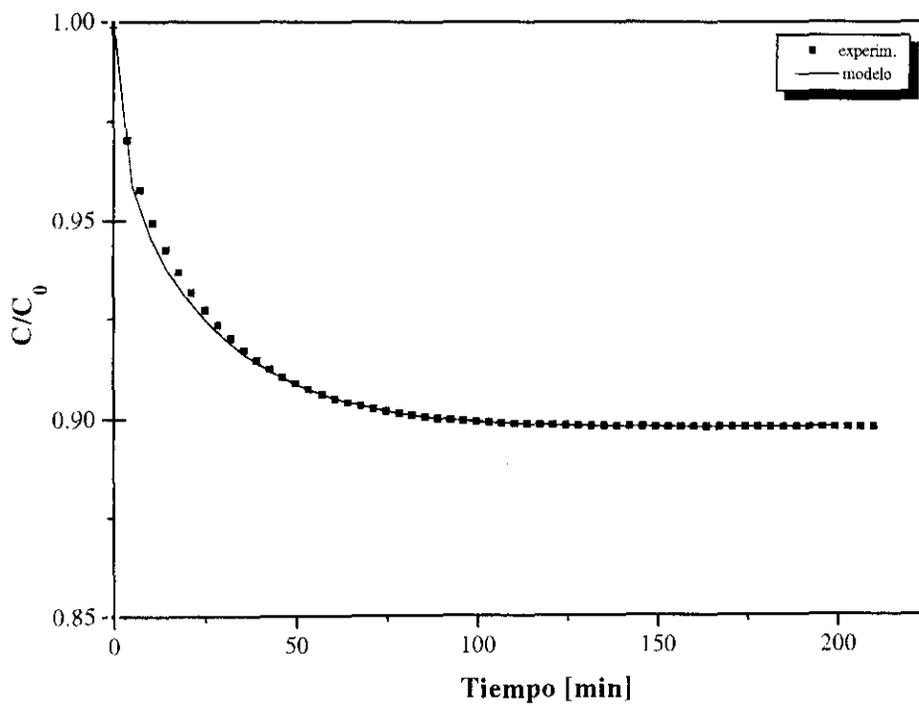


Figura C.27: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 2.08 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 a 20 °C y una concentración inicial de 1.00 mg/ml.

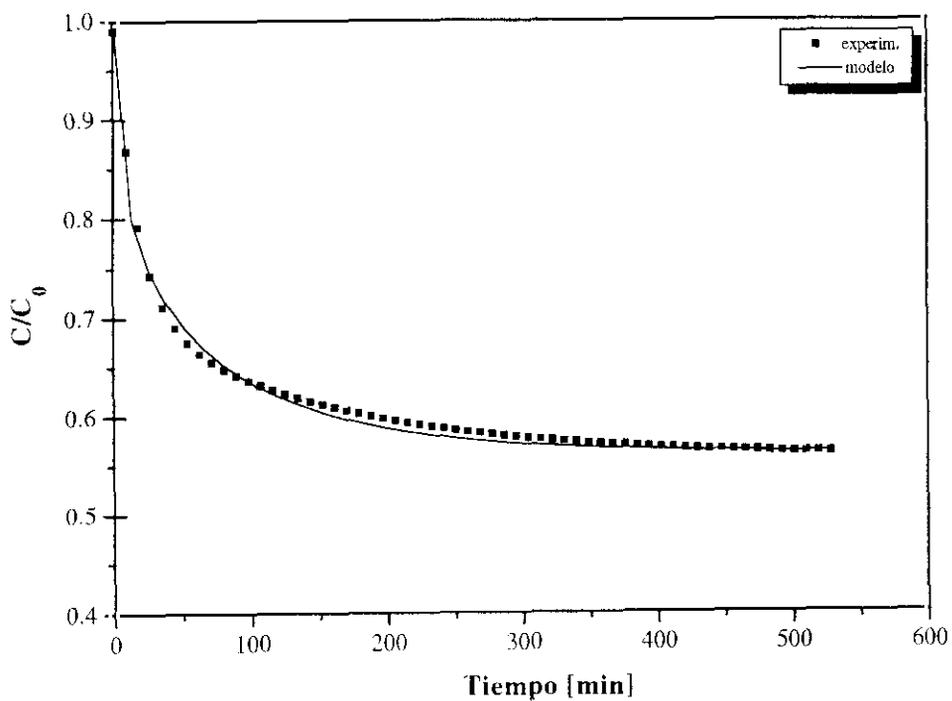


Figura C.28: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 6.02 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 a 25 °C y una concentración inicial de 0.10 mg/ml.

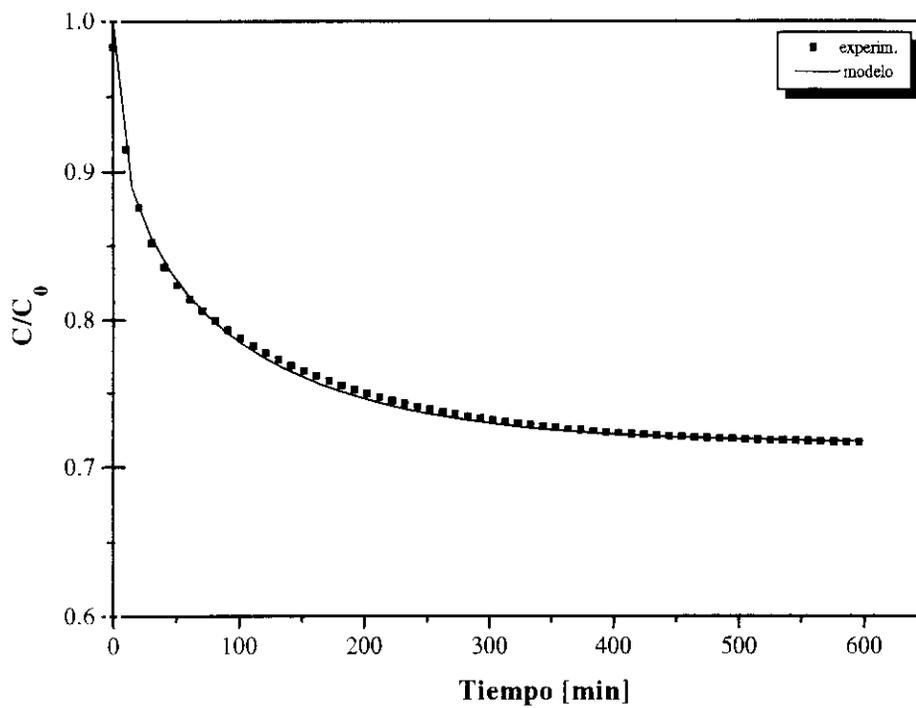


Figura C.29: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 2.41 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 a 25 °C y una concentración inicial de 0.25 mg/ml.

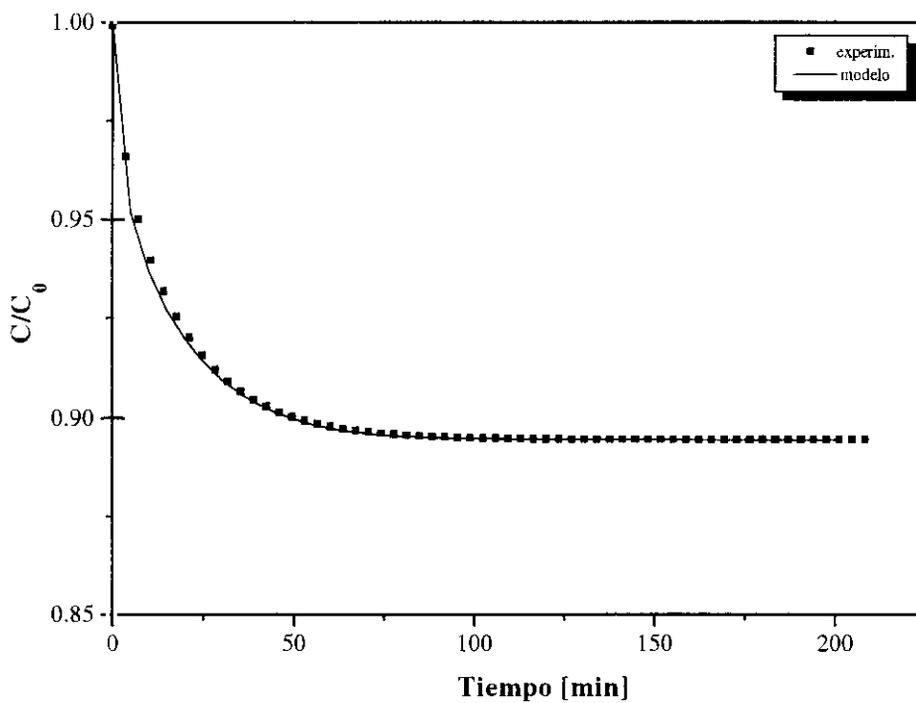


Figura C.30: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 2.55 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 a 25 °C y una concentración inicial de 1.00 mg/ml.

