

**INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS
SUPERIORES DE MONTERREY**

CAMPUS MONTERREY

**DIVISION DE INGENIERIA Y DE ARQUITECTURA
PROGRAMA DE GRADUADOS EN INGENIERIA**



**“ESTUDIO DEL EFECTO DE SUSPENSIONES
BIOLOGICAS SOBRE LA FORMACION DE FASES
ACUOSAS EN SISTEMAS DE EXTRACCION QUE
UTILIZAN POLIETILENGLICOL (PEG) Y FOSFATO”**

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN INGENIERIA QUIMICA**

POR

LUISA FERNANDA CUETO GOMEZ

MONTERREY, N. L.

ENERO 1999

INSTITUTO TECNOLOGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

CAMPUS MONTERREY

DIVISION DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

PROGRAMA DE GRADUADOS EN INGENIERÍA



“ESTUDIO DEL EFECTO DE SUSPENSIONES BIOLÓGICAS SOBRE LA FORMACION DE FASES ACUOSAS EN SISTEMAS DE EXTRACCION QUE UTILIZAN POLIETILENGLICOL (PEG) Y FOSFATO”

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INGENIERIA QUIMICA

POR

LUISA FERNANDA CUETO GOMEZ

MONTERREY, N.L.

ENERO 1999

Agradecimientos

A mi asesor de tesis, Dr. Marco Rito Palomares, por el apoyo que me brindó durante todo el tiempo en que realicé mis estudios de maestría, especialmente en la etapa de desarrollo de mi tesis, por sus comentarios, comprensión y el aprendizaje adquirido.

A mis sinodales, Dr. Sergio Serna y Dr. Belzahet Treviño, por sus valiosas aportaciones y por el tiempo que dedicaron a mi trabajo de tesis.

Al Fondo de Apoyo al Posgrado del ITESM (FAPPI), por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Federico Viramontes, por su disposición como coordinador del Programa de Graduados en Ingeniería y por la orientación que recibí de su parte.

A mis profesores: Dr. Joaquín Acevedo, Dr. Jaime Bonilla, Dra. Martha Corrales, Dr. Jorge García O., Dr. Salvador García L., Ing. Ignacio Luján, Dr. Enrique Ortiz, Dr. Miguel A. Romero, Dr. Belzahet Treviño y Dr. Federico Viramontes por haberme transmitido sus conocimientos, por la disciplina y la formación que adquirí gracias a ellos.

A los miembros del departamento de Física del ITESM Campus Monterrey, por el apoyo que me brindaron y por las palabras de aliento que en ellos encontré en todo momento.

A mis amigos, Claudia Almaguer, Luis Bermúdez, Jesús Cedeño, Jackie Giacomán, Martha Lam, Julián López, Carlos Moreno, Darinka Ramírez, Ivette Ramírez, Rodolfo y Gilda Rodríguez, Nayeli y Miguel Angel Romero, Victor Rodríguez, Victor Hugo Ruíz, Pilar Soto, Daniel Torres, Ernesto Quintanilla, Salvador Villarreal, Xristo Zárate y Roberto Zamudio, por haber compartido conmigo momentos tanto alegres así como difíciles.

Dedicatorias

A Hugo, por haberme comprendido todo el tiempo, por haberme animado a seguir adelante en todo momento y por apoyarme en mis deseos de superación profesional.

A Claudia Solano Castillo, por su valiosa ayuda, sus comentarios, su compañía y la amistad que me ha brindado. Gracias por estar siempre.

A Alicia, por su cercanía en la distancia. Gracias por la confianza en nuestra amistad.

Resumen

Los procesos de extracción líquido-líquido de dos fases acuosas representan una alternativa conveniente para recuperar macromoléculas (P. Ej. proteínas) presentes en suspensiones biológicas, debido a que dichos sistemas propician condiciones de operación amigables y que permiten mantener la estabilidad de las proteínas.

A pesar de que los procesos de extracción que utilizan sistemas de dos fases acuosas presentan una serie de ventajas (bajo costo, facilidad de escalamiento, biocompatibilidad, etc.), exhiben ciertas inestabilidades en presencia de suspensiones biológicas.

La presencia de suspensiones biológicas caracterizadas por una variada composición de productos de interés (proteínas y enzimas) y contaminantes (sólidos solubles, pigmentos, compuestos intra y extracelulares) afecta la eficiencia de las condiciones de operación de los procesos.

Este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de cuatro suspensiones biológicas en sistemas de dos fases acuosas, específicamente sobre dos de sus parámetros: la relación de volúmenes de las fases ($V_r = \text{volumen de la fase superior} / \text{volumen de la fase inferior}$) y el desplazamiento de la curva binodal en el diagrama de fases. Estos parámetros proporcionan información acerca de la estabilidad de los sistemas de extracción que procesan las suspensiones y así como información para definir límites de estabilidad de los sistemas.

Las suspensiones biológicas tuvieron efecto sobre la relación de volúmenes de las fases, siendo éstos similares en los sistemas más estables, independientemente de la suspensión biológica. En sistemas menos estables (más cercanos a la curva binodal) los resultados varían según la suspensión biológica presente o la concentración de polímero en el sistema.

En términos generales, la curva binodal de los sistemas de dos fases para la mayoría de las suspensiones biológicas utilizadas se desplazó hacia abajo con respecto a los sistemas de referencia, lo que indica una formación de fases en concentraciones menores de polietilenglicol y fosfato por efecto de la biomasa. Adicionalmente, desde el punto de vista de proceso, este hecho se traduce en un ahorro de materia prima (PEG y fosfato).

En el caso particular del suero de leche, los sólidos insolubles tienden a desplazar la curva binodal hacia arriba por efecto de sus posibles interacciones con el polietilenglicol y residuos grasos, aunque la presencia de otras biomoléculas solubles, como la lactosa, pudiese causar efectos debido a su solubilidad, caso que queda abierto a estudios adicionales.

Como conclusión de esta investigación, se establece que las suspensiones biológicas afectan de una manera que no puede ser explicada completamente, pero sí explotada para definir las condiciones de proceso apropiadas.

Indice General

	Pag.
Indice de Figuras	i
Indice de Tablas	iii
CAPITULO 1. Antecedentes	1
1.1 Procesos convencionales de recuperación	2
1.1.1 Recuperación de proteínas mediante procesos convencionales	3
1.1.2 Separación sólido-líquido: centrifugación y filtración	4
1.1.3 Concentración de productos: ultrafiltración y precipitación	5
Precipitación con sales	6
Precipitación con disolventes orgánicos	7
Precipitación isoelectrica	8
1.2 Procesos de recuperación no convencionales	8
1.2.1 Micelas invertidas	9
1.2.2 Extracción líquido-líquido con sistemas de dos fases acuosas	10
CAPITULO 2. Introducción	12
2.1 Descripción de un sistema de dos fases acuosas	12
2.2 Ventajas y desventajas de los sistemas de dos fases acuosas	12
2.3 Conceptos principales	17

	Pag.
2.4 Aplicaciones de los sistemas de dos fases acuosas	20
2.5 Objetivo de la investigación	24
CAPITULO 3. Materiales y Métodos	25
Reactivos utilizados	25
Material biológico	26
3.1 Obtención de las suspensiones biológicas	26
3.1.1 Suspensión de <i>T. harzianum</i>	27
3.1.2 Suspensión de <i>E. coli</i>	28
3.1.3 Suspensión de <i>S. cerevisiae</i>	29
3.2 Ruptura celular de los cultivos microbianos	30
3.3 Suspensión de suero de leche	30
3.4 Construcción de Sistemas de Dos Fases Acuosas	30
3.4.1 Diagrama de fases PEG 1450-fosfato	31
3.5 Construcción de sistemas de dos fases acuosas para observar el efecto de las suspensiones biológicas sobre la relación de volumen de fases (Vr)	31
3.6 Evaluación del efecto de las suspensiones biológicas sobre la posición de la curva binodal en el diagrama de fases	34
Construcción de sistemas de dos fases acuosas	34

	Pag.
3.7 Suero de Leche: caso particular de estudio del efecto de suspensiones biológicas sobre la formación de fases de sistemas acuosos	38
CAPITULO 4. Resultados y Discusión	39
4.1 Efecto de las suspensiones biológicas sobre la relación de volúmenes de sistemas de dos fases acuosas	40
4.1.1 Sistemas de dos fases acuosas localizados sobre una TLL cercana a la binodal: sistemas A-E	40
4.1.2 Sistemas de dos fases acuosas localizados sobre una TLL intermedia a la curva binodal: sistemas F-J	45
4.1.3 Efecto de las suspensiones biológicas sobre la relación de volúmenes(Vr) en sistemas de dos fases acuosas localizados sobre una TLL lejana a la curva binodal: sistemas K-O	50
4.2 Efecto de las suspensiones de <i>T. harzianum</i>, <i>E. coli</i>, y <i>S. cerevisiae</i> sobre la posición de la curva binodal	54
4.3 Suero de leche: caso particular de estudio del efecto de suspensiones biológicas sobre la relación de volúmenes (Vr) en sistemas de dos fases acuosos	60
4.4 Suero de leche: caso particular de estudio del efecto de suspensiones biológicas en la formación de sistemas acuosos.	67
4.4.1 Influencia de los sólidos del suero de leche sobre la posición de la curva binodal en el diagrama de fases	69
Capítulo 5. Conclusiones	72
Bibliografía	75

Indice de Figuras

	Pág.
Figura 2.1 Representación de un diagrama de fases para sistemas PEG1450-fosfato.	13
Figura 2.2 Esquema del proceso de recuperación de proteínas utilizando sistemas de dos fases acuosas	16
Figura 2.3 Relación de volumen de las fases de Sistemas de dos Fases Acuosas en diferentes posiciones a lo largo de una TLL.	19
Figura 3.1 Posición y localización de los sistemas de dos fases acuosas seleccionados para evaluar cambios en V_r .	32
Figura 3.2 Ubicación de sistemas de dos fases acuosas (1-15) para evaluar el efecto de las suspensiones biológicas en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases	35
Figura 3.3 Localización de los sistemas de dos fases acuosas I-IV para evaluar el efecto de la suspensión biológica en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases.	37
Figura 4.1 Efecto de suspensiones biológicas sobre la relación de volúmenes (V_r) de los sistemas de dos fases acuosas A-E (TLL= 31.88%).	44
Figura 4.2 Comparación del V_r del blanco vs. V_r de la muestra biológica en los sistemas de dos fases acuosas A-E.	45
Figura 4.3 Efecto de suspensiones biológicas sobre la relación de volúmenes (V_r) de los sistemas de dos fases acuosas F-J (TLL= 40.22%)	48
Figura 4.4 Comparación del V_r del blanco vs. V_r de la muestra biológica en los sistemas de dos fases acuosas F-J.	49
Figura 4.5 Efecto de suspensiones biológicas sobre la relación de volúmenes (V_r) de los sistemas de dos fases acuosas K-O (TLL= 57.54%)	52
Figura 4.6 Comparación del V_r del blanco vs. V_r de la muestra biológica en los sistemas de dos fases acuosas K-O.	53
Figura 4.7 Efecto de la suspensión de <i>T. harzianum</i> en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases.	57

	Pág.
Figura 4.8 Efecto de la suspensión de <i>E. coli</i> en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases.	58
Figura 4.9 Efecto de la suspensión de <i>S. cerevisiae</i> en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases	59
Figura 4.10 Efecto de la suspensión de suero de leche sobre la relación de volúmenes (V_r) de los sistemas de dos fases acuosas A-E (TLL= 31.88%).	61
Figura 4.11 Comparación del V_r del blanco vs. V_r de la suspensión de suero de leche en los sistemas de dos fases acuosas F-J.	62
Figura 4.12 Efecto de la suspensión de suero de leche sobre la relación de volúmenes (V_r) de los sistemas de dos fases acuosas F-J (TLL= 40.22%).	64
Figura 4.13 Comparación del V_r del blanco vs. V_r de la suspensión de suero de leche en los sistemas de dos fases acuosas K-O.	64
Figura 4.14 Efecto de la suspensión de suero de leche sobre la relación de volúmenes (V_r) de los sistemas de dos fases acuosas K-O (TLL= 57.54%).	66
Figura 4.15 Comparación del V_r del blanco vs. V_r de la suspensión de suero de leche en los sistemas de dos fases acuosas K-O.	67
Figura 4.16 Efecto de la suspensión de suero de leche en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases.	69
Figura 4.17 Efecto de la suspensión de sólidos del suero de leche y del suero de leche sin sólidos en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases.	70

Indice de Tablas

	Pág.
Tabla 2.1 Algunas ventajas y desventajas de los sistemas de dos fases acuosas.	15
Tabla 3.1 Composición de los sistemas de dos fases acuosas A-O, para evaluar el cambio en la relación de volúmenes de las fases (V_r)	33
Tabla 3.2 Composición de los sistemas de dos fases acuosas 1-15, para evaluar el efecto de las suspensiones biológicas en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases	36
Tabla 3.3 Composición de los sistemas de dos fases acuosas I-IV, para evaluar el efecto de las suspensiones biológicas en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases	37
Tabla 4.1 Efecto de diferentes suspensiones biológicas sobre el V_r de sistemas de dos fases acuosas con baja TLL.	43
Tabla 4.2 Efecto de diferentes suspensiones biológicas sobre el V_r de sistemas de dos fases acuosas con TLL intermedia.	47
Tabla 4.3 Efecto de diferentes suspensiones biológicas sobre el V_r de sistemas de dos fases acuosas con TLL lejana a la curva binodal .	51
Tabla 4.4 Efecto de las suspensiones biológicas en la posición de la curva binodal en los sistemas de dos fases acuosas 1-15.	56
Tabla 4.5 Efecto de la suspensión de suero de leche sobre el V_r de sistemas de dos fases acuosas con TLL cercana a la curva binodal.	60
Tabla 4.6 Efecto de la suspensión de suero de leche sobre el V_r de sistemas de dos fases acuosas con TLL intermedia a la curva binodal.	63
Tabla 4.7 Efecto de la suspensión de suero de leche sobre el V_r de sistemas de dos fases acuosas con TLL lejana a la curva binodal.	65
Tabla 4.8 Efecto de la suspensión de suero de leche en la posición de la curva binodal en los sistemas de dos fases acuosas 1-15.	68

CAPITULO 1. Antecedentes

Los procesos biotecnológicos representan el resultado práctico de la aplicación de los conceptos de la biotecnología. Todo proceso de este tipo se integra de dos etapas fundamentales: producción (fermentación) y recuperación (bioseparación). El área de los bioprocesos es multidisciplinaria, y ha cobrado una importancia considerable en la industria debido a que permite el diseño de tecnologías nuevas basadas en recursos renovables, por lo que cada vez se advierte más su potencial (Scragg, 1996).