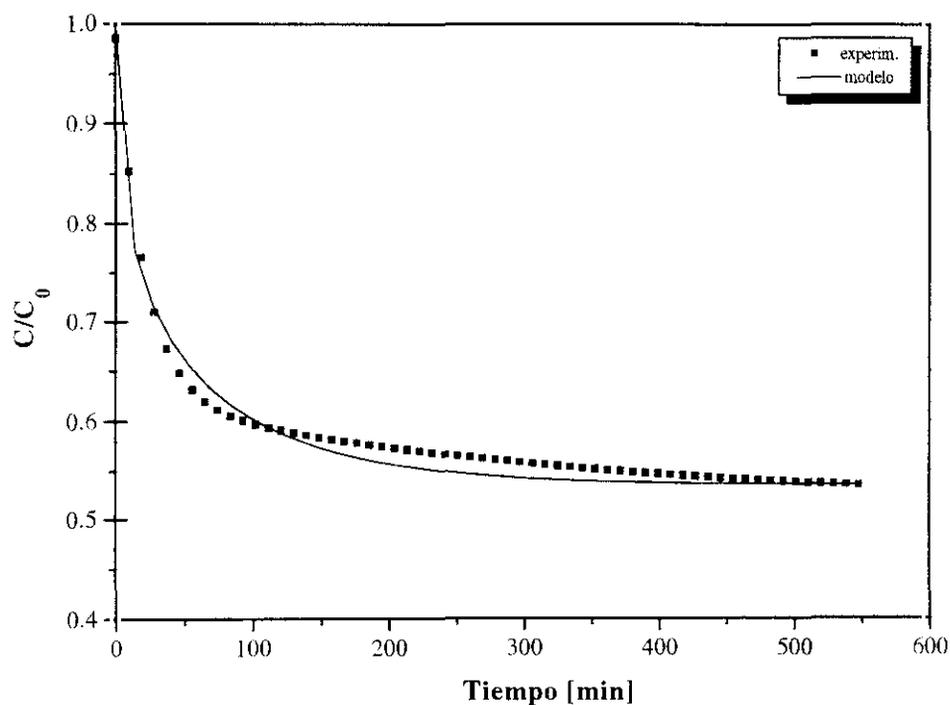


Figura C.31: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 7.41 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 a 30 °C y una concentración inicial de 0.10 mg/ml.

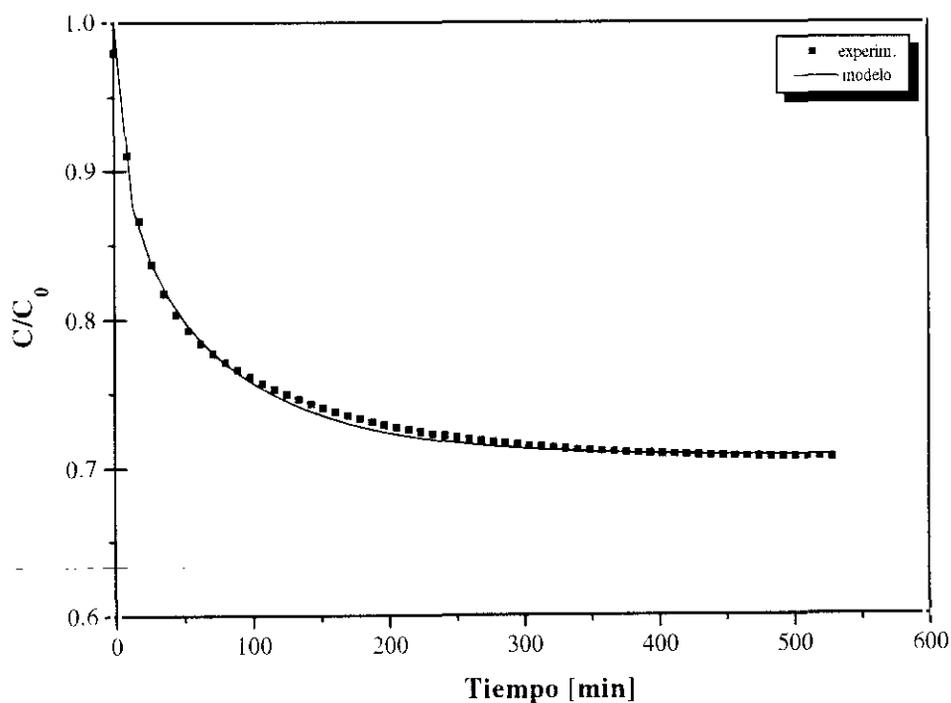


Figura C.32: Curvas, experimental y teórica ($D_p = 2.75 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), de la adsorción de α -amilasa en Duolite A-568 a 30 °C y una concentración inicial de 1.00 mg/ml.

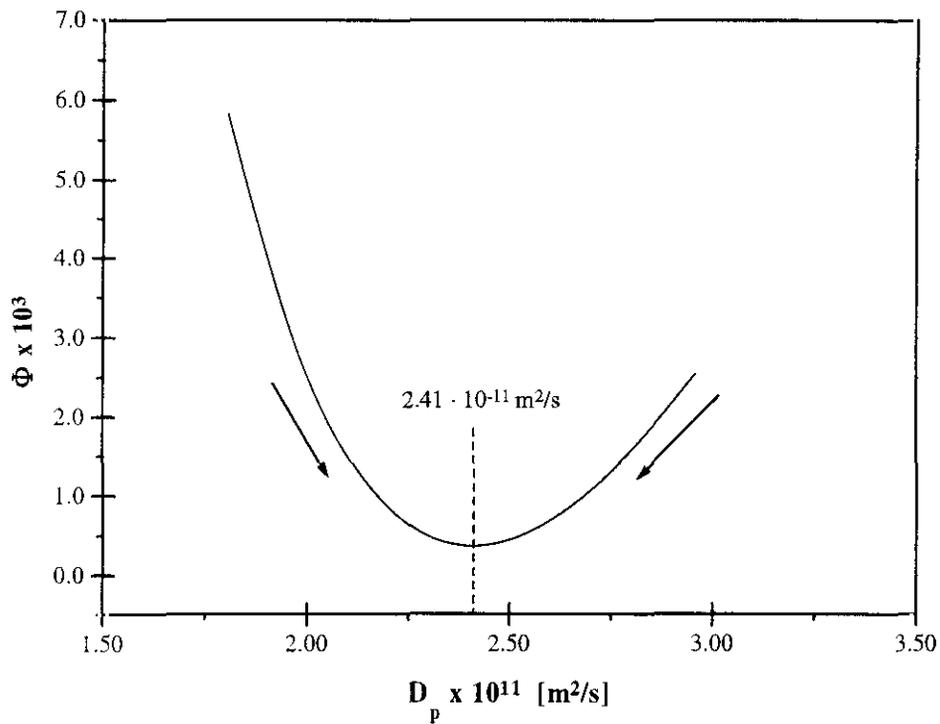


Figura C.33: Optimización del valor de D_p por minimización de la función objetivo para un experimento de adsorción de α -amilasa en tanque agitado a 25 °C y concentración inicial 0.25 mg/ml sobre la resina de intercambio iónico.

C.4.- MODELADO DE LA ADSORCIÓN EN LECHO FIJO

En el presente apartado se comparan las curvas de ruptura experimentales con las teóricas derivadas del modelo matemático. Los parámetros cinéticos utilizados para el modelado figuran en el apartado 7.2 y se han obtenido mediante optimización del ajuste de ambas curvas.

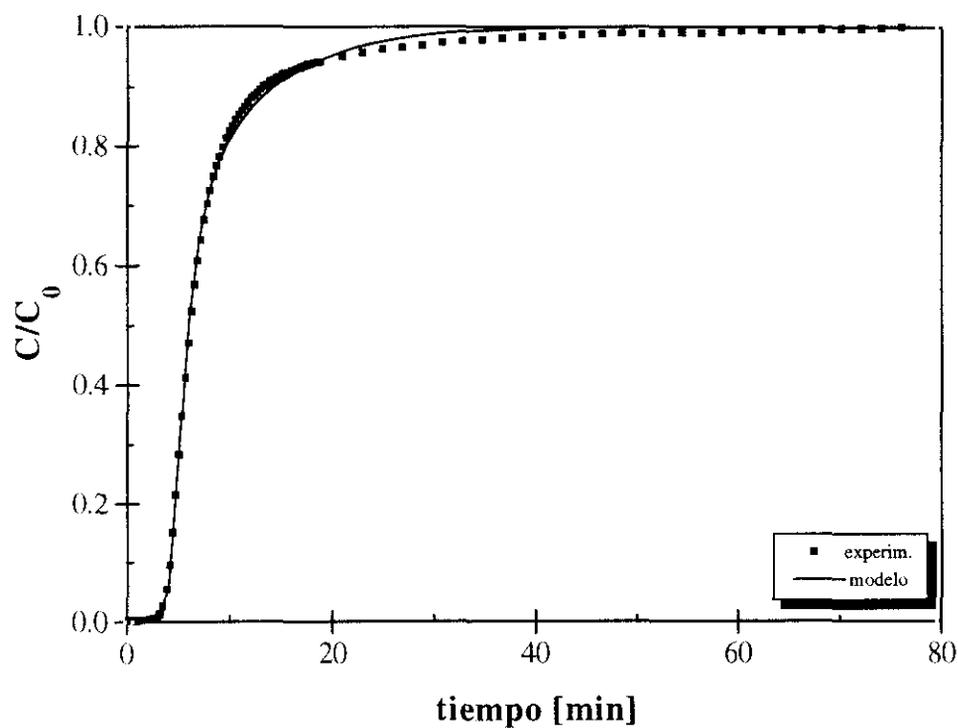


Figura C.34: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de HIC en las siguientes condiciones: $C_0 = 0.50$ mg/ml; $Q = 0.25$ ml/min; $T = 20$ °C.

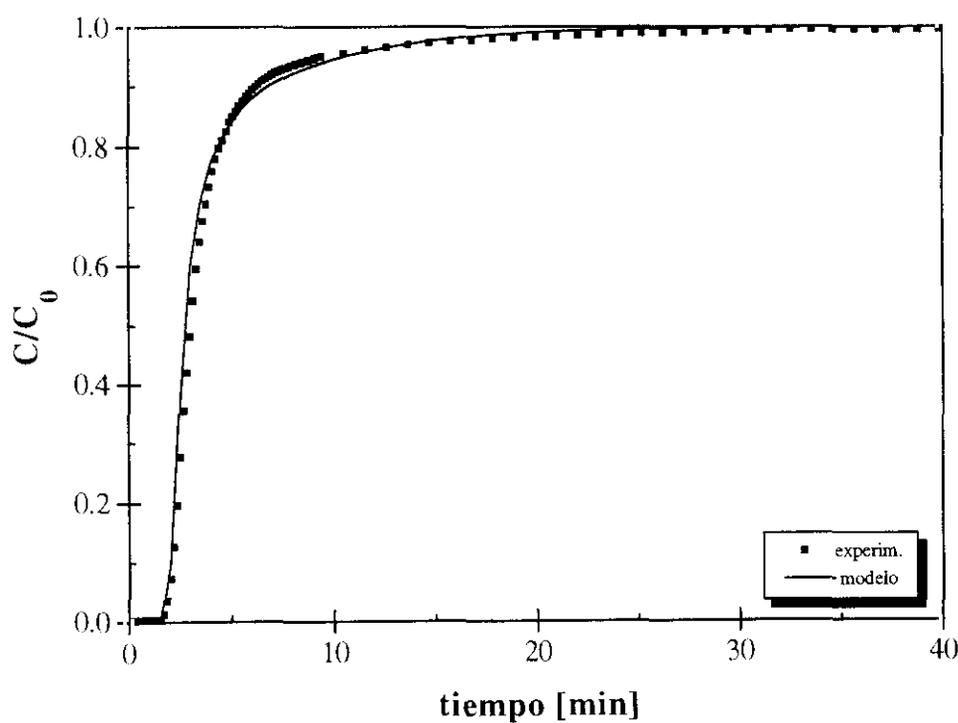


Figura C.35: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de HIC en las siguientes condiciones: $C_0 = 0.50$ mg/ml; $Q = 0.50$ ml/min; $T = 20$ °C.

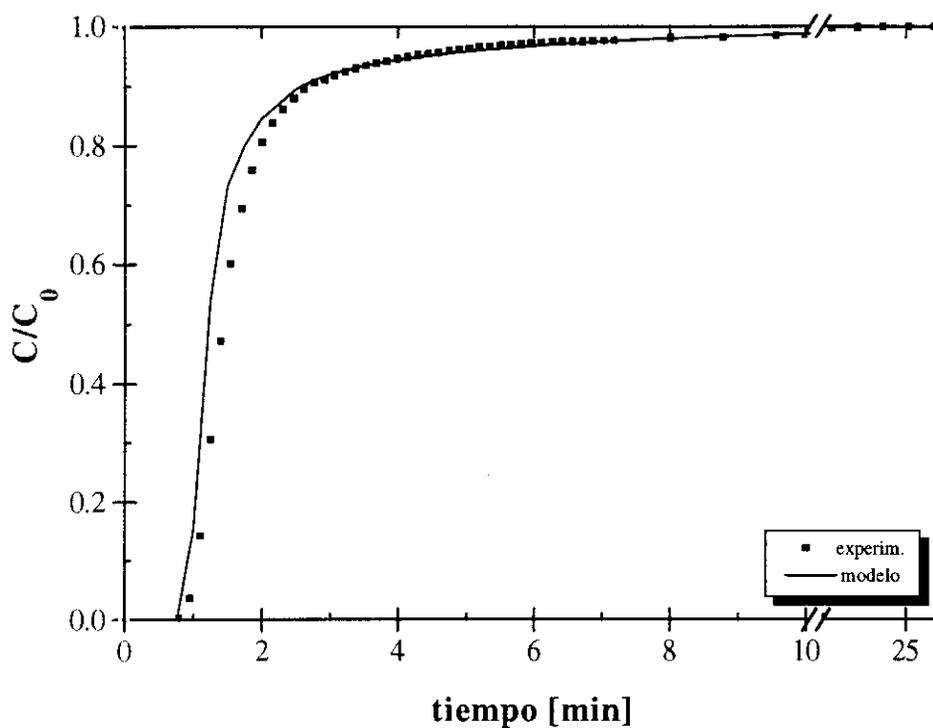


Figura C.36: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de HIC en las siguientes condiciones: $C_0 = 0.50$ mg/ml; $Q = 1.00$ ml/min; $T = 20$ °C.