En un bioproceso, la etapa de fermentación genera productos de interés industrial (proteínas), los cuáles pueden recuperarse del caldo de fermentación (extracelulares) o bien del interior de la célula (intracelulares), previa lisis celular. El proceso de recuperación de proteínas de caldos de fermentación o de debris celular implica un costo considerable, por lo que la innovación y optimización en los procesos de separación representan ventajas competitivas en la producción (Asenjo, 1990).

Las propiedades físicas, químicas y bioquímicas de los productos de interés, así como las propiedades del debris celular y de otros elementos resultantes de la fermentación, son los elementos que más se consideran en el diseño de procesos de recuperación a gran escala (Asenjo, 1990).

1.1 Procesos convencionales de recuperación

Los procesos que siguen a la etapa de fermentación, también llamados procesos “cuesta abajo” (downstream processing), dependen de si el producto es intracelular, extracelular, o si es la célula misma (Scragg, 1996). Los procesos de separación aplicables a todos o a algunos de estos productos se pueden clasificar como sigue:

- 1) Rompimiento de la pared celular. Esta operación debe realizarse sin dañar los componentes deseados, y debe llevarse a cabo cuando los productos de interés son intracelulares. El proceso de ruptura celular, puede llevarse a cabo por medios mecánicos (homogenización con molinos de perlas) o químicos (saponificación con detergentes o disolución con solventes orgánicos). Los métodos mecánicos se caracterizan por ser muy eficientes aunque poco selectivos, al liberar el producto de interés pero también los contaminantes intracelulares. En contraste, los métodos enzimáticos resultan ser altamente selectivos pero costosos a nivel industrial. Industrialmente se utilizan los métodos mecánicos, usualmente los molinos de bolas de alta velocidad y los homogenizadores (Scragg, 1996).
- 2) Separación sólido-líquido. Es una operación mecánica que se basa en la diferencia de densidades entre el medio que contiene los productos de interés y los productos en sí. Este proceso depende de la concentración de los productos en el medio y de su

tamaño. Este proceso se lleva a cabo con las operaciones de centrifugación, filtración convencional y filtración por membranas o ultrafiltración (UF) (Scragg, 1996).

- 3) Concentración del producto. Los procesos de adsorción y extracción con solventes son comunes en este segmento. Se remueven materiales de muy variadas propiedades con el producto de interés, tales como restos celulares, gomas y grasas. Esta etapa puede dificultarse por la desnaturalización de los productos provocada por el uso de solventes orgánicos o por temperaturas altas (Belter, *et. al.*, 1988).
- 4) Aislamiento o purificación. Los procesos de cromatografía, electroforesis y precipitación son buenos ejemplos. Estas operaciones se dificultan cuando se trabaja con mezclas complejas y viscosas, así como cuando el producto de interés está en bajas concentraciones en la mezcla y se requiere un alto grado de pureza (Scragg, 1996 y Belter *et. al.*, 1988).
- 5) Terminado. Los procesos de eliminación de agua (deseccación) y de cristalización son ejemplos en este segmento. La cantidad de agua que se elimine debe ser mínima, con la finalidad de reducir costos de energía y evitar la degradación del producto (Scragg, 1996).

1.1.1 Recuperación de proteínas mediante procesos convencionales

Las recuperación de proteínas de células o de restos celulares del caldo de cultivo haciendo uso de procesos convencionales son del tipo sólido – líquido, y se llevan a cabo con operaciones de centrifugación, filtración convencional y filtración mediante membranas (ultrafiltración y microfiltración). Estas operaciones tienen como objetivo separar las células y restos celulares del caldo de cultivo, dejando las proteínas en el caldo y facilitando su posterior concentración. La selección de la operación apropiada se basa en costos de operación, en el rendimiento de recuperación y en el tiempo de proceso para cada opción, según el producto de interés (Scragg, 1996).

1.1.2 Separación sólido-líquido: centrifugación y filtración

En las operaciones de separación sólido-líquido se pretende eliminar los contaminantes mayores de la suspensiones biológicas, como por ejemplo el debris celular y algunos sólidos insolubles.

Los factores principales que controlan la capacidad de la centrífuga para separaciones biológicas son el tamaño de la partícula, la diferencia de la densidad entre las células y la viscosidad del caldo (Cliffe, 1996).

Sin embargo, la centrifugación se limita cuando el tamaño de partícula aumenta considerablemente, como por ejemplo en las levaduras, que pueden llegar a medir 5 μ m,

causando una disminución en la capacidad de la centrífuga, ya que su rapidez es proporcional al cuadrado del diámetro de partícula (Cliffe, 1996). Un aumento del diámetro del rotor para aumentar la capacidad conduce al equipo a un límite de tensión mecánica. Otras desventajas de esta operación es la dificultad de operar bajo condiciones estériles, la generación de calor y de ruido, además de que el tamaño máximo de la centrífuga se limita a 300-500 L/hr con partículas de 5 μm (Cliffe, 1996).

Una alternativa para las separaciones sólido-líquido es la filtración. Este es un método que se basa en un gradiente de presión como fuerza motriz, la cual se aplica a través de un medio filtrante selectivo para algunos solutos, y que permite el paso del solvente. Sin embargo, el bombeo intensivo requerido, el cual genera presión durante el proceso de filtración, puede provocar daños en la estabilidad de las proteínas, y consecuentemente, la pérdida su actividad (Harris y Angal, 1990).

1.1.3 Concentración de productos: ultrafiltración y precipitación

La ultrafiltración es una tecnología que hace uso de membranas, creada en los últimos 15 años para procesos biológicos. Esta operación se basa en el tamaño molecular de los compuestos que se desea separar y es la más adecuada para la separación de células, restos celulares o proteínas del caldo de fermentación (Cliffe, 1996). Las membranas pueden ser construidas de materiales esterilizables con vapor como el polipropileno, polisulfonato y policarbonato, y el tamaño de poro se define en términos del tamaño de molécula que pueden retener (Harris y Angal, 1990).

Algunas ventajas de la UF son que se pueden mantener condiciones estériles y que los microorganismos y los restos celulares se retienen en la membrana. Los puntos de corte de las membranas son los componentes con un peso molecular entre 10,000 y 30,000, por lo que el material que estorba en las operaciones de purificación puede removerse y así evitar que llegue a ésta. Sin embargo, la principal desventaja de la UF es el ensuciamiento de la membrana, que puede ser causado porque se depositan restos celulares en la membrana y por los precipitados que pueden llegar a obstruir sus poros, teniendo como consecuencia una reducción en el flujo y un bajo rendimiento por la retención de componentes. El ensuciamiento puede limpiarse con métodos químicos, mediante lavados sucesivos con ácidos o bases calientes, detergente o hipoclorito de sodio. Sin embargo, este proceso toma de 2 a 4 horas, ocasionando un paro del proceso, el cual genera costos (Cliffe, 1996).

La solubilidad de las proteínas está en función del pH, de las propiedades dieléctricas del solvente y de la temperatura. Estos parámetros pueden utilizarse para separar mezclas de proteínas, dado que cada una tiene un comportamiento diferente como electrolito debido a su estructura aminoacídica (Stryer, 1995). Explotando las diferencias en solubilidad de las proteínas, se pueden separar mediante precipitación. Existen varios métodos de precipitación: con sales, con solventes orgánicos, isoelectrónica, y otros

Precipitación con sales

Esta técnica consiste en adicionar sales neutras a la solución que contiene las proteínas. Comúnmente se utiliza sulfato de amonio, cuya presencia afecta el equilibrio entre las fuerzas electrostáticas que tienden a mantener la proteína en solución y las fuerzas hidrofóbicas, provocando la aglomeración de las proteínas y su precipitación en un medio acuoso. A gran escala se tienen problemas de eliminación por la dificultad de remover la sal de la proteína precipitada, además de que esta sal debe usarse a una temperatura entre 35 y 40°C, por lo que un control ineficiente de ésta puede ocasionar cristalización, causando ensuciamiento de la superficie intercambiadora y bloqueando las líneas de proceso (Scragg, 1996).

Precipitación con disolventes orgánicos

Esta técnica consiste en agregar disolventes orgánicos miscibles en agua, particularmente etanol o acetona, a la solución acuosa que contiene la proteína disuelta. Por una reducción de la constante dieléctrica de la solución, baja el poder de solvatación del agua que rodea a la proteína, produciendo su aglomeración y precipitación (Scragg, 1996).

El etanol posee una constante dieléctrica menor que el agua, por lo que su adición a una solución acuosa de proteína incrementa la fuerza de atracción entre las cargas opuestas, disminuyendo de este modo el grado de ionización de los grupos R de los aminoácidos de

la proteína, causando agregación de las proteínas y su posterior precipitación (Lehninger, 1990).

Una de las desventajas de este método es que los solventes pueden causar desnaturalización de las proteínas a temperaturas mayores, por lo que este parámetro debe controlarse suficientemente (Lehninger, 1990). Además, el uso de solventes orgánicos no es deseable debido a que los costos del equipo necesario para la prevención de riesgos es muy alto (Harris y Angal, 1990).

Precipitación isoelectrica

Este método aprovecha las propiedades de solubilidad reducida de las proteínas en su punto isoelectrico, donde la carga neta de éstas es cero, por lo que son incapaces de desplazarse en un campo eléctrico. Bajo estas condiciones no existe repulsión electrostática entre moléculas de proteína vecinas, causando precipitación (Lehninger, 1990).

La desventaja principal de este método es que las proteínas son estables solamente en un intervalo limitado de pH, por lo que si no se controla bien este parámetro se puede perder producto en cantidades considerables.

1.2 Procesos de recuperación no convencionales

Teniendo en cuenta las desventajas de los métodos de recuperación convencionales como su agresividad al tratar la muestra (adicional a los métodos descritos se incluyen los sistemas de extracción con solvente), se han buscado procesos alternos que sean amigables y permitan que las proteínas retengan sus propiedades estructurales y como consecuencia su actividad. Estos procesos se conocen como procesos de separación no convencionales y son utilizados en los procesos de recuperación de proteínas presentes en caldos de fermentación diversos.

Dos procesos de recuperación no convencionales que pueden utilizarse en la extracción de proteínas son las micelas invertidas (*reversed micelles*) (Pires, *et. al.*, 1996) y los sistemas de dos fases acuosas (*ATPS: Aqueous Two-Phase Systems*) (Huddleston, *et. al.*, 1991a).

1.2.1 Micelas invertidas

El proceso de micelas invertidas es un proceso que se ha desarrollado recientemente. Consiste en hacer extracciones líquido-líquido para recuperar proteínas. Las proteínas retienen sus propiedades al solubilizarse en solventes orgánicos con agentes tensoactivo, y se pueden transferir entre una solución acuosa y una fase orgánica de micelas (Pires, *et. al.*, 1996).

Los factores determinantes del transporte de las proteínas de la fase entre la fase micelar orgánica y la solución acuosa se determinan por las condiciones tanto de ésta última (pH, fuerza iónica y tipo de sal) como también de la fase orgánica (concentración, tipo de agente tensoactivo, tipo de solvente utilizado), así como las fuerzas que intervienen en la transferencia de las proteínas hacia la fase micelar orgánica (interacciones electrostáticas e hidrofóbicas proteína-micelas) (Pires, *et. al.*, 1996).

Los sistemas micelares pueden usarse como un primer paso de las operaciones de purificación, debido a su simplicidad y a su facilidad de escalamiento (Pires, *et. al.*, 1996).

Sin embargo, la incompatibilidad de los solventes orgánicos con proteínas y enzimas es una desventaja principal de este método, así como también los costos originados por las medidas de seguridad industrial que deben tomarse por el uso de dichos solventes, ya que éstos son inflamables y volátiles en su mayoría.

1.2.2 Extracción líquido-líquido con sistemas de dos fases acuosas

Entre los procesos de separación no convencionales, los sistemas de dos fases acuosas representan un método eficiente para recuperar proteínas de interés de caldos de fermentación, pero también para purificar y concentrar el producto deseado (Huddleston, *et. al.*, 1991a y Rito-Palomares y Lyddiatt, 1996). Adicionalmente, pueden reducir el número de operaciones unitarias de un proceso.

Dos propiedades de los sistemas de dos fases acuosas son la alta viscosidad y la baja tensión superficial que poseen, las cuáles confieren ventajas de proceso, ya que se permite la formación de áreas de contacto muy grandes de las fases dispersas; baja difusividad molecular, rápida transferencia de masa entre las fases y baja velocidad de separación de fases debido a éstas (Perrson, *et. al.*, 1998).

Un sistema de dos fases acuosas se forma al mezclar concentraciones determinadas de dos sustancias inmiscibles, por ejemplo, puede formarse con soluciones acuosas de dos polímeros o un polímero y una sal. Un sistema de dos fases acuosas puede contener hasta un 90% de agua, característica que propicia un ambiente amigable para la recuperación de proteínas (Albertsson, 1986 y Huddleston, *et. al.*, 1991a).

Entre los sistemas polímero-polímero más conocidos está el formado por polietilenglicol (PEG)-dextrano, cuya utilización a escala industrial es desfavorable desde el punto de vista económico debido al alto costo del dextrano. Sin embargo, la utilización de sistemas de dos fases acuosas polímero-sal representan una alternativa económicamente conveniente para su implementación a gran escala. Entre los sistemas polímero-sal más utilizados son los formados por PEG y fosfatos (Huddleston, *et. al.*, 1991a).

Los fundamentos, descripción y aplicaciones de los sistemas de dos fases acuosas se detallan en el Capítulo 2.

CAPITULO 2. Introducción

2.1 Descripción de un sistema de dos fases acuosas

Los sistemas PEG-fosfato de dos fases acuosas se representan en un diagrama de fases (**Figura 2.1**). La línea que separa la región monofásica de la bifásica se conoce como curva binodal. En un sistema bifásico, cada fase se encuentra enriquecida por uno de los dos compuestos que la forman. Los componentes (macromoléculas) que se adicionan a los sistemas se distribuyen entre las dos fases del sistema.