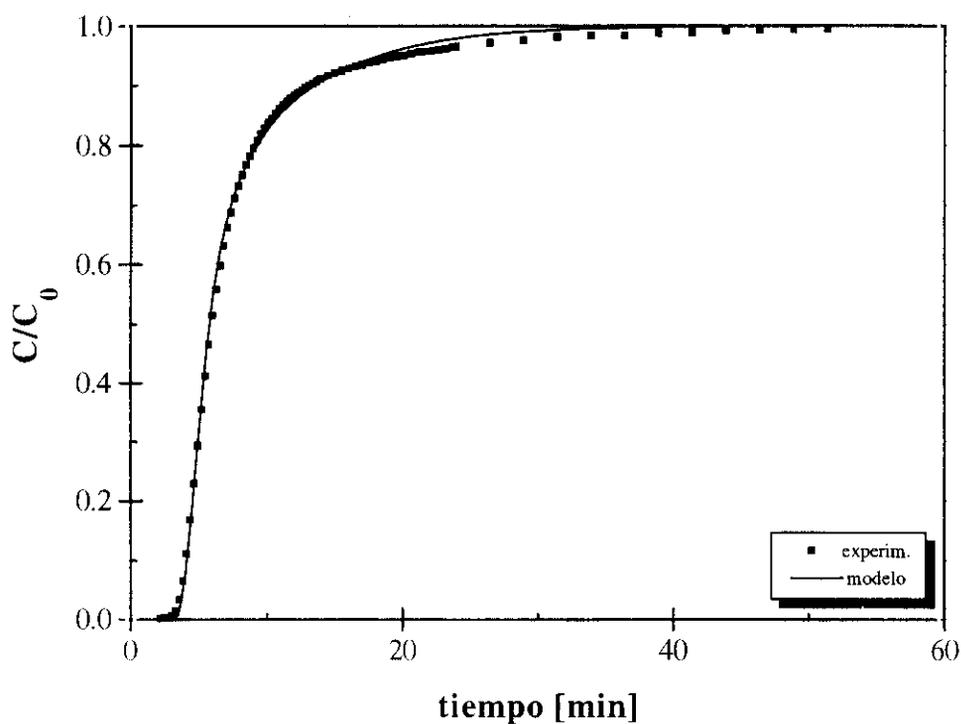


Figura C.37: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de HIC en las siguientes condiciones: $C_0 = 1.00$ mg/ml; $Q = 0.25$ ml/min; $T = 20$ °C.

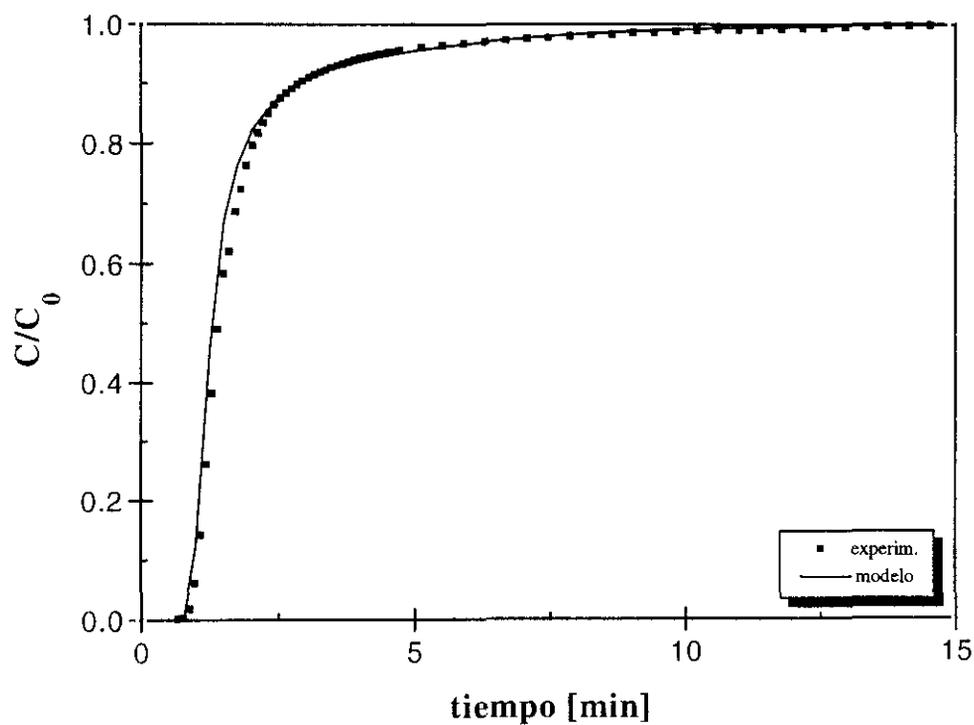


Figura C.38: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de HIC en las siguientes condiciones: $C_0 = 1.00$ mg/ml; $Q = 1.00$ ml/min; $T = 20$ °C.

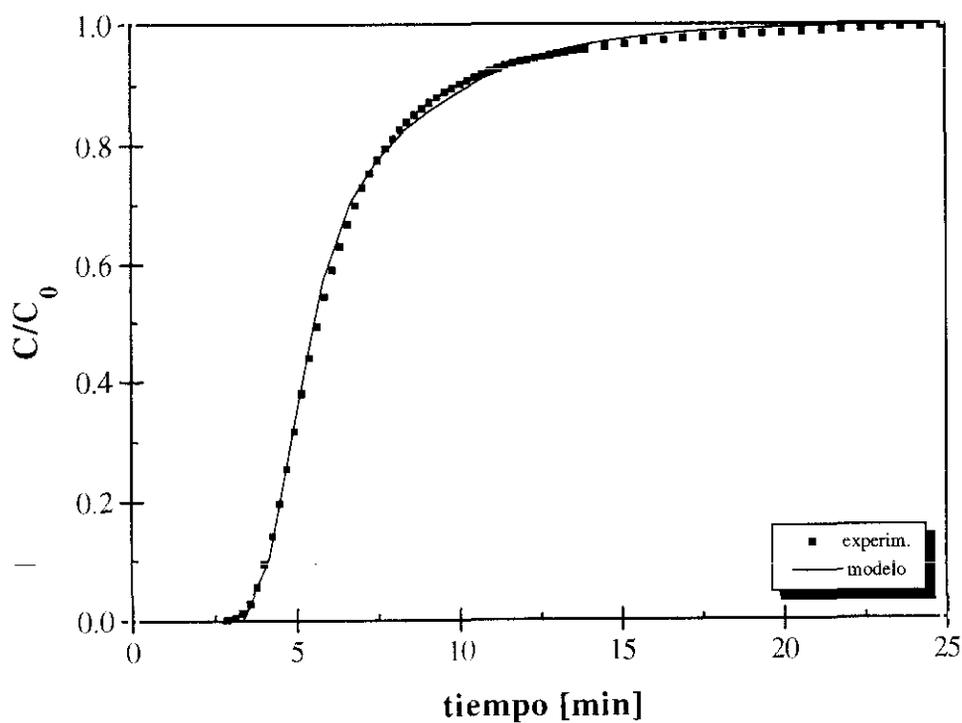


Figura C.39: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de HIC en las siguientes condiciones: $C_0 = 2.50$ mg/ml; $Q = 0.25$ ml/min; $T = 20$ °C.

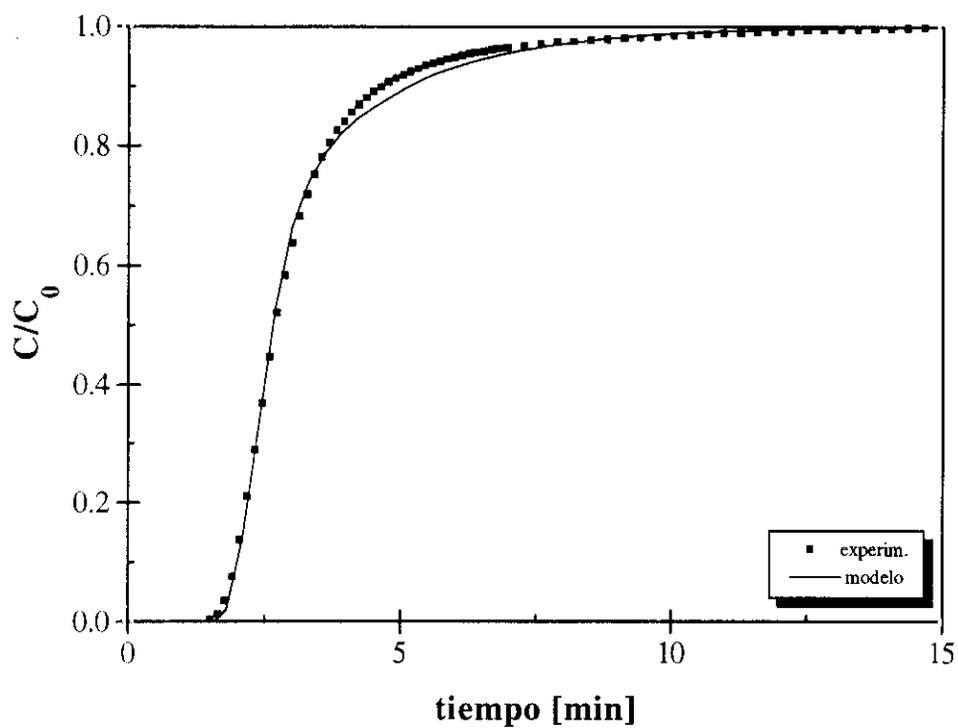


Figura C.40: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de HIC en las siguientes condiciones: $C_0 = 2.50$ mg/ml; $Q = 0.50$ ml/min; $T = 20$ °C.

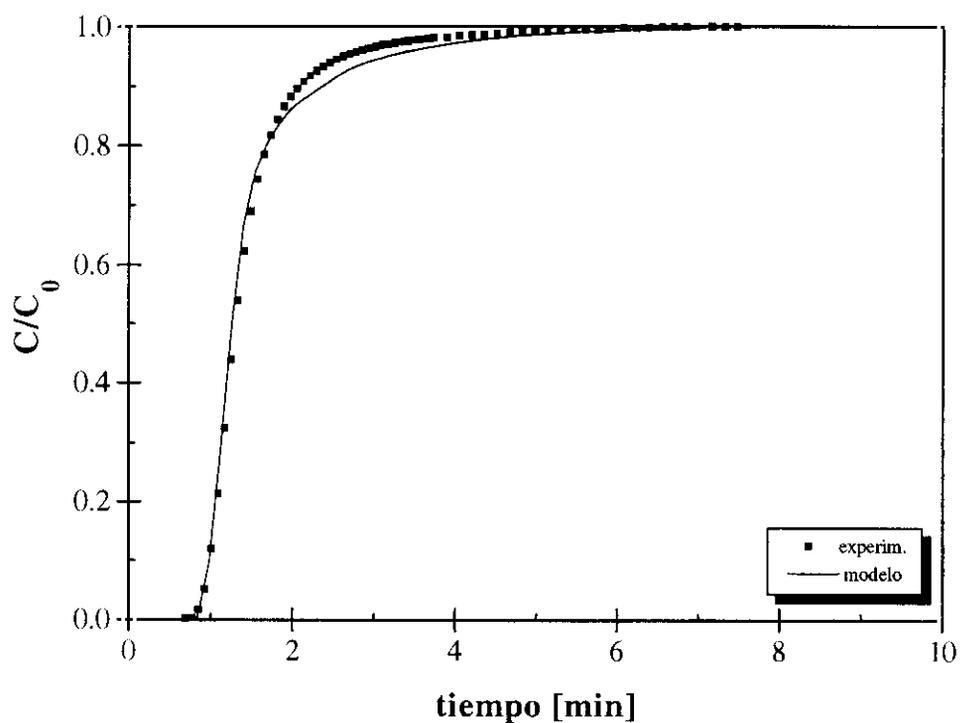


Figura C.41: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de HIC en las siguientes condiciones: $C_0 = 2.50$ mg/ml; $Q = 1.00$ ml/min; $T = 20$ °C.

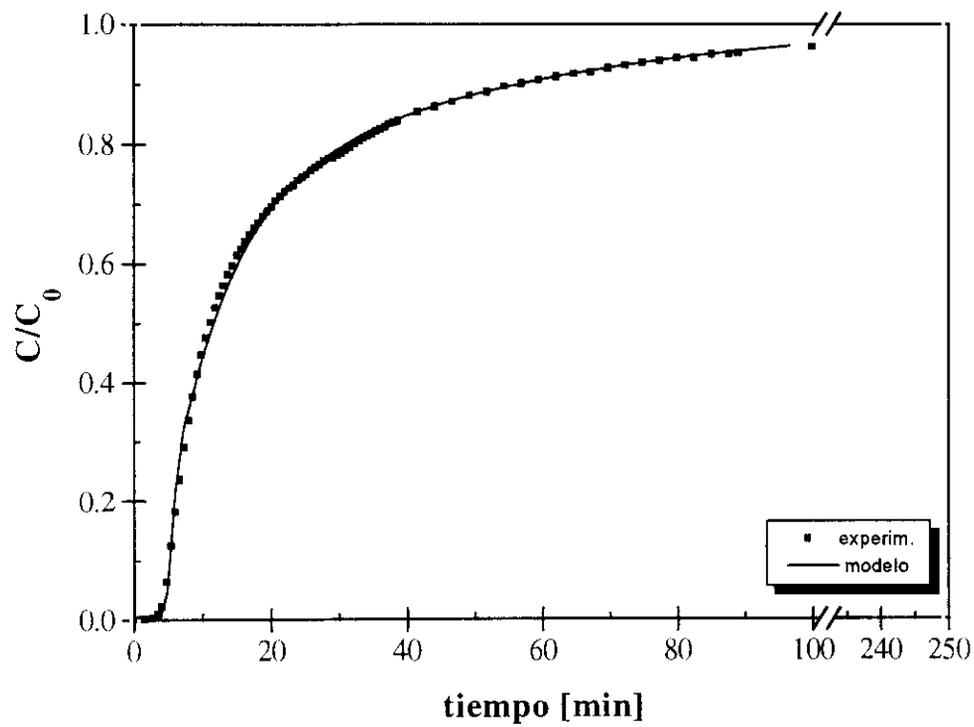


Figura C.42: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de IEC en las siguientes condiciones: $C_0 = 0.50$ mg/ml; $Q = 0.25$ ml/min; $T = 25$ °C.

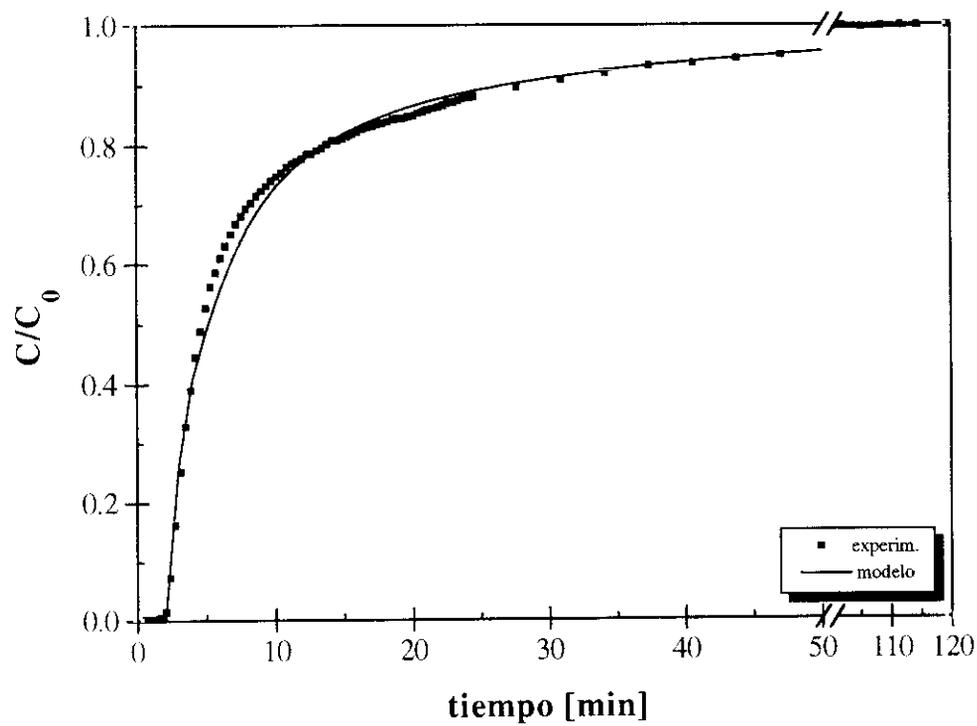


Figura C.43: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de IEC en las siguientes condiciones: $C_0 = 0.50$ mg/ml; $Q = 0.50$ ml/min; $T = 25$ °C.