Existen ciertos parámetros físicos y químicos de los sistemas que pueden manipularse para inducir una separación específica de algún compuesto en una de las fases, mientras que el resto de los componentes en la muestra tendrán preferencia por la otra fase o la interfase (Walter, *et. al.*, 1985). Algunos de estos parámetros son el tipo y peso molecular del polímero, el pH global del sistema, la composición polímero/sal del sistema y la naturaleza y concentración de sales que pueden agregar (Huddleston, *et. al.*, 1991a).

2.2 Ventajas y desventajas de los sistemas de dos fases acuosas

Los sistemas de dos fases acuosas, presentan ventajas y limitaciones (**Tabla 2.1**), las que se deben tomar en cuenta dependiendo la suspensión biológica que va a utilizarse, de

manera que el proceso pueda adaptarse en la mayor medida posible a la situación que se enfrenta, es decir, a la naturaleza de la muestra que se utiliza.

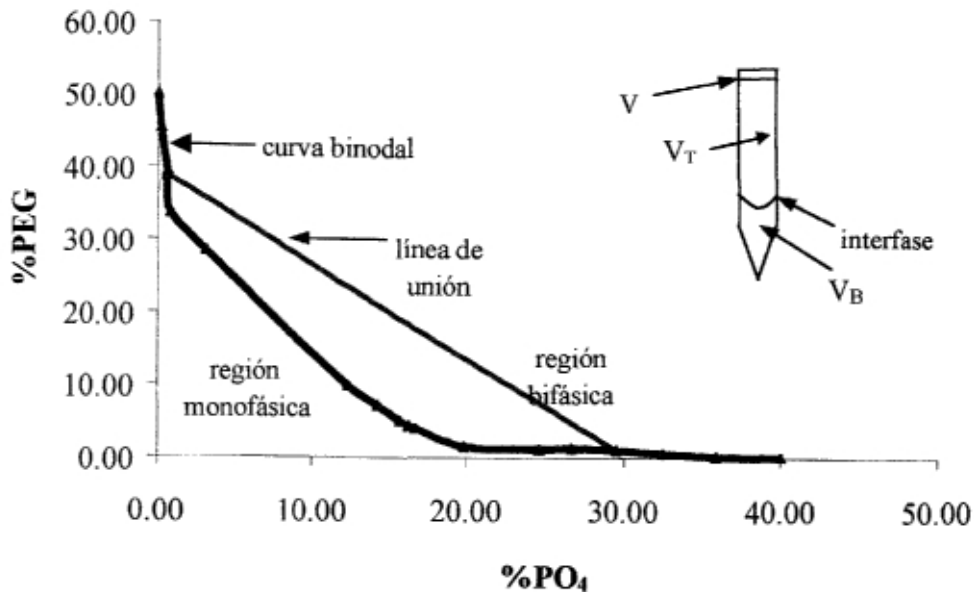


Figura 2.1 Representación de un diagrama de fases para sistemas PEG1450-fosfato.

En los ejes coordenados se representan las composiciones en peso de los componentes (PEG1450 y fosfato) del sistema. En la esquina superior derecha se muestran las partes que se identifican visualmente en un sistema de dos fases acuosas en un tubo de centrífuga.

Unas de las ventajas más importantes de los sistemas de dos fases acuosas es la compatibilidad que tienen con los sistemas biológicos, debido principalmente al gran contenido de agua que tienen los sistemas de dos fases (más de 90% de agua en cada fase) y a la baja tensión interfacial que los caracteriza, lo que propicia un ambiente amigable para las proteínas, las cuáles, bajo estas condiciones, mantienen su estructura y

su actividad. Además, las separaciones líquido-líquido requieren un mínimo de energía al ser un proceso que se gobierna termodinámicamente, situación contraria a una separación sólido-líquido que es puramente mecánica (Huddleston, *et. al.*, 1991a).

Las desventajas principales de este proceso son el ensuciamiento ocasionado por el polímero en membranas de ultrafiltración y en columnas cromatográficas, así como las dificultades para reciclar el polímero, aunque el reciclaje ya ha sido probado (Cliffe, 1996). Sin embargo, en cuanto al re-uso de la fase rica en polímero en procesos de extracción, existen reportes interesantes (Rito- Palomares y Lyddiatt, 1996). Otra limitante que se ha encontrado se debe a los costos de las materias primas utilizadas (dextrano), teniendo como resultado que la operación sea económicamente inconveniente a nivel industrial.

En la **Figura 2.2** se presenta un esquema del proceso de recuperación de proteínas con sistemas de dos fases acuosas. La suspensión biológica se introduce por un conducto o tubería, mientras que la mezcla de polietilenglicol (PEG) y fosfato se introduce por uno diferente, para posteriormente mezclar ambas hasta obtener la homogenización de la mezcla resultante.

Tabla 2.1 Algunas ventajas y desventajas de los sistemas de dos fases acuosas

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Proceso de operación fácil. Posibilidad de escalamiento (Huddleston, et. al., 1991a) • Gran rendimiento de producto • Sustituye a las separaciones mecánicas sólido-líquido por extracciones líquido-líquido que se gobiernan termodinámicamente (Huddleston, et. al., 1991a). • Estrés mínimo sobre las partículas durante el transporte en la interfase debido a la baja tensión interfacial de los sistemas (Baskir, et. al., 1989). • Baja toxicidad de los componentes sobre sistemas biológicos utilizados (Chen y Lee, 1995). • Biocompatibilidad de macromoléculas, tales como proteínas de interés y enzimas. • Adecuación para operación en procesos en lotes (Hustedt et. al., 1986) o continua (Rito-Palomares y Lyddiatt, 1996). 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificultad para reciclar el polímero (Cliffe, 1996) • Dificultad para separar el polímero de la proteína (Cliffe, 1996). • En sistemas PEG-dextrano: El dextrano es desfavorable desde el punto de vista económico (Cliffe, 1996). • En sistemas PEG-sal: Baja solubilidad de proteínas anfipáticas, tendencia a agregarse en la solución acuosa (Perrson, et. al., 1998). • El polímero causa ensuciamiento en las unidades de UF y columnas cromatográficas (Cliffe, 1996). • El desarrollo del método ha sido empírico por falta de comprensión de los mecanismos de partición (Cliffe, 1996). • No hay un modelo matemático general que describa el comportamiento de un sistema de dos fases acuosas (Johansson, et. al., 1998)

El tiempo de mezclado varía según la suspensión y la composición PEG-fosfato que se utilice. Se requiere de una unidad de estabilización del sistema bifásico, para separar la fase superior (PEG) de la inferior (fosfatos), ya que la primera, rica en proteínas, puede seguir con los procesos de concentración y purificación del producto. La fase inferior,

que aun puede contener algo de proteínas, se recircula al mezclador para una segunda extracción.

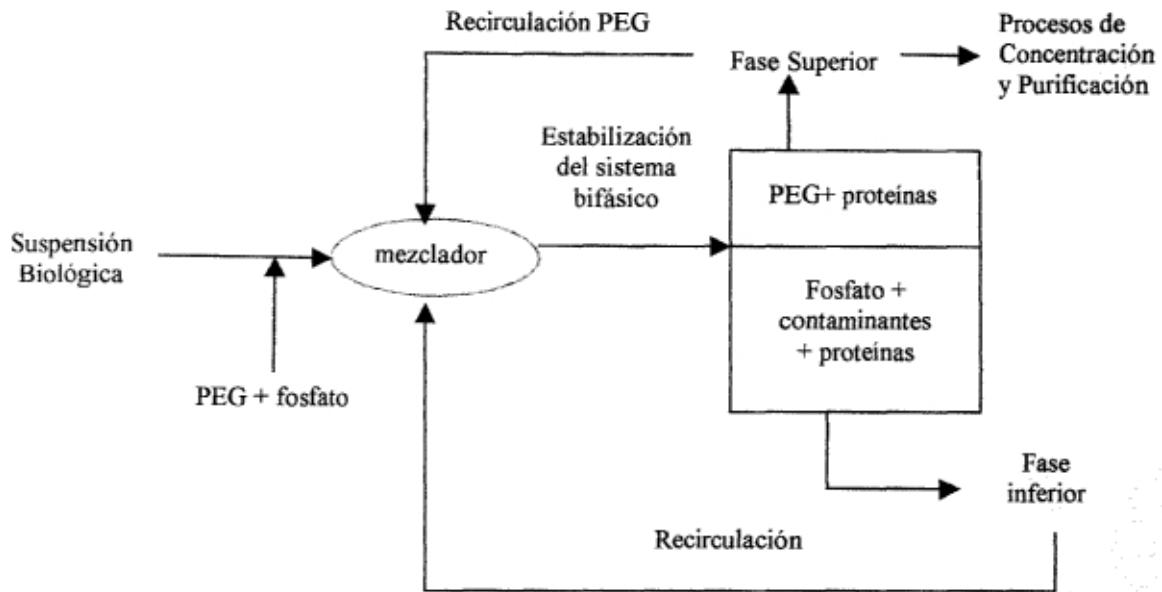


Figura 2.2 Esquema del proceso de recuperación de proteínas utilizando sistemas de dos fases acuosas.

La suspensión biológica que contiene la proteína de interés se pone en contacto con el PEG y el fosfato en un mezclador. Posteriormente, se pasa la mezcla a un contenedor donde se deja estabilizar el sistema bifásico. La fase superior contiene gran parte de la proteína presente en la suspensión y ésta puede pasar a los procesos de concentración y purificación, mientras que el PEG puede recircularse hacia el mezclador. De la misma forma, las proteínas que quedan en la fase inferior se recirculan hacia el mezclador para realizar una segunda extracción.

2.3 Conceptos principales

Entre los parámetros que se pueden medir en un sistema de dos fases acuosas son la longitud de línea de corte (*tie-line length*: TLL), los volúmenes de las fases, la relación de volúmenes de las fases (V_r) y la posición de la curva binodal en el diagrama de fases (**Figura 2.1**), los cuales pueden modificarse por el efecto de suspensiones biológicas presentes en el sistema (Rito-Palomares y Lyddiatt, 1996).

La relación de volúmenes (V_r), se define como el volumen de la fase superior (V_T) entre el volumen de la fase inferior (V_B) (Huddleston, *et. al.*, 1991a):

$$V_r = \frac{V_T}{V_B}$$

El volumen total (V) del sistema es la suma del volumen de las dos fases

$$V = V_T + V_B$$

La longitud de línea de unión (*Tie-line length*: TLL) describe una concentración de equilibrio de los dos componentes del sistema de dos fases acuosas entre sí en el diagrama de fases, y se calcula como (Chen, 1992)

$$\%TLL = \sqrt{(\Delta PO_4)^2 + (\Delta PEG)^2}$$

Donde	TLL	Longitud de línea de unión (%w/w)
	ΔPO_4	diferencia o gradiente de concentraciones de fosfato entre las fases (%w/w)
	ΔPEG	diferencia o gradiente de concentraciones de polietilenglicol entre las fases (%w/w).

La partición protéica se caracteriza a través del coeficiente de partición (K_p), el que se define como la relación de las concentraciones de proteína en las fases superior e inferior (Hamad, *et. al.*, 1996 y Grossman y Gainer, 1988):

$$K_p = \frac{C_t}{C_b}$$

Donde	K_p	Coefficiente de partición proteica
	C_t	Concentración de proteína en la fase superior ($\mu\text{g/mL}$)
	C_b	Concentración de proteína en la fase inferior ($\mu\text{g/mL}$)

La línea divisoria entre una y dos fases se conoce como la curva binodal (Walter, *et. al.*, 1989).

En la **Figura 2.3** se representa el diagrama de fases PEG1450-fosfato. Mediante prueba y error, se puede encontrar un sistema de dos fases a cierta composición de PEG1450 y

fosfato cuya relación de volumen de las fases sea aproximadamente 1 ($V_r \approx 1.0$) con la finalidad de encontrar una longitud de línea de corte (*tie-line length: TLL*). Una vez definida la TLL, se pueden identificar sobre ésta otros sistemas bifásicos posibles. Sobre esta línea de corte existen sistemas con $V_r > 1$ y sistemas con $V_r < 1$.

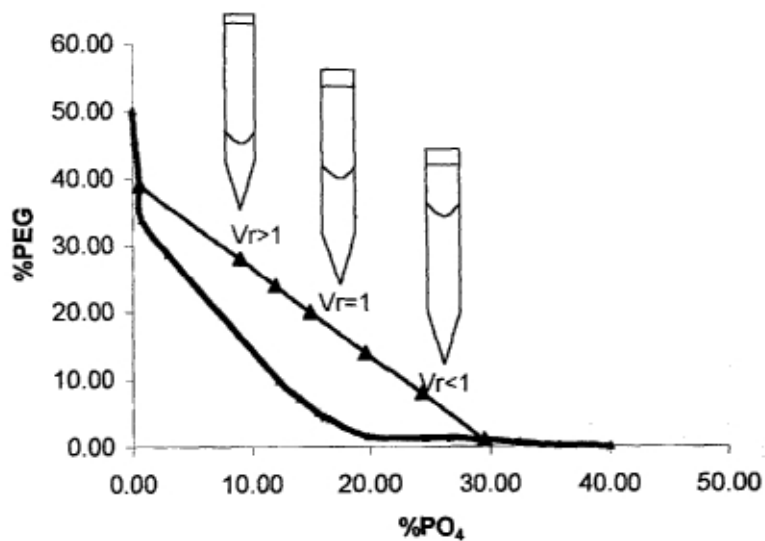


Figura 2.3 Relación de volumen de las fases de Sistemas de dos Fases Acuosa en diferentes posiciones a lo largo de una TLL.

En una TLL, se puede identificar un sistema bifásico que tiene una relación de volúmenes (V_r) igual a 1.0. Hacia mayores concentraciones de PEG sobre la misma TLL, se identifican sistemas con una relación de volúmenes mayor a 1.0, y hacia menores concentraciones de PEG se identifican sistemas con una relación de volúmenes menor que 1.0.

2.4 Aplicaciones de los sistemas de dos fases acuosas

El comportamiento de partición de proteínas en sistemas de dos fases acuosas se ha intentado predecir mediante la modelación matemática involucrando parámetros conocidos (Baskir, *et. al.*, 1989, Diamond y Hsu, 1990). Las investigaciones y los métodos desarrollados han sido numerosos (Cabezas, 1996), pero hasta la fecha no se ha podido desarrollar un modelo descriptivo para cualquier sistema en general.