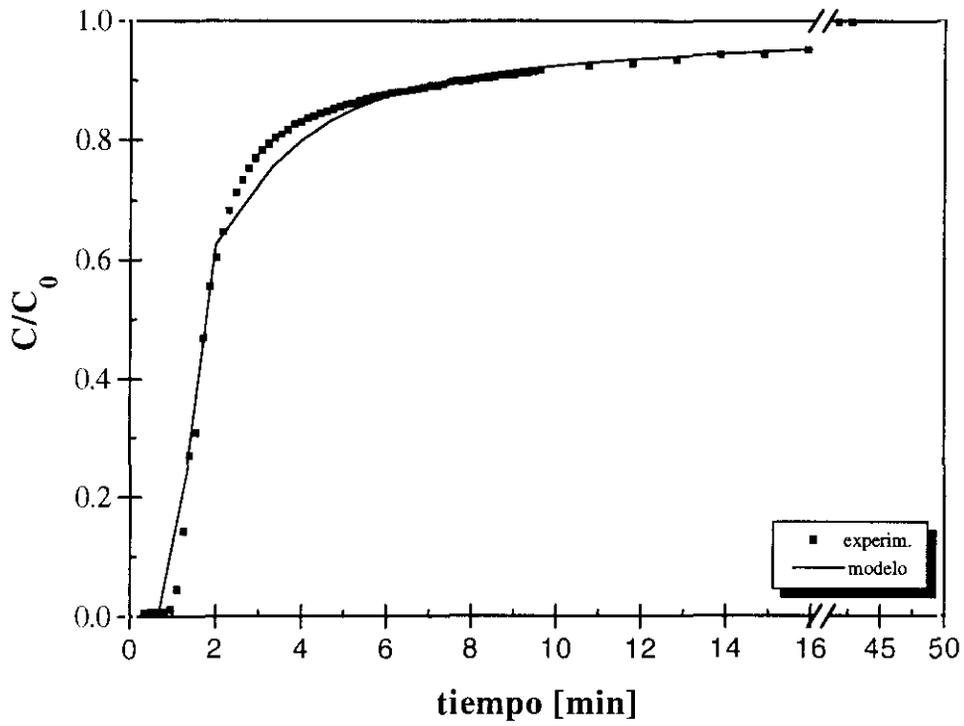


Figura C.44: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de IEC en las siguientes condiciones: $C_0 = 0.50$ mg/ml; $Q = 1.00$ ml/min; $T = 25$ °C.

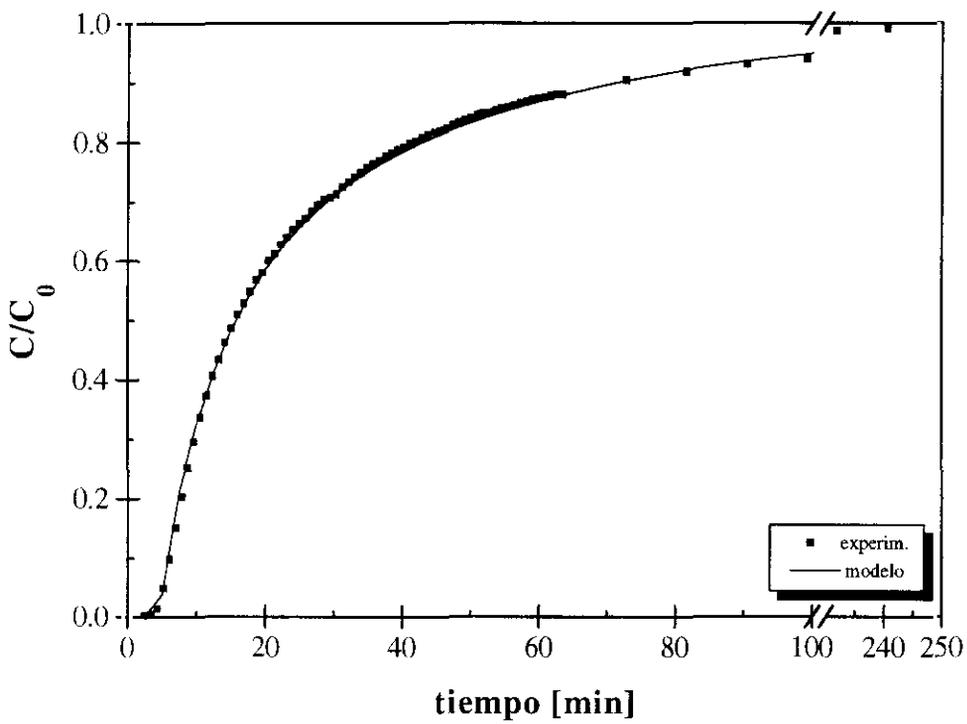


Figura C.45: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de IEC en las siguientes condiciones: $C_0 = 1.00$ mg/ml; $Q = 0.25$ ml/min; $T = 25$ °C.

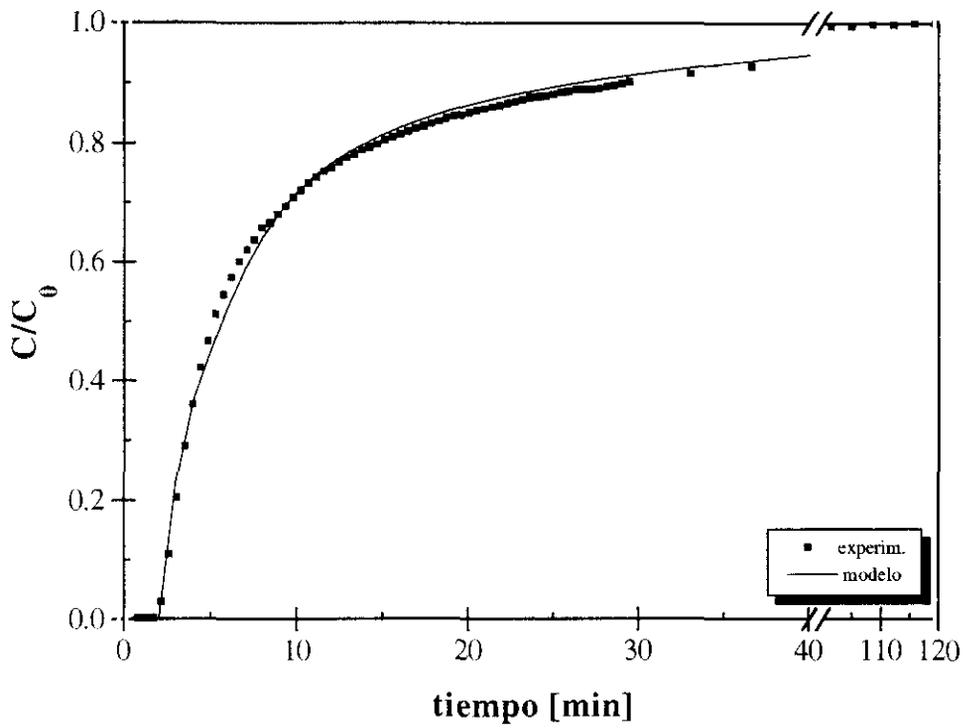


Figura C.46: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de IEC en las siguientes condiciones: $C_0 = 1.00$ mg/ml; $Q = 0.50$ ml/min; $T = 25$ °C.