Grossmann y Gainer (1988) intentaron explicar el fenómeno de formación de fases y la partición de proteínas en función del volumen libre del sistema. El volumen libre (*free volume*: FV) se determina el coeficiente de partición de la proteína, dependiendo de su peso molecular. Suponiendo una solución PEG-buffer, el volumen libre de dicha solución se calcula como:

$$FV = \frac{1}{\rho} - \frac{1}{\rho_B}$$

Donde	FV	Volumen disponible para recibir solutos, volumen libre
	ρ	Densidad de la solución PEG-buffer
	ρ_B	Densidad del buffer

El volumen libre, a su vez, determina el coeficiente de partición de la proteína, el cuál está en función de su peso molecular:

$$Kp = \Delta FV \exp(A * PM)$$

Donde ΔFV	Diferencia entre el volumen libre de la solución en la región monofásica y en la región bifásica
A	Factor de corrección para el sistema
PM	Peso molecular de la proteína

Baskir, *et. al.* (1989) presentan una serie de ecuaciones que pretenden predecir la partición protéica en función de la composición del sistema, como son los componentes que lo forman, el peso molecular del polímero, el tamaño de la proteína y su concentración, concentración de sal, las propiedades de la superficie del material que se pretende separar, el pH de la solución y la temperatura, entre otros. La mayoría de estos estudios se han realizado para sistemas de dos fases acuosas polímero-polímero (Baskir, *et. al.*, 1989, Schluck, *et. al.* 1995, Hamad, *et. al.*, 1996). A pesar de que los sistemas polímero-sal son mucho más económicos, pocos modelos matemáticos han sido desarrollados para éstos.

Desde un punto de vista empírico, los sistemas de dos fases acuosas se han aplicado ampliamente en una cantidad considerable de muestras biológicas. Por ejemplo, Chen y Lee (1995) aplicaron los sistemas de dos fases acuosas para obtener quitinasa. En un sistema PEG-dextrano se cultivó *Serratia marcescens* en presencia de quitina, aprovechando que cuando ésta es la única fuente de carbono para el microorganismo se induce la producción de quitinasa, la cuál se incrementa aumenta en presencia del dextrano, mientras que la presencia de PEG provoca una autólisis celular. Los resultados

mostraro que la célula emigra hacia la fase superior y la quitinasa y quitina hacia la inferior. Esta investigación pretende la recuperación de la quitina presente en el esqueleto del pescado para utilizarla como sustrato de otros productos.

Zijlstra, *et. al.* (1996), aplicaron los sistemas de dos fases acuosas en bioconversiones extractivas. Realizaron un experimento de crecimiento celular animal en un sistema PEG-dextrano. Se logró el crecimiento de hibridoma de ratón en una fase, y la producción de proteína extracelular y su acumulamiento en la otra fase. También se han realizado bioconversiones extractivas con bacterias, levaduras y células vegetales.

En procesos de recuperación de proteínas de residuos, Hernández (1997), utilizó una suspensión de suero de leche para recuperar las proteínas lácteas α -Lactalbúmina y β -Lactoglobulina. Mediante la variación de algunos parámetros de los sistemas acuosos, tales como el pH, la relación de volúmenes del sistema (V_r) y la longitud de línea de unión (*tie-line length: TLL*), se investigaron sus efectos sobre el coeficiente de partición protéico. Se encontró que al aumentar la longitud de línea de unión (TLL) así como la relación de volúmenes de las fases (V_r), aumenta el coeficiente de partición protéica (K_p), sin embargo, éste no se afecta por variaciones en el pH entre valores de 6.5-9.5. Cuando aumenta K_p , el rendimiento de las proteínas en la fase superior es mayor.

Rito-Palomares y Lyddiatt (1996) recuperaron proteínas de subproductos de la industria cervecera. Evaluaron los métodos de ruptura celular para estudiar la influencia de la biomasa en la recuperación de proteínas usando sistemas de dos fases acuosas, así como

el efecto del debrís celular sobre el V_r de los sistemas, concluyendo que la presencia de biomasa ocasiona su reducción, particularmente en los sistemas que originalmente tenían un V_r cercano o menor que la unidad.

También en el área de recuperación de proteínas, Kuboi, *et. al.*, (1995), utilizaron sistemas de dos fases acuosas en la producción de enzimas intracelulares, como la β -galactosidasa, producida por cultivos de *E. coli* en sistemas PEG/sal; Walker & Lyddiatt (1998) recuperaron proteínas recombinantes, expresadas en cuerpos de inclusión. Umakoshi, *et. al.* (1996) reportan la producción, liberación y separación de proteínas intracelulares (HSP: *heat-shock proteins*) a partir de *E. coli* utilizando sistemas PEG/dextrano.

Köhler, *et. al.* (1989) investigaron acerca de la influencia de la biomasa post ruptura celular en los sistemas de fases acuosas, y encontraron que los componentes presentes en la suspensión biológica son contribuyentes a la formación de fases, logrando así un desplazamiento hacia concentraciones más bajas de PEG y fosfatos, situación económicamente favorable a escala industrial que implica un aprovechamiento de la biomasa para obtener sistemas bifásicos al mismo tiempo que se logra una reducción de costos por requerimientos de materia prima para el proceso.

2.5 Objetivo de la investigación

En el presente trabajo, se investiga la influencia de biomasa proveniente de diferentes fuentes biológicas sobre la formación de fases de sistemas PEG1450-fosfato de dos fases acuosas.

Específicamente, esta investigación pretende observar el efecto de cuatro suspensiones biológicas sobre sistemas de dos fases acuosas, evaluado como los cambios en la relación de volumen de las fases (V_r), así como la posición de la curva binodal en el diagrama de fases bajo condiciones de pH, temperatura y cantidad de biomasa constantes. Los resultados obtenidos permiten identificar algunas condiciones de operación favorables para la recuperación de proteínas presentes en estas suspensiones.

El cambio del V_r por efecto de suspensiones biológicas proporciona una medida de la contribución de la biomasa en la formación de fases, como resultado de la interacción de sus componentes con el sistema, la cuál se refleja también en el desplazamiento de la curva binodal del diagrama de fases.

CAPITULO 3. Materiales y Métodos

Los reactivos utilizados y el material biológico para la realización de esta investigación fueron:

Reactivos utilizados

Acido fosfórico (H_3PO_4). P.M. 98.00 g/gmol. Productos Químicos Monterrey.

Hidróxido de sodio (NaOH) P.M. 40.00 g/gmol. Productos Químicos Monterrey.

Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4). P.M. 174.18 g/gmol. Productos Químicos Monterrey.

Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4). P.M. 136.09. Productos Químicos Monterrey.

Cloruro de sodio (NaCl). P.M. 58.44 g/gmol. Productos Químicos Monterrey.

Polietilenglicol (PEG).(-[CH(OH)-CH(OH)]_n-). P.M. 1450.00 g/gmol.

Sigma Chemical Co.

Lisozima. Sigma Chemical Co.

Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG). ($C_9H_{18}SO_5$).P.M. 238.30 g/gmol. Sigma Chemical Co.

Ampicilina ($C_{16}H_{18}N_3O_4Na$). P.M. 371.40 g/gmol. Sigma Chemical Co.

Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (DMSF). ($C_7H_7FO_2S$). P.M. 174.20 g/gmol. Sigma Chemical Co.

Clorhidrato de trihidroximetil-aminometano. ($NH_2C(CH_2OH)_3 \cdot HCl$). P.M. 157.60 g/gmol. *Fisher Chemical*. Fisher Scientific.

1,4-ditiotreitol (DTT). (C₄H₁₀O₂S₂). P.M. 154.30 g/gmol. Boehringer-Mannheim.

Hielo seco (CO₂). P.M. 44.00 g/gmol. Praxair.

Etanol Absoluto. (CH₃CH₂OH). P.M. 46.06 g/gmol. Analytyka.

Extracto de levadura. BIOXON.

Peptona de caseína. BIOXON.

Bacto[®] Triptona. DIFCO Laboratories

Buffer de calibración para electrodo @pH=4.00 y 7.00±0.02, 25°C

Agua bidestilada @pH=7.00 ±0.02, 25°C

Material biológico

Cepa *Trichoderma harzianum* Rifai IMI-206040. International Mycological Institute.

Cepa de *Escherichia coli* Epicurean coli[®] BL21 (DE3). Centro de Biotecnología, ITESM Campus Monterrey.

Cepa *Saccharomyces cerevisiae* AID. Mellon Institute. Carnegie Mellon University.

Productora de la mutante: Dra. Susan A. Henry.

Suero de leche, obtenido a partir de leche comercial disponible.

3.1 Obtención de las suspensiones biológicas

Se seleccionaron cuatro suspensiones biológicas diferentes: caldo de fermentación de un cultivo micelar (*T. harzianum*), caldo de fermentación de un cultivo bacteriano (*E. coli*), caldo de fermentación de una levadura (*S. cerevisiae*) y finalmente suero de leche proveniente de leche entera comercial.

Las suspensiones biológicas se seleccionaron con base a diferencias que presentan los tres tipos de microorganismos, tales como su tamaño celular y la localización de las proteínas que contienen (extracelulares o intracelulares).

3.1.1 Suspensión de *T. harzianum*

La cepa fue proporcionada por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM). Esta cepa es productora de las proteínas extracelulares β -1,3-glucanasas (Vazquez-Garcidueñas, *et. al.* 1998), producción que se intensifica en presencia del β -1,3-glucano.

El cultivo esporulado se almacenó a 4°C por un periodo máximo de un mes. Se realizó una inoculación del cultivo semilla en medio PDA estéril, para después incubarse a 29°C por 4 días (Serrano-Carreón, *et. al.*, 1992).

Se pesaron 20.00 \pm 0.10 g. de extracto de malta y 10.00 \pm 0.10 g. de dextrosa anhidra (balanza OHAUS "Precision Plus" modelo TP4KD, precisión 0.01 g) por cada litro de medio preparado. Se disolvió la dextrosa anhidra en agua destilada y lentamente se agregó el extracto de malta, manteniendo agitación constante con un agitador magnético (plancha de calentamiento Thermolyne, modelo Cimarec 2) para evitar la formación de grumos. Se ajustó el pH a 5.60 \pm 0.02 (potenciómetro Beckman θ 50) con NaOH 2M. La

concentración de esporas necesaria para relizar la fermentación es de 5000 esporas /mL equivalente 2.358 mL por litro de medio (Negrete, 1998).

El preinóculo debe constituir 10% del volumen total que se desea fermentar, en este caso fue de 2L, por consiguiente el preinóculo fue de 200mL. La cantidad de esporas que se utilizaron para el preinóculo fue de 471.68 μ L. Este se incubó por 72 horas en un matraz Erlenmeyer de 1L por 72 horas @30°C y 200 rpm, observándose un aspecto turbio acompañado de crecimiento micelial perceptible por la formación de un anillo en el matraz. Pasado este período, el preinóculo se agregó al medio esteril restante (1.8 L) y se incubó en un matraz Erlenmeyer de 2.5 L por 72 horas @a 30°C y 200 rpm. Finalmente, se tomaron alicuotas de 40 mL. en tubos de centrifuga graduados FisherBrand de 50 mL. de capacidad, y se guardaron @4°C.

3.1.2 Suspensión de *E. coli*

La cepa fue proporcionada por el Dr. Juan Manuel de la Fuente, profesor del Centro de Biotecnología del ITESM, Campus Monterrey. Esta cepa es una mutante capaz de producir proteínas intracelulares. Se inoculó en 3mL. de medio estéril de extracto de levadura-triptona-cloruro de sodio-ampicilina, para después incubarse (incubadora Lab-Line, modelo Imperia III) a 37°C y 225 rpm por 12 hrs (Sambrook, *et. al.*,1989). Pasado este período y habiendo observado el crecimiento bacteriano (turbidez), se agregó este preinóculo a un litro del medio estéril y se incuba por 1 hora bajo las mismas condiciones

anteriores. Se agregó IPTG (para inducir la producción de proteínas) de tal forma que su concentración en el medio fuera de 1.5mM, y se incubó nuevamente por 3 horas.

Se centrifugó (centrífuga Beckman GS-15R) a 10,000 rpm en el rotor JA-10. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 200 mL. de buffer de lisis y se guardó a 4°C. El buffer de lisis se preparó mezclando 10 mL. de Tris-Cl 1M @ pH=8.00±0.02 (potenciómetro Beckman 050) con 180mL de agua bidestilada, solución que posteriormente se esterilizó.

Al enfriarse, se agregaron 0.031 g. de DTT, 0.40 g. de lisozima, 10 mL. de PMSF 10 mM (concentración que se obtuvo al mezclar 0.1742 g de PMSF en 100 mL. de etanol absoluto).

Finalmente, se tomaron alícuotas de 25 mL. en tubos de centrifuga graduados FisherBrand de 50 mL de capacidad y se guardaron @4°C.

3.1.3 Suspensión de *S. cerevisiae*

Esta cepa fue proporcionada por la M.C. Claudia Almaguer, estudiante de maestría en Biotecnología en el período Agosto 1996-Julio 1998. Las proteínas que produce esta cepa son intracelulares. Se siguió el protocolo descrito por Sambrook, *et. al.*, (1989), sobre la fermentación de *S. cerevisiae*, y el producto se guardó en alícuotas de 40 mL. en tubos de centrifuga graduados FisherBrand de 50 mL. de capacidad @ 4°C.

3.2 Ruptura celular de los cultivos microbianos

Con un máximo de 4 días antes de la utilización de los cultivos preparados, se lisaron las células de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *T. harzianum* con shock térmico utilizando un baño térmico de CO₂/Etanol y un baño de 37°C, pasando la biomasa de un ambiente a otro varias veces. Las células lisadas se guardaron en el refrigerador a 4°C.

3.3 Suspensión de suero de leche

Se obtuvo suero de leche a partir de leche comercial LALA *Premium* precipitando la caseína con H₃PO₄ (5M), midiendo el pH (potenciómetro Beckman Modelo 050) hasta alcanzar una lectura final de 4.10 ± 0.01. Posteriormente se separó la caseína por centrifugación (centrífuga Beckman, modelo GS-15R) usando el rotor basculante JS-7.5 a 4800 rpm por 20 min. a 25°C. Se guardó el suero a 4°C por un período no mayor de 4 días. El suero de leche también puede obtenerse de residuos de la industria láctea, pero éste contiene una gran cantidad de sal, cuya presencia podría influir en los resultados (Huddleston, *et. al.*, 1991a), razón por la que se preparó a partir de leche comercial.