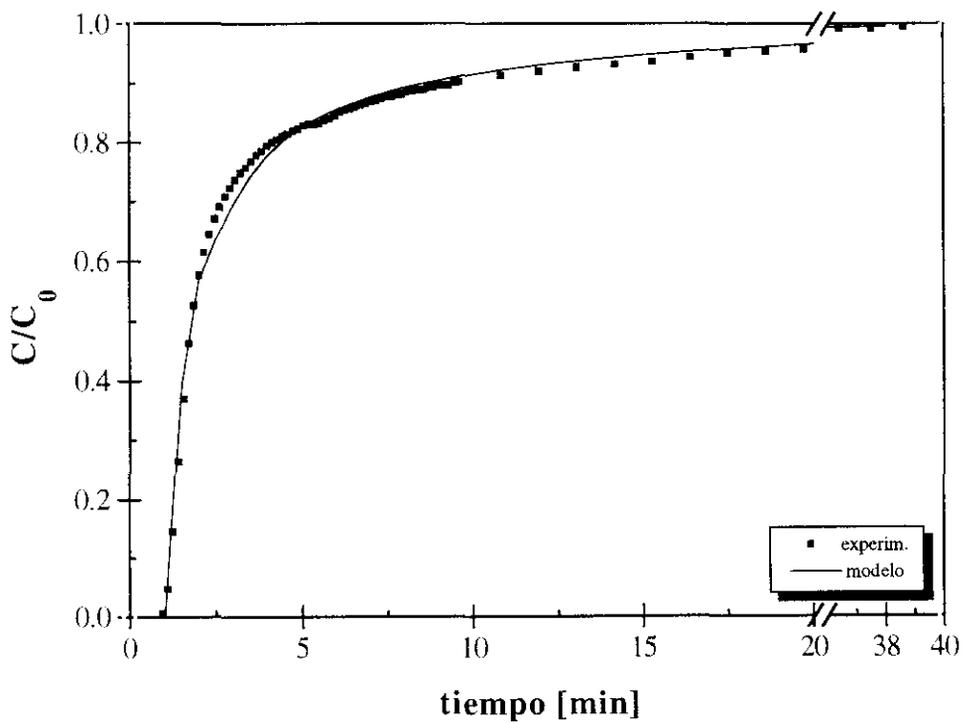


Figura C.47: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de IEC en las siguientes condiciones: $C_0 = 1.00$ mg/ml; $Q = 1.00$ ml/min; $T = 25$ °C.

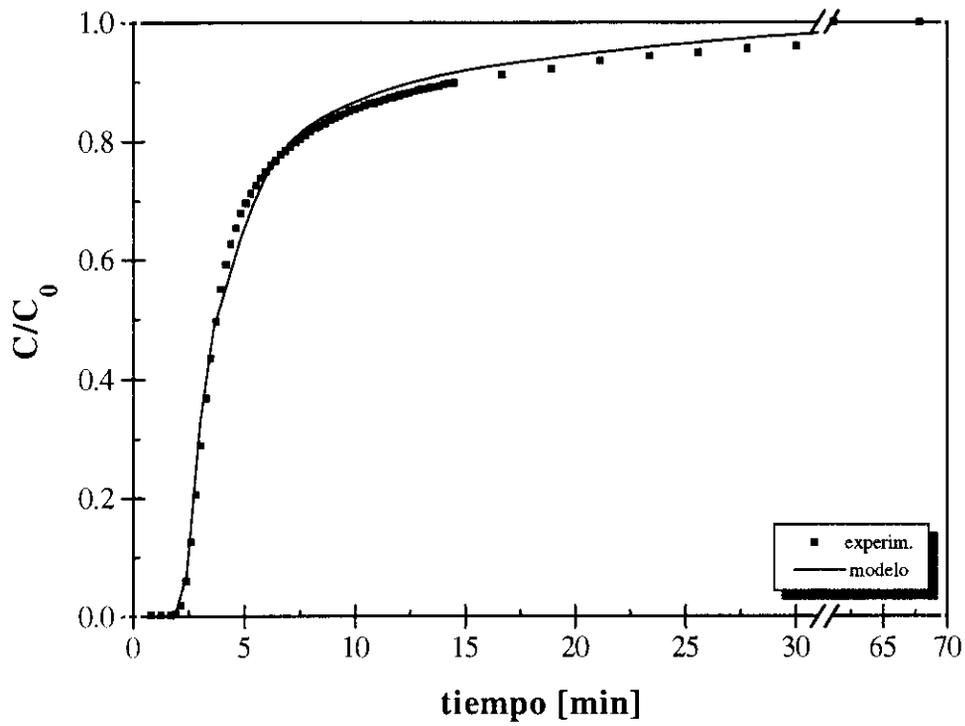


Figura C.48: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de IEC en las siguientes condiciones: $C_0 = 2.50$ mg/ml; $Q = 0.50$ ml/min; $T = 25$ °C.

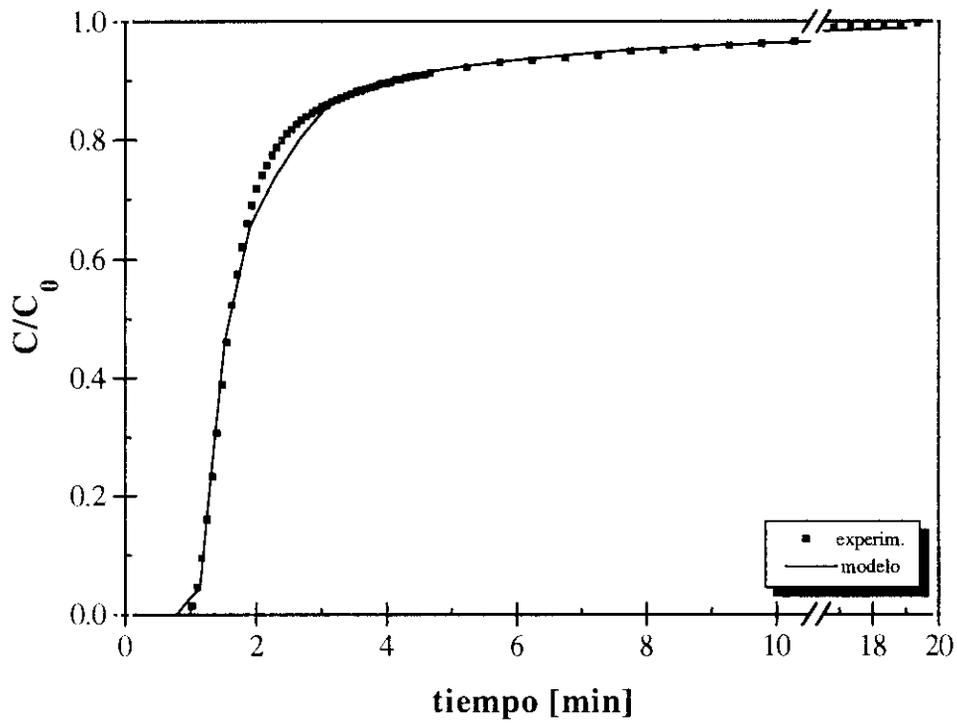


Figura C.49: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de IEC en las siguientes condiciones: $C_0 = 2.50$ mg/ml; $Q = 1.00$ ml/min; $T = 25$ °C.