3.4 Construcción de Sistemas de dos Fases Acuosas

Los sistemas se construyeron usando PEG1450 y sales de fosfato de potasio dibásico y monobásico en una relación en peso de 18/7 (w/w) (K₂HPO₄/KH₂PO₄), para obtener una solución con pH cercano a la neutralidad (Huddleston, *et. al.*, 1991a).

3.4.1 Diagrama de fases PEG 1450-fosfato

La curva binodal correspondiente al PEG1450-fosfato (**Figura 3.1**) se construyó por el método de turbidez (Walter, *et. al.* 1985), el cuál consiste en pesar una cantidad definida (aproximadamente 2.00g.) de una solución acuosa de PEG 1450 al 50% en peso, a la cuál se agregó gota a gota, una solución acuosa de fosfatos de potasio al 40% en peso hasta observar turbidez (formación de dos fases). Se registró este peso y posteriormente se agregaron 0.50 g. de agua bidestilada donde se observó que la turbidez desaparece (se obtiene una sola fase). Se registró el peso nuevamente. Se repitió la operación desde agregar solución de fosfatos hasta el punto de turbidez, agregando 0.5 mL. de agua y pesando cada vez hasta tener suficientes puntos para construir el diagrama de fases. Se construyó una gráfica %PEG1450 vs. %fosfatos en peso con respecto a los 25 g totales del sistema .

3.5 Construcción de sistemas de dos fases acuosas para observar el efecto de las suspensiones biológicas sobre la relación de volumen de las fases (V_r).

La selección de los sistemas de dos fases acuosas (ATPS) se basó en dos factores: la longitud de línea de corte o “tie-line length” (TLL) y la relación de los volúmenes de las fases (V_r).

El efecto de las suspensiones biológicas sobre la eficiencia de separación fue estudiado evaluando los cambios en el V_r de los sistemas construidos con las diferentes suspensiones. Para este propósito se seleccionaron tres conjuntos de sistemas de dos

fases acuosas. Cada conjunto contiene cinco sistemas a lo largo de una TLL. El primer conjunto de sistemas (A-E) está sobre una línea de corte cercana a la curva binodal, mientras que el segundo y el tercer conjunto (F-J y K-O) están sobre líneas de corte lejanas a la curva binodal (**Figura 3.1**).

Los sistemas se construyeron en proporciones peso/peso (w/w) tomando como base 15 gramos totales para las suspensiones de *T. harzianum*, *E. coli* y *S. cerevisiae*, con la proporción de PEG1450 y de fosfatos descrita en la **Tabla 3.1**. Adicionalmente se agregó una cantidad fija de suspensión biológica (7g) y agua bidestilada ajustada a $\text{pH}=7.00\pm 0.02$ para completar el peso base (15g) (Hernández, 1997).

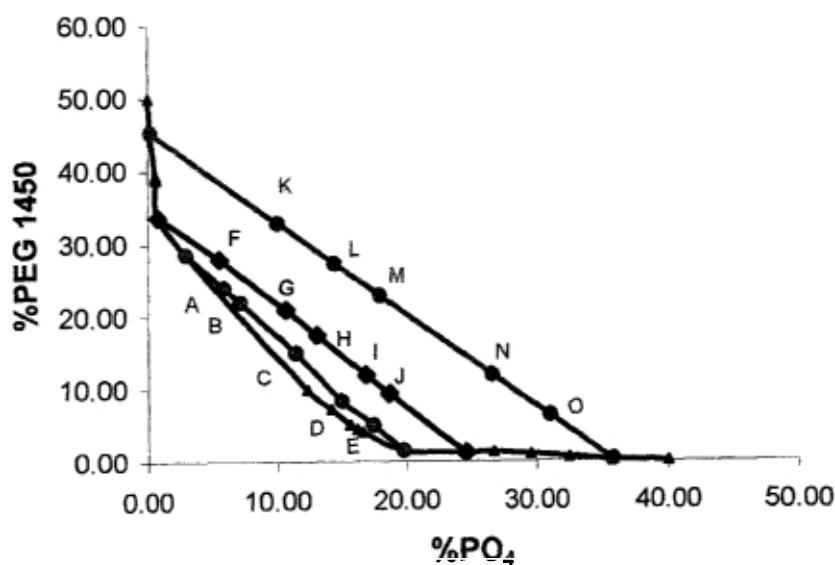


Figura 3.1 Posición y localización de los sistemas de dos fases acuosas seleccionados para evaluar cambios en V_r .

Los sistemas A-E están localizados sobre una línea de corte cercana a la curva binodal (TLL= 31.88%), los sistemas F-J se localizan a una distancia intermedia de la curva binodal (TLL=40.22%) y los sistemas K-O se localizan sobre una línea de corte alejada de la curva binodal (TLL=57.54). La composición de los 15 sistemas se muestra en la **Tabla 3.1**.

Todos los componentes se mezclaron en tubos de centrifuga graduados de 15 mL. de capacidad y se agitaron por tres minutos aproximadamente, (agitador ciclónico Vortex Genie 2 modelo G-560, VWR Scientific) hasta lograr la disolución completa de sólidos.

La separación completa de las fases fue por centrifugación (centrífuga Beckman GS-15R) de cada sistema a 2400 rpm por 20 min. @ 25°C, usando el rotor JS-7.5.

Tabla 3.1 Composición de los sistemas de dos fases acuosas A-O para evaluar cambios en la relación de volúmenes (V_r) de las fases.

SISTEMA	%PEG	%PO ₄	%TLL
A	24.0	6.0	31.88
B	22.0	7.2	31.88
C	15.0	11.4	31.88
D	8.4	15.0	31.88
E	5.0	17.5	31.88
F	24.0	8.5	40.22
G	21.0	10.6	40.22
H	17.5	13.0	40.22
I	12.0	16.9	40.22
J	9.4	18.7	40.22
K	33.0	10.0	57.54
L	27.4	14.4	57.54
M	23.0	18.0	57.54
N	12.0	26.5	57.54
O	6.4	31.0	57.54

Los sistemas A-E están localizados sobre una línea de corte cercana a la curva binodal (TLL= 31.88%), los sistemas F-J se localizan a una distancia intermedia de la curva binodal (TLL=40.22%) y los sistemas K-O se localizan sobre una línea de corte alejada de la curva binodal (TLL=57.54).

La relación de volumen de las fases (V_r) se determinó visualmente tomando las lecturas del volumen de cada fase en los tubos de centrifuga graduados para cada uno de los sistemas blanco así como para cada suspensión biológica.

3.6 Evaluación del efecto de las suspensiones biológicas sobre la posición de la curva binodal en el diagrama de fases

Además del V_r , el cambio en la posición de la curva binodal con las diferentes suspensiones representó otro parámetro para medir la influencia de las suspensiones biológicas en los sistemas de dos fases acuosas.

Construcción de sistemas de dos fases acuosas

El criterio de selección de los sistemas de dos fases acuosas para evaluar este efecto fue la posición de estos sistemas en el diagrama de fases con respecto a la curva binodal original (Sección 3.4.1).

Se construyeron 15 sistemas blanco (1-15) Ver **Tabla 3.2**. Los sistemas del 1 al 5 están sobre la curva binodal, del 6 al 10 por encima de la curva binodal y del 11 al 15 por debajo de ésta (**Figura 3.2**).

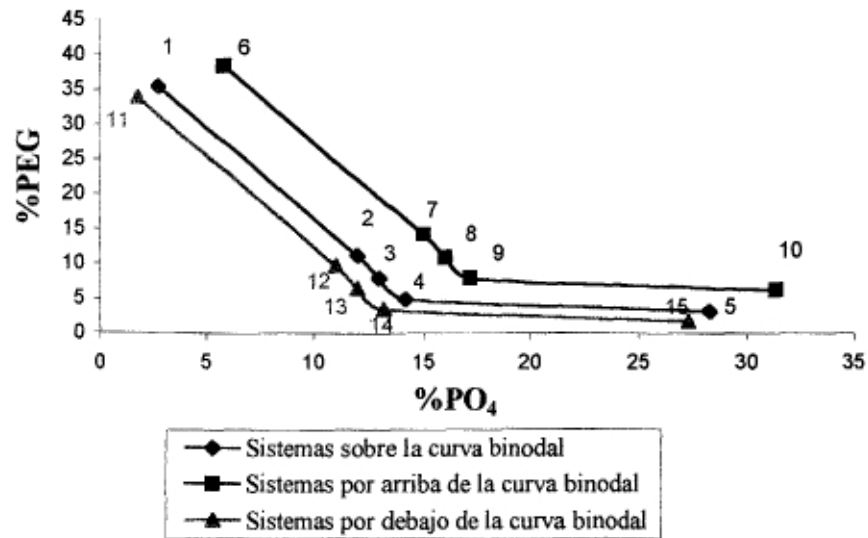


Figura 3.2 Ubicación de sistemas de dos fases acuosas (1-15) para evaluar el efecto de las suspensiones biológicas sobre la posición de la curva binodal en el diagrama de fases. Los sistemas 1-5 están sobre la curva binodal, por encima de ésta están los sistemas 6-10 y por debajo están los sistemas 11-15 (Ver Figura 2.1).

Primeramente se construyeron los sistemas de dos fases acuosas que están sobre la curva binodal, es decir del sistema 1 al 5 para las suspensiones de *T. harzianum*, *E. coli* y *S. cerevisiae*, para determinar de forma visual la formación de un sistema bifásico o monofásico. Posteriormente, se construyeron los sistemas 11 al 15 para cada una de estas tres suspensiones biológicas para evaluar el grado de desplazamiento de la curva binodal hacia abajo y del 6 al 10 para evaluar el grado desplazamiento de la curva binodal hacia arriba por efecto de dichas suspensiones.

Tabla 3.2 Composición de los sistemas de dos fases acuosas 1-15 para evaluar el efecto de las suspensiones biológicas en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases.

Sistema*	%PEG	%PO ₄
1	35.66	2.77
2	11.33	12.00
3	8.00	13.00
4	5.00	14.20
5	3.20	28.33
6	38.66	5.77
7	14.33	15.00
8	11.00	16.00
9	8.00	17.20
10	6.20	31.33
11	33.16	0.77
12	8.83	10.00
13	5.50	11.00
14	2.50	12.20
15	0.70	26.33

Los sistemas 1-5 están sobre la curva binodal, los sistemas 6-10 están por encima y los sistemas 11-15 están por debajo de ésta.

Adicionalmente se utilizó otra forma de evaluar el efecto de la suspensión biológica en la posición de la curva binodal, fue construir los sistemas blanco I-IV que se representan gráficamente en la **Figura 3.3** y cuya composición se detalla en la **Tabla 3.3**.

Tabla 3.3 Composición de los sistemas de dos fases acuosas I-IV para evaluar el efecto de las suspensiones biológicas en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases.

Sistema	%PEG	% PO ₄
I	30.00	6.00
II	22.00	9.00
III	14.00	12.00
IV	10.00	15.00

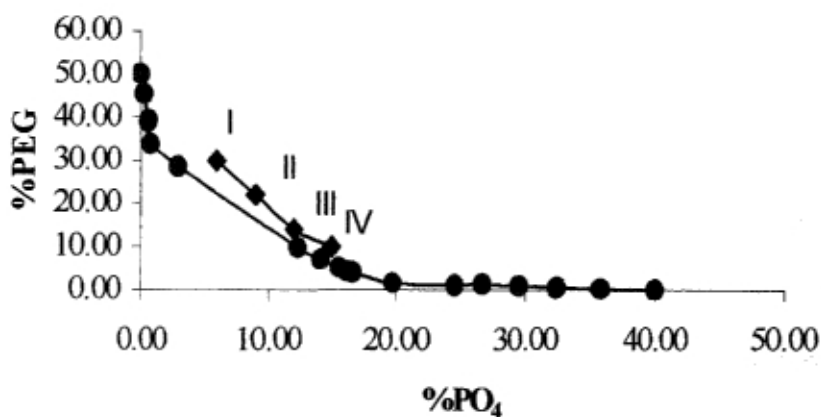


Figura 3.3 Localización de los sistemas de dos fases acuosas I-IV para evaluar el efecto de la suspensión biológica en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases.

Se construyeron los sistemas I-IV con cada una de las suspensiones biológicas, en tubos de centrifuga graduados de 50 mL. de capacidad. Se separaron las fases por centrifugación a 2400 rpm por 20 min. @25°C. A cada sistema (I-IV) correspondiente a cada suspensión biológica se agregaron 200 µL de agua bidestilada, posteriormente se

centrifugó a 1500 rpm por 2 minutos, para permitir la estabilización de las fases. El proceso se repitió hasta observar un sistema monofásico. (Hernández, 1997).

3.7 Suero de Leche: Caso particular de estudio del efecto de suspensiones biológicas sobre la formación de fases de sistemas acuosos.

Se seleccionó la suspensión de suero de leche como caso simplificado de estudio, debido a que ésta tiene pocas proteínas presentes (α -Lactalbúmina y β -Lactoglobulina), así como otras biomoléculas que se han identificado y cuantificado (grasas, lactosa y sólidos insolubles) (Newlander and Atherton, 1964).

La influencia del suero de leche a sobre el V_r de sistemas de dos fases acuosas se estudió siguiendo la metodología descrita en la sección 3.3.2. Igualmente, se siguió la metodología descrita en la sección 3.6 para evaluar los efectos de esta suspensión sobre la posición de la curva binodal, particularmente el efecto de los sólidos suspendidos. Para este propósito en particular, se centrifugó una muestra de suero de leche por 3 horas a 7000 rpm en el rotor basculante JS-7.5. Se separaron los sólidos y se resuspendieron en una solución acuosa al 9% (p/v) de cloruro de sodio. Se construyeron los sistemas I-IV (ver **Tabla 3.3**) para la muestra de sólidos en solución de NaCl así como para el suero sin sólidos, se estabilizaron las fases por centrifugación y se agregaron alícuotas de 200 μ L de agua bidestilada hasta obtener un sistema monofásico.

CAPITULO 4. Resultados y Discusión

La curva binodal en un diagrama de fases PEG-fosfato se forma a partir de puntos que expresan una composición en equilibrio de PEG y de fosfatos. Este equilibrio puede afectarse por varios parámetros, tales como el pH del sistema, la temperatura y la biomasa presente (Köhler, *et. al.*, 1989). Estos parámetros, si se utilizan adecuadamente pueden promover una situación favorable en términos de proceso por ser capaces de afectar la partición de proteínas hacia una de las fases y la partición del debris celular y otros contaminantes hacia la otra fase (Huddleston, *et. al.*, 1991a).

Para evaluar el efecto de la presencia de suspensiones biológicas adicionadas a los sistemas de extracción. Se seleccionaron dos parámetros: la relación de volúmenes de las fases y el desplazamiento de la curva binodal en el diagrama de fases. Dichos parámetros fueron seleccionados con base a reportes que mencionan el efecto de contribución de los componentes de la biomasa en la formación de productos (Köhler, *et. al.*, 1989 y Huddleston, *et. al.*, 1991a).

Las interacciones de biomasa provenientes de diferentes fuentes se espera que sean diferentes, como resultado de su naturaleza celular, tales como el tamaño celular, el peso molecular de las proteínas, la hidrofobicidad de las proteínas y su solubilidad.

4.1 Efecto de las suspensiones biológicas sobre la relación de volúmenes de sistemas de dos fases acuosas

En esta investigación, el pH se mantuvo constante (7.00 ± 0.02), así como la temperatura (23°C) y la cantidad de biomasa en el sistema (7g.). Manteniendo estos tres parámetros fijos, se puede evaluar el efecto de biomasa de las suspensiones biológicas en función de las composiciones de PEG y fosfato como resultado de la interacción de la biomasa con los componentes del sistema, la cual se ve reflejada en cambios de la relación de volúmenes de las fases (V_r), ya que la presencia de biomasa en una fase aumenta su volumen (Huddleston, *et. al.*, 1991a).

4.1.1 Sistemas de dos fases acuosas localizados sobre una TLL cercana a la binodal: sistemas A-E.

Los sistemas de dos fases acuosas formados sobre una TLL (31.88%) cercana a la curva binodal presentan inestabilidad al encontrarse tan cerca de las composiciones de equilibrio en un diagrama de fases (Albertsson, 1986), por lo que su comportamiento probablemente no se puede describir con certeza, por lo que pueden ser más susceptibles a la presencia de biomasa que sistemas situados en una TLL lejana a la curva. Estos sistemas requieren una baja cantidad de químicos para su formación, por lo que cuando se construyen puede pesarse una cantidad ligeramente menor de componentes, lo que lleva al sistema a representar un punto en el diagrama de fases que está casi sobre la curva binodal, con la consiguiente susceptibilidad del sistema a volverse monofásico.

La presencia de las suspensiones en el sistema A, *T. harzianum* y *E. coli* causaron una reducción en la relación de volúmenes de las fases del sistema. Este resultado ha sido atribuido a un incremento de biomasa en la fase inferior del sistema, provocando que el volumen de la misma aumente, con la consecuente disminución de la relación de volúmenes de las fases (**Tabla 4.1**).

Sin embargo, *S. cerevisiae*, muestra un efecto contrario: el V_r del sistema A aumenta considerablemente, pero cabe mencionar que no es por un aumento en el volumen de la fase superior (V_t), sino por una reducción del volumen de la fase inferior (V_b) en un 66% aproximadamente (**Tabla 4.1**). Este efecto se puede atribuir a la hidrofobicidad de los componentes de la suspensión, así como por un volumen libre reducido de la fase inferior, causando que no toda la biomasa se pueda alojar en ésta y se esté forzando a emigrar a la fase superior o a quedar en la interfase. Al alojarse en la fase polimérica, los sólidos provocan un aumento en el V_t , y como consecuencia en el V_r . (Köhler, *et. al.*, 1989). Este resultado sería favorable desde el punto de vista de proceso al disponer de un V_t mayor para la potencial concentración de proteínas (**Figura 4.1**). Sin embargo, si este resultado indicara que la biomasa se ha forzado a emigrar a la fase superior, entonces no resulta favorable puesto que lo que se pretende es una separación en diferente fase de las proteínas y de la biomasa. A pesar de estos resultados, se observaron sólidos en el fondo de la fase inferior (Ver **Figura 4.1**), los que se identifican como sólidos insolubles.

En el sistema B (Tabla 4.1) se observan aumentos en el V_r de las suspensiones con excepción de *T. harzianum*, aumentos que se atribuyen principalmente a un aumento considerable (con respecto al sistema blanco) en el volumen de la fase superior (V_t), excepto en *S. cerevisiae*, cuyo aumento en su V_r es por causa de una reducción considerable del volumen inferior (V_b) como en el caso anterior.

El comportamiento contrario de la suspensión de *T. harzianum* se asocia a una migración de la biomasa hacia la fase inferior, lo cual es favorable. Probablemente, debido a que la proporción de PEG en el sistema A es mayor que en el B, los componentes son forzados a emigrar a la fase inferior porque la superior se ha saturado, hecho que puede provocar precipitación en la fase inferior como en la interfase, debido al aumento en la tensión superficial por el contacto de moléculas hidrofóbicas con el agua (Baskir, *et. al.*, 1989).

Ver Figura 4.1.

En todos los casos, un aumento en el V_t puede asociarse a que la proporción de PEG en el sistema B es menor que en el sistema A, lo que implica un aumento del volumen libre de la fase polimérica (Grossman y Gainer, 1988), ocasionando que algunas partículas emigren a la fase superior por el espacio disponible. Esta consecuencia se asocia con el bajo peso molecular del PEG utilizado debido al bajo entrecruzamiento de su estructura molecular, característica que permite aun más el alojamiento de partículas (Huddleston, *et. al.* 1991a).

Tabla 4.1. Efecto de diferentes suspensiones biológicas sobre el Vr de sistemas de dos fases acuosas con baja TLL

Sistema	A	B	C	D	E
PEG1450 (%)	24.0	22.0	15.0	8.4	5.0
PO ₄ (%)	6.0	7.2	11.4	15.0	17.5
Vr Blanco	8.3	2.9	1	0.4	0.2
Vr <i>T. harzianum</i>	7.9	2.7	1.1	0.4	0.2
% cambio	-4.82%	-6.90%	10.00%	0.00%	0.00%
Preferencia sólidos	I	B	B	T/B	I
Vr <i>E. coli</i>	4.9	4.4	1.1	0.4	0.2
% cambio	-40.96%	51.72%	10.00%	0.00%	0.00%
Preferencia sólidos	I	I	I	I/B	I/B
Vr <i>S. cerevisiae</i>	26.4	5.9	1.2	0.4	0.2
% cambio	218.07%	103.45%	20.00%	0.00%	0.00%
Preferencia sólidos	B	B	B	B	B

Todos los sistemas se encuentran a lo largo de una TLL (31.88%), cercana a la curva binodal (ver **Figura 3.1**). El porcentaje de cambio se estimó como $\% \text{cambio} = (\text{Vr suspensión} - \text{Vr blanco}) * 100 / \text{Vr blanco}$. Un %cambio positivo indica el aumento que hubo en el Vr del sistema con la suspensión biológica, y uno negativo indica una reducción.

La desviación de los valores obtenidos de las relaciones de volumen de las suspensiones biológicas con respecto a los sistemas blanco (sin presencia de suspensión biológica) representa una medida del efecto que sobre la formación de fases tiene la presencia de suspensiones biológicas. En la **Figura 4.2** se presentan las variaciones entre los Vr de las suspensiones biológicas (A-E) y los sistemas de referencia.

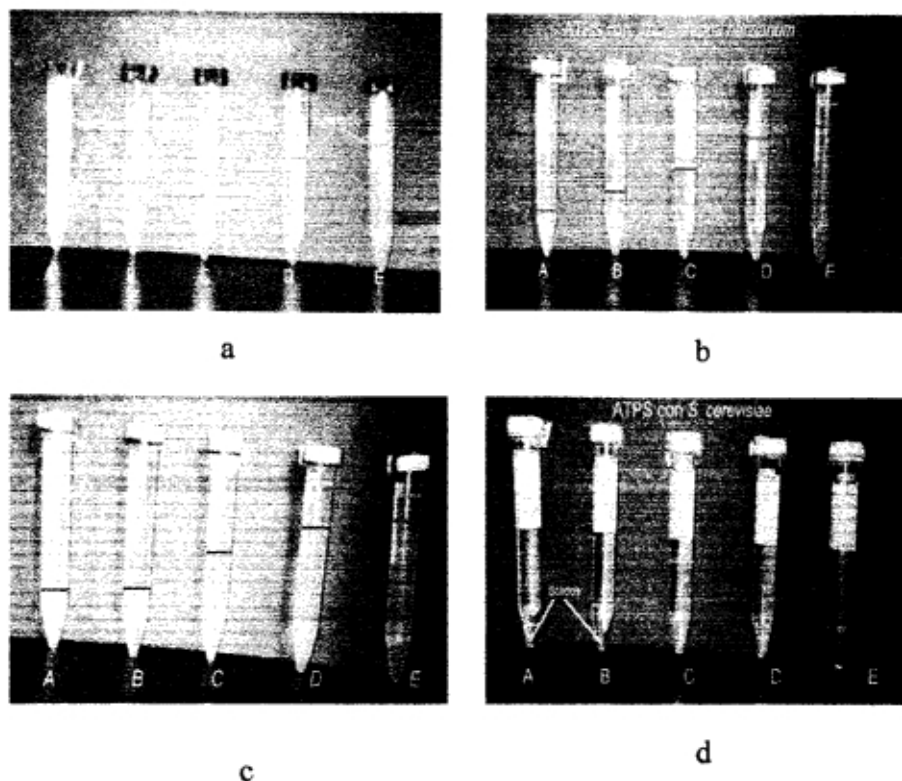


Figura 4.1. Efecto de suspensiones biológicas sobre la relación de volúmenes (V_r) de los sistemas de dos fases acuosas A-E (TLL= 31.88%).

a) Sistemas de dos fases de referencia, b) Sistemas con suspensión de *T. harizianum*, c) Sistemas con suspensión de *E. coli*, d) Sistemas con suspensión de *S. cerevisiae*.

Se ha reportado que la proporción de la biomasa tiene un efecto significativo sobre el V_r de sistemas de dos fases acuosas (Köhler, *et. al.*, 1989). En los sistemas C, D y E no hay un cambio significativo sobre el V_r , lo que sugiere que a las composiciones de PEG y fosfato de estos sistemas no hay un efecto significativo de la biomasa sobre este parámetro (Hustedt, *et. al.*, 1989). En estos sistemas hay una reducción de volumen libre debido al incremento en la concentración de fosfato (Tabla 3.1), pero quizá este comportamiento puede asociarse a un aumento en la tensión superficial, lo que se traduce

en una cantidad abundante de biopartículas en la interfase y en el fondo, con el consecuente efecto sobre el volumen de las fases y sobre el V_r (Baskir, *et. al.*, 1989).

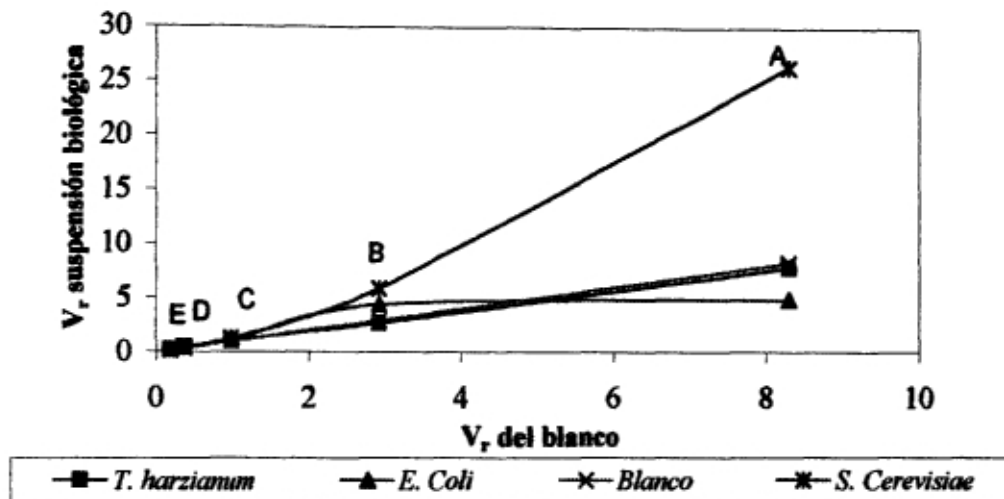


Figura 4.2 Comparación del V_r del blanco vs. V_r de la muestra biológica en los sistemas de dos fases acuosas A-E.
 Si los puntos correspondientes al valor del V_r de la suspensión biológica están por arriba de los puntos correspondientes al valor del V_r del blanco, se considera que el V_r ha incrementado con respecto a éste, y viceversa.

4.1.2 Sistemas de dos fases acuosas localizados sobre una TLL intermedia a la curva binodal: sistemas F-J.

Este conjunto de sistemas (F-J) está sobre una línea de unión (TLL) (40.22%) que está más alejada de la curva binodal, hecho que confiere más estabilidad a los sistemas de dos fases acuosas que estén sobre ésta. Los sistemas sobre esta TLL tienen una concentración mayor de PEG y fosfato con respecto al conjunto de sistemas anteriores (A-E) que estaban cerca de la curva binodal, por lo que el volumen libre de las fases se ve

reducido al estar ocupado por los componentes del sistema, dejando menos espacio para la biomasa, y esto obliga a las proteínas a emigrar a la fase superior (Grossman y Gainer, 1988).

Se observa un aumento en el V_r de todos los sistemas con todas las suspensiones biológicas, siendo más notorio el efecto de *T. harzianum* y *E. coli* en los sistemas F y G (Tabla 4.2). Sobre el V_r de estos mismos sistemas se observa un efecto moderado de *S. cerevisiae*. Estos efectos pueden atribuirse a que, el hecho de tener una mayor concentración de PEG, y con una consecuente reducción en el volumen libre de la fase superior, el tamaño molecular de algunos componentes presentes en las suspensiones les es posible emigrar a la fase polimérica, incluso pudiéndose acomodar en intersticios existentes entre las cadenas de polímero e interactuar con éstas (Hernández, 1997).

En los sistemas de dos fases que contienen suspensión de *S. cerevisiae*, hay biopartículas en la fase inferior, lo que conjuntamente con un aumento en el V_r puede estar indicando una migración de la biomasa y de sólidos insolubles hacia la fase superior, y una concentración de proteína en la fase superior (Huddleston, *et. al.*, 1991a).