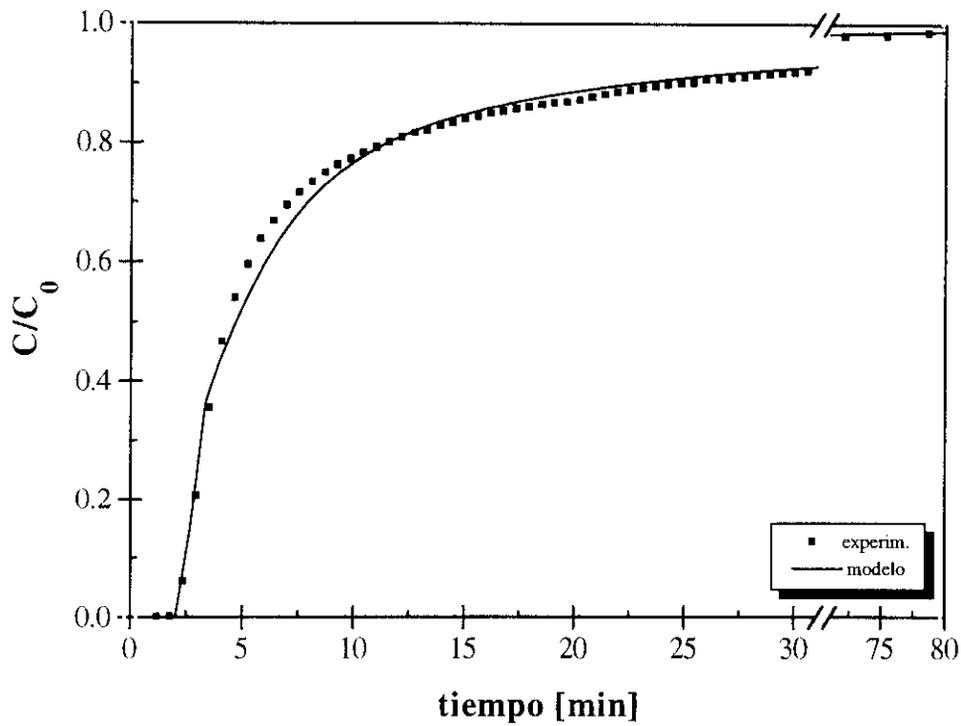


Figura C.50: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de IEC en las siguientes condiciones: $C_0 = 0.50$ mg/ml; $Q = 0.50$ ml/min; $T = 20$ °C.

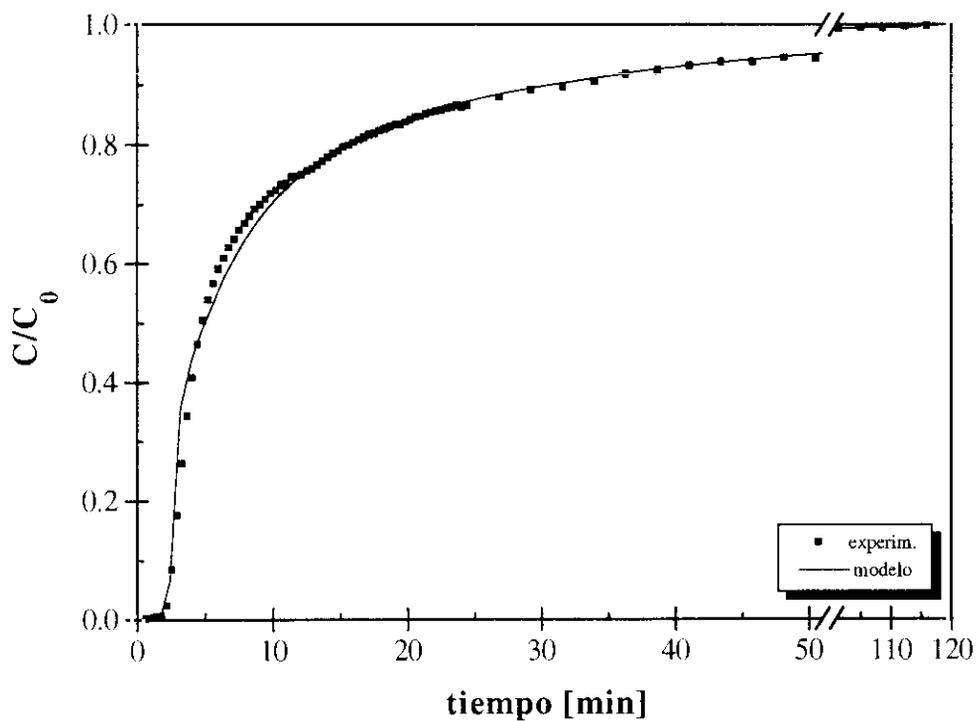


Figura C.51: Comparación de la curva de ruptura experimental y calculada mediante el modelo para la resina de IEC en las siguientes condiciones: $C_0 = 0.50$ mg/ml; $Q = 0.50$ ml/min; $T = 30$ °C.

NOMENCLATURA

- A_{280} : Absorbancia a 280 nm.
- A_{BET} : Área BET.
- ΔA_S : Área molecular de contacto ligando-adsorbato en HIC.
- b : Parámetro de la isoterma de Langmuir.
- c : Concentración de adsorbato en la fase fluida en el interior de los poros.
- C : Concentración de adsorbato en el seno de la fase fluida fuera de las partículas.
- D_{AB} : Difusividad molecular del adsorbato A en la disolución B.
- D_c : Coeficiente de difusión intracrystalino.
- D_L : Coeficiente de dispersión axial.
- D_K : Coeficiente de difusividad de Knudsen.
- dp : Diámetro de partícula.
- D_p : Coeficiente de difusión en los poros.
- g : Aceleración de la gravedad.
- ΔG^0 : Variación de la energía libre de adsorción.
- ΔH^0 : Variación de la entropía de adsorción.
- J_r : Flujo de adsorbato que atraviesa la capa límite externa.

| | |
|----------------|--|
| k : | Constante aparente de adsorción (Ec. 3.4) |
| k' : | Factor de capacidad. |
| K_A : | Constante de adsorción (constante de Henry). |
| k_f : | Coefficiente de difusión externa. |
| K_f : | Parámetro de la isoterma de Freundlich. |
| k'_0 : | Factor de capacidad en ausencia de sal. |
| L : | Longitud de lecho. |
| m : | concentración molal. |
| M_A : | Masa molecular del adsorbato. |
| M_B : | Masa molecular del disolvente. |
| P : | Presión. |
| q : | Concentración de adsorbato adsorbida por unidad de masa de adsorbente. |
| Q : | Caudal. |
| q_m : | Capacidad máxima del adsorbente. |
| R : | Constante de los gases. Radio de partícula. |
| ΔS^0 : | Variación de la entropía de adsorción. |
| t : | Tiempo |
| t_R : | Tiempo de retención del adsorbato. |
| t_0 : | Tiempo de retención del trazador. |
| T : | Temperatura. |
| v : | Velocidad intersticial de un fluido. |
| V : | Volumen molar medio del disolvente. Volumen de disolución. |
| V_A : | Volumen molar medio del soluto a su temperatura de ebullición. |
| v_p : | Volumen de poro. |
| W : | Masa de resina. |
| Z_p : | Carga característica de la proteína. |
| Z_S : | Carga neta del contraión en IEC. |

Letras griegas

| | |
|----------------|---|
| β : | Parámetro de la isoterma de Freundlich. |
| ϵ : | Porosidad de columna. |
| ϵ_p : | Porosidad de partícula. |
| Φ : | Función objetivo (Ec. A.10). |
| Φ_C : | Diámetro interno del lecho. |

- λ : Parámetro de interacción hidrofóbica.
- μ : Momento dipolar de una proteína.
Viscosidad de una disolución.
Primer momento (Ec. 3.1).
- ρ : Densidad de un fluido.
- ρ_a : Densidad aparente de un sólido poroso.
- ρ_r : Densidad real de un sólido poroso.
- σ : Incremento molal de tensión superficial de una sal.
- σ^2 : Segundo momento central (Ec. 3.2).
- τ : Factor de tortuosidad.
- Θ : Fracción de la superficie de un adsorbente cubierta por moléculas de adsorbato.

Acrónimos

- HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia.
- HIC: Cromatografía de interacción hidrofóbica.
- IEC: Cromatografía de intercambio iónico.
- GH: Grado de hidrólisis o equivalente de dextrosa.
- GP: Grado de polimerización.