En los sistemas que contienen suspensión de *E. coli* hay biopartículas que se concentran en la interfase (Figura 4.3), fenómeno que se puede atribuir a biopartículas presentes en esta suspensión que por su tamaño molecular pueden interactuar con la fase polimérica (Hernández, 1997 y Baskir, *et. al.*, 1989), induciendo un aumento en tensión superficial, lo que causa su precipitación en la interfase.

Tabla 4.2. Efecto de diferentes suspensiones biológicas sobre el Vr de sistemas de dos fases acuosas con TLL a distancia intermedia de la curva binodal.

Sistema	F	G	H	I	J
PEG1450 (%)	24.0	21.0	17.5	12.0	9.4
PO ₄ (%)	8.5	10.6	13.0	16.9	18.7
Vr Blanco	2.3	1.4	1.0	0.5	0.4
Vr <i>T. harzianum</i>	3.4	1.6	1.2	0.6	0.4
% cambio	47.83%	14.29%	20.00%	20.00%	0.00%
Preferencia sólidos	T/B	T/B	T/B	T/B	T/B
Vr <i>E. coli</i>	3.3	1.9	1.2	0.6	0.4
% cambio	43.48%	35.71%	20.00%	20.00%	0.00%
Preferencia sólidos	I	I	I	I	I
Vr <i>S. cerevisiae</i>	2.9	1.7	1.2	0.6	0.4
% cambio	26.09%	21.43%	20.00%	20.00%	0.00%
Preferencia sólidos	B	B	B	B	B

Todos los sistemas se encuentran a lo largo de una TLL (31.88%), cercana a la curva binodal (ver **Figura 3.1**). El porcentaje de cambio se estimó como $\% \text{cambio} = (\text{Vr suspensión} - \text{Vr blanco}) * 100 / \text{Vr blanco}$. Un %cambio positivo indica el aumento que hubo en el Vr del sistema con la suspensión biológica, y uno negativo indica una reducción.

Los sistemas de dos fases que contienen suspensión de *T. harzianum* tiene partículas distribuidas tanto en la fase superior como en la inferior (**Figura 4.3**), hecho que sugiere que sus componentes poseen afinidad por esta fase y por otro lado, también pudiese contener componentes afines a la solución de fosfato (Johansson, *et. al.*, 1998).

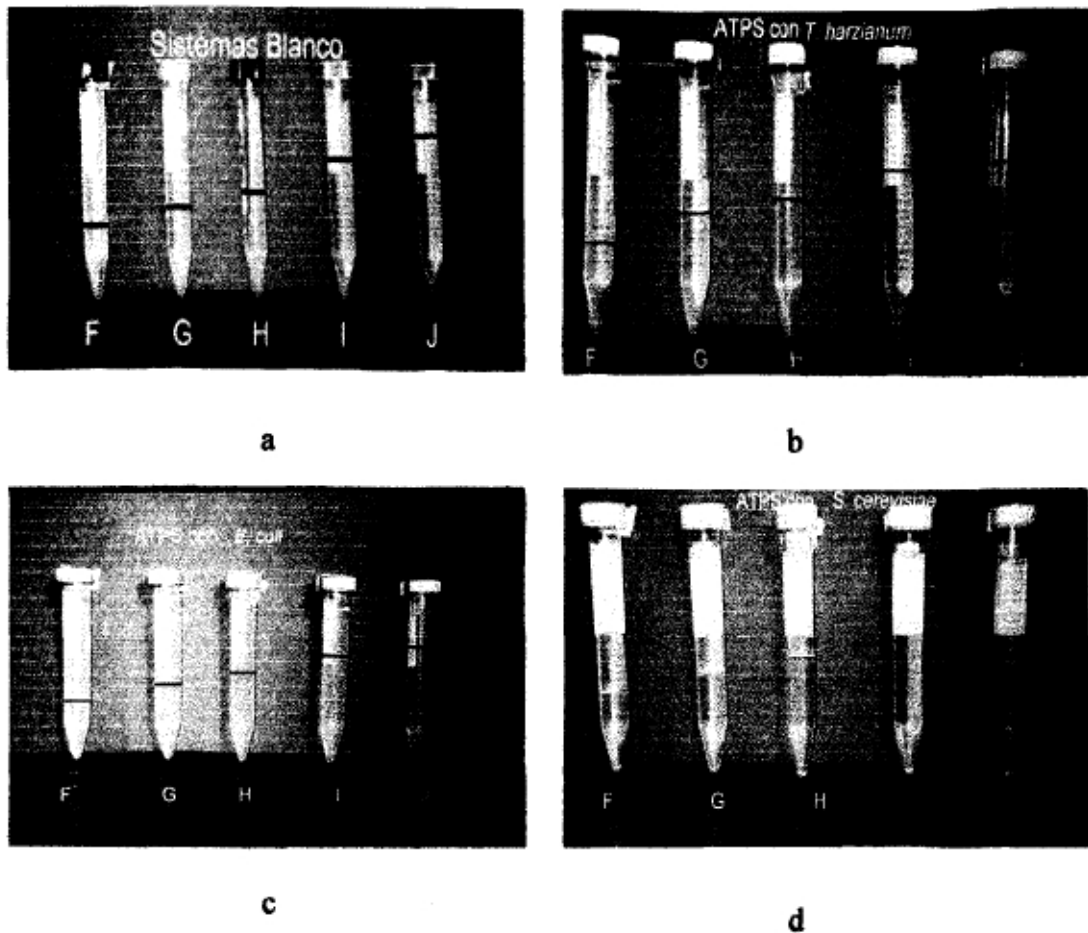


Figura 4.3 Efecto de suspensiones biológicas sobre la relación de volúmenes (V_r) de los sistemas de dos fases acuosas F-J (TLL= 40.22%)

a) Sistemas de dos fases de referencia, b) Sistemas con suspensión de *T. harizianum*, c) Sistemas con suspensión de *E. coli*, d) Sistemas con suspensión de *S. cerevisiae*.

La desviación de los valores obtenidos de las relaciones de volumen de las suspensiones biológicas con respecto a los sistemas blanco (sin presencia de suspensión biológica) representa una medida del efecto que sobre la formación de fases tiene la presencia de suspensiones biológicas. En la **Figura 4.4** se presentan las variaciones entre los V_r de las muestras biológicas (F-J) y los sistemas de referencia.

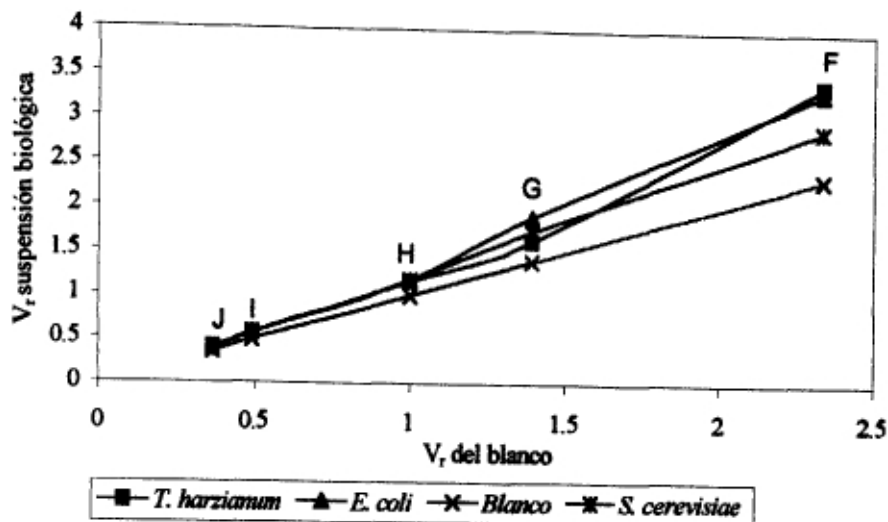


Figura 4.4 Comparación del V_r del blanco vs. V_r de la muestra biológica en los sistemas de dos fases acuosas F-J.

Si los puntos correspondientes al valor del V_r de la suspensión biológica están por arriba de los puntos correspondientes al valor del V_r del blanco, se considera que el V_r ha incrementado con respecto a éste, y viceversa.

Las suspensiones biológicas muestran efectos particulares sobre el V_r de cada uno de estos sistemas, comportamiento que se puede asociar con las propiedades de estabilidad de estos sistemas, tomando en cuenta que se encuentran sobre una TLL de distancia intermedia de la curva binodal, por lo que su estabilidad puede fluctuar con los diferentes tipos de suspensiones biológicas.

En los sistemas H, I y J, no se observa un efecto significativo de las suspensiones biológicas sobre el V_r de los sistemas, comportamiento que es similar a los sistemas C, D y E. Cabe mencionar que los sistemas de referencia (blanco) tienen un V_r de 1.0 o menor a 1. Dado que el mayor efecto por suspensiones biológicas deben darse en sistemas con

V_r de 1.0 o menor (Rito-Palomares y Lyddiatt, 1996), se puede sugerir que la concentración de biomasa no es suficiente como para causarlo (Figura 4.3). Cabe mencionar que la localización de los sólidos es diferente en cada suspensión (Tabla 4.2).

4.1.3 Efecto de las suspensiones biológicas sobre la relación de volúmenes (V_r) en sistemas de dos fases acuosas localizados sobre una TLL lejana a la curva binodal: sistemas K-O.

Debido que a mayor longitud de línea de corte (TLL) se adquiere más estabilidad en los sistemas de dos fases se escogieron sistemas a lo largo de una TLL lejana a la curva binodal, para evaluar cambios en los efectos sobre el V_r de los sistemas de referencia con los efectos causados por suspensiones biológicas y compararlos con los mismos cambios en los sistemas sobre una TLL, intermedia y cercana a la curva binodal.

Los sistemas K,L y M con suspensiones de *E. coli*, *T. harzianum*, y *S. cerevisiae* presentan efectos importantes de incremento del V_r con respecto a los sistemas de referencia (hasta 68% de cambio en V_r , ver Tabla 4.3). Esto indica que la preferencia por la fase polimérica se debe a que las proteínas tienen afinidad con el PEG (Figura 4.5).

Tabla 4.3. Efecto de diferentes suspensiones biológicas sobre el Vr de sistemas de dos fases acuosas con TLL lejana a la curva binodal.

Sistema	K	L	M	N	O
PEG1450 (%)	33.0	27.4	23.0	12.0	6.4
PO ₄ (%)	10.0	14.4	18.0	26.5	31.0
Vr Blanco	2.5	1.4	1.0	0.4	0.2
Vr <i>T. harzianum</i>	3.2	1.7	1.3	0.4	0.2
% cambio	28.00%	21.43%	30.00%	0.00%	0.00%
Preferencia sólidos	T/B	T/B	T/B	T/B	T/B
Vr <i>E. coli</i>	4.2	2.1	1.2	0.5	0.2
% cambio	68.00%	50.00%	20.00%	25.00%	0.00%
Preferencia sólidos	I/T	I	T	T	B
Vr <i>S. cerevisiae</i>	3.0	1.6	1.1	0.4	0.2
% cambio	20.00%	14.29%	10.00%	0.00%	0.00%
Preferencia sólidos	B	B	B	B	B

Todos los sistemas se encuentran a lo largo de una TLL (57.54%), cercana a la curva binodal (ver **Figura 3.1**). El porcentaje de cambio se estimó como $\% \text{cambio} = (\text{Vr suspensión} - \text{Vr blanco}) * 100 / \text{Vr blanco}$. Un %cambio positivo indica el aumento que hubo en el Vr del sistema con la suspensión biológica, y uno negativo indica una reducción.

La desviación de los valores obtenidos de las relaciones de volumen de las suspensiones biológicas con respecto a los sistemas blanco (sin presencia de suspensión biológica) representa una medida del efecto que sobre la formación de fases tiene la presencia de suspensiones biológicas. En la **Figura 4.6** se presentan las variaciones entre los Vr de las muestras biológicas (K-O) y los sistemas de referencia. El hecho de que los puntos se muevan hacia arriba implica que el Vr de la suspensión ha aumentado con respecto al Vr de los sistemas de referencia.

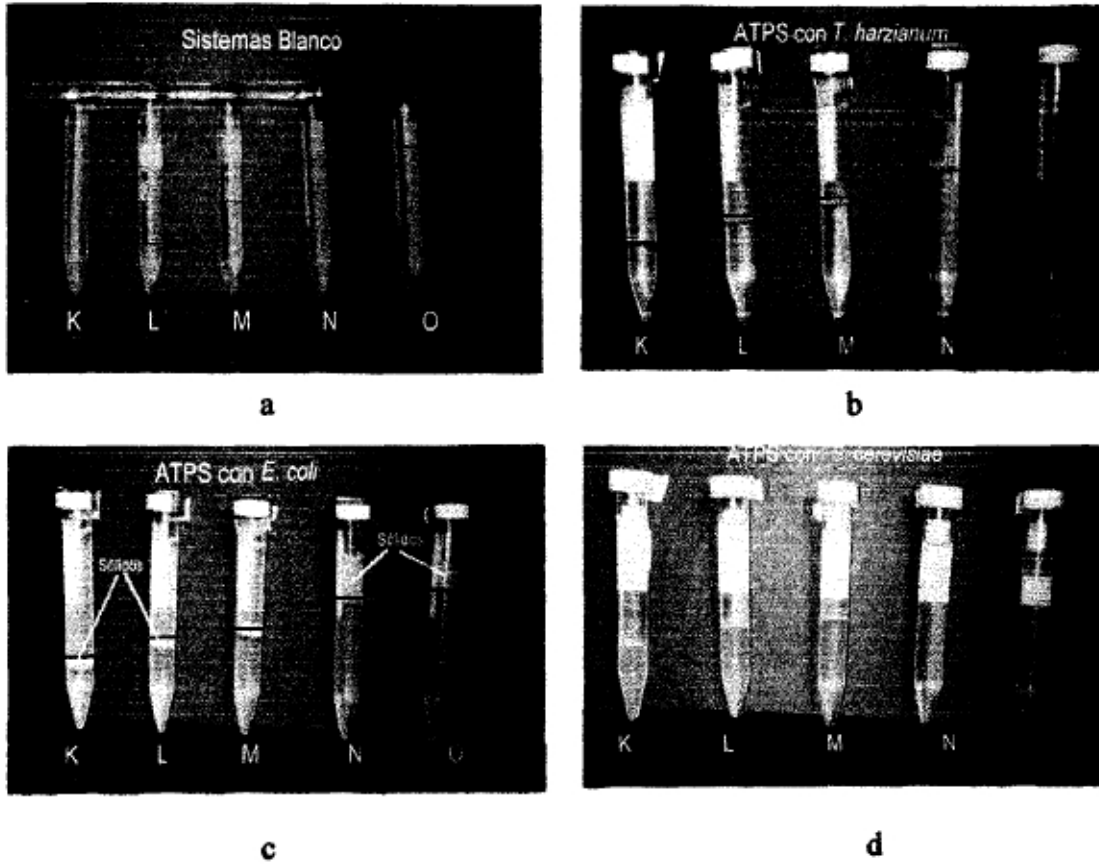


Figura 4.5 Efecto de suspensiones biológicas sobre la relación de volúmenes (V_r) de los sistemas de dos fases acuosas K-O (TLL= 57.54%).
a) Sistemas de dos fases de referencia, b) Sistemas con suspensión de *T. harizianum*, c) Sistemas con suspensión de *E. coli*, d) Sistemas con suspensión de *S. cerevisiae*.

De forma general, se puede observar que en los sistemas blanco con $V_r > 1$ (Tablas 4.1, 4.2 y 4.3), a medida que se incrementa el valor de la longitud de las líneas de unión (TLL) el V_r es menor. Sin embargo, este efecto no se aprecia significativamente en los sistemas blanco con un valor de $V_r < 1$.

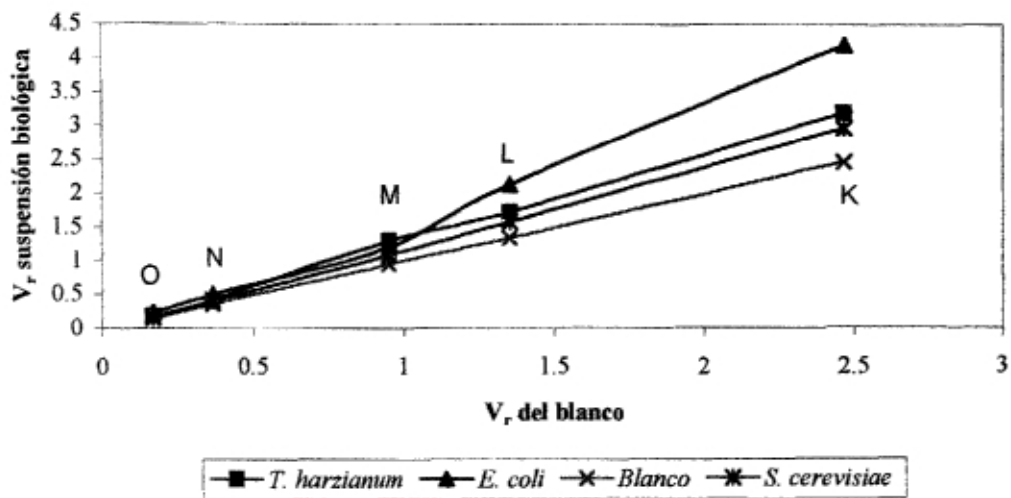


Figura 4.6 Comparación del V_r del blanco vs. V_r de la muestra biológica en los sistemas de dos fases acuosas K-O.

Si los puntos correspondientes al valor del V_r de la suspensión biológica están por arriba de los puntos correspondientes al valor del V_r del blanco, se considera que el V_r ha incrementado con respecto a éste, y viceversa.

Los sistemas con suspensión de *T. harzianum* no siguen este patrón de forma estricta ya que se encuentran variaciones en el V_r entre valores mayores y menores, sin embargo, dichas variaciones no son drásticas y por lo tanto no se consideran significativas. Este comportamiento se le puede atribuir a que el efecto de las interacciones proteína-polímero domina sobre el efecto de peso molecular, siendo éstas lo suficientemente significativas para retener a las proteínas en la fase polimérica, causando un efecto leve en el V_r (Baskir, *et. al.*, 1989).

Los sistemas con suspensiones de *E. coli* y de *S. cerevisiae* muestran un comportamiento similar. Al contrario que en los sistemas blanco, el V_r de los sistemas F-J es mayor que los valores de V_r de los sistemas A-E, pero éstos últimos son iguales a los valores de V_r de los sistemas K-O. Estas variaciones pueden asociarse con la baja estabilidad de los sistemas cerca de la TLL (A-E), ocasionando efectos no esperados, y que por lo tanto no son comparables con los resultados obtenidos en sistemas más estables. Este comportamiento se puede observar en los sistemas que tienen un V_r cercano o menor a 1.0, mientras que en los sistemas formados por estas suspensiones que originalmente tienen un V_r mayor que 1.0, el V_r va disminuyendo a medida que se incrementa la TLL. De estas observaciones se puede decir que los sistemas con V_r original cercano o menor a 1.0 son sensibles a efectos moleculares de los componentes del sistema (Rito-Palomares y Lyddiatt, 1996).

4.2 Efecto de las suspensiones de *T. harzianum*, *E. coli*, y *S. cerevisiae* sobre la posición de la curva binodal

Se ha reportado que la biomasa en los sistemas de dos fases acuosas tiene un efecto de desplazamiento de la curva binodal hacia abajo, que significa que las concentraciones de PEG y fosfato disminuyen como consecuencia de una contribución de los componentes de la suspensión biológica a la formación de las fases (Köhler, *et. al.*, 1989). La medida del desplazamiento de la curva binodal en el diagrama de fases representa un parámetro que indica la influencia de la biomasa en los sistemas de dos fases acuosas.

Las suspensiones biológicas mostraron un efecto similar sobre la posición de la curva binodal en el diagrama de fases. El efecto observado fue un desplazamiento de la curva binodal hacia abajo en el diagrama de fases (**Tabla 4.4**).

Los sistemas 15 (0.70% PEG, 26.33% PO₄) que contenían las suspensiones de *T. harzianum*, *E. coli* y *S. cerevisiae* resultaron ser bifásicos, contrario a lo esperado. El sistema original 15 fue monofásico (**Tabla 3.2**) por estar por debajo de la curva binodal, al igual que los sistemas 11 al 14. Sin embargo, la biomasa ejerce un efecto de contribución importante sobre el sistema 15 (altas concentraciones de fosfato). Estos resultados suponen que las suspensiones biológicas recorren la curva binodal hacia abajo, como consecuencia de la participación de la biomasa presente en el sistema en la formación de fases (Köhler, *et. al.*, 1989). Se debe tomar en cuenta que la proporción de PEG es muy pequeña (<1%) comparada con la del fosfato, lo que puede estar indicando que los componentes están ayudando a la fase polimérica a formarse porque en la ausencia de biomasa el sistema es monofásico (**Tabla 4.4**). La contribución de las suspensiones a formar dos fases sugiere que las suspensiones son afines a la fase polimérica, por lo que tratan de alojarse en ella y formar la fase. Resultados similares arrojaron los experimentos realizados con los sistemas I-IV (**Tabla 3.3**) con todas las suspensiones biológicas.

La suspensión de *T. harzianum* tiene un efecto drástico, observando que la curva binodal tiende a irse a regiones de menor concentración de PEG1450 (**Figura 4.7**), este efecto se es más notorio en los sistemas III y IV, lo que concuerda con la susceptibilidad de los

sistemas con V_r cercano o menor a 1.0 a los efectos de las suspensiones biológicas (Rito-Palomares y Lyddiatt, 1996).

Tabla 4.4 Efecto de las suspensiones biológicas en la posición de la curva binodal en los sistemas de dos fases acuosas 1-15.

Sistema	No. de Fases				%PEG	%PO ₄
	Blanco	<i>T. harzianum</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>		
1	B	B	B	B	35.66	2.77
2	B	B	B	B	11.33	12.00
3	B	B	B	B	8.00	13.00
4	B	B	B	B	5.00	14.20
5	B	B	B	B	3.20	28.33
6	B	B	B	B	38.66	5.77
7	B	B	B	B	14.33	15.00
8	B	B	B	B	11.00	16.00
9	B	B	B	B	8.00	17.20
10	B	B	B	B	6.20	31.33
11	M	M	M	M	33.16	0.77
12	M	M	M	M	8.83	10.00
13	M	M	M	M	5.50	11.00
14	M	M	M	M	2.50	12.20
15	M	B	B	B	0.70	26.33

M = Sistema monofásico
 B = Sistema bifásico

Cabe mencionar que en los sistemas III y IV la concentración de fosfato aumenta y la de PEG disminuye en comparación a los sistemas I y II. Este hecho puede explicar el impacto de la biomasa en la posición de la curva binodal, desde el punto de vista de saturación de la fase polimérica y la emigración de componentes hacia la fase inferior, ayudando de esta manera a formar las fases (Köhler, *et. al.*, 1989 y Hernández, 1997). En

este caso, la biomasa si es capaz de impactar en mayor grado a los sistemas, resultado favorable desde el punto de vista económico (Hustedt, *et. al.*, 1989).

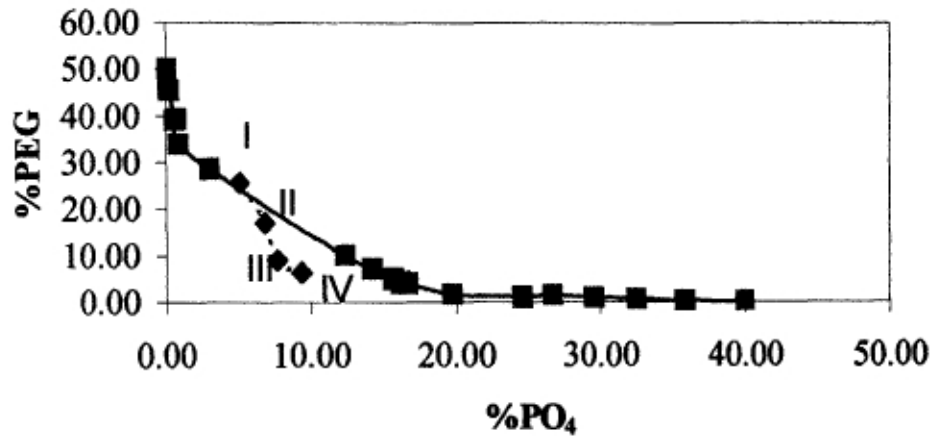


Figura 4.7 Efecto de la suspensión de *T. harzianum* en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases.

Los puntos en azul indican las concentraciones finales de PEG y fosfato. Si la concentración de PEG correspondiente al sistema formado con suspensión biológica es mayor a la de la curva binodal, indica que ésta ha sido desplazada hacia arriba y viceversa.

La suspensión de *E. coli* no tiene un impacto significativo en el desplazamiento de la curva binodal (Figura 4.8). Recordando que se había propuesto la existencia de biopartículas de pequeño tamaño molecular en esta suspensión, probablemente su interacción con una de las fases (más probablemente la polimérica) es más fuerte que su distribución en el sistema. De esta forma no llega a impactar a la posición de la curva binodal.

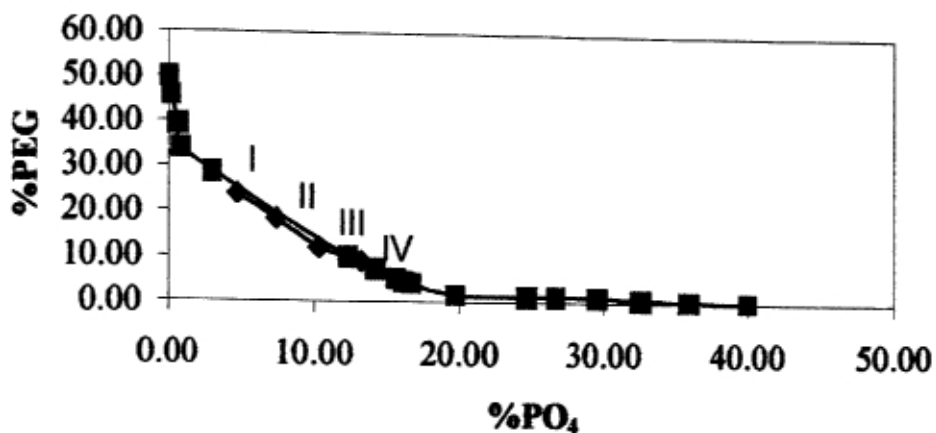


Figura 4.8 Efecto de la suspensión de *E. coli* en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases.

Los puntos en azul indican las concentraciones finales de PEG y fosfato. Si la concentración de PEG correspondiente al sistema formado con suspensión biológica es mayor a la de la curva binodal, indica que ésta ha sido desplazada hacia arriba y viceversa.

La suspensión de *S. cerevisiae* tiene un efecto poco importante sobre la posición de la curva binodal en los sistemas I-IV. La contribución de *S. cerevisiae* a la formación de fases es similar a la del blanco (Figura 4.9). El efecto en este caso es, por ende, no significativo.

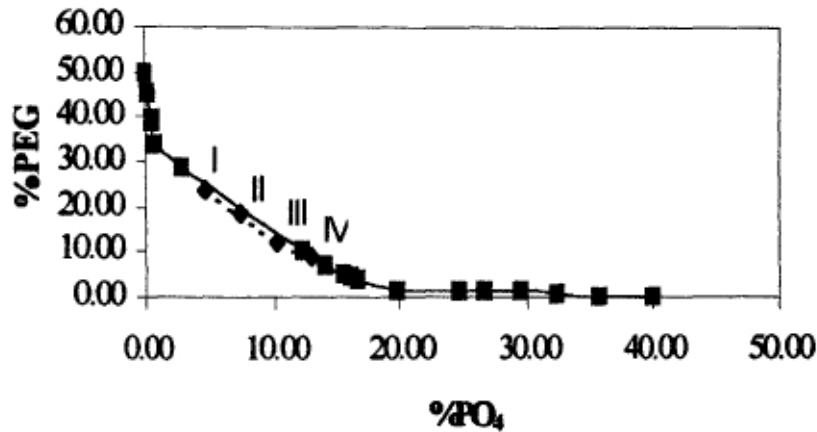


Figura 4.9 Efecto de la suspensión de *S. cerevisiae* en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases.

Los puntos en azul indican las concentraciones finales de PEG y fosfato. Si la concentración de PEG correspondiente al sistema formado con suspensión biológica es mayor a la de la curva binodal, indica que ésta ha sido desplazada hacia arriba y viceversa.

Comparando los resultados obtenidos con las tres suspensiones, podemos concluir que el desplazamiento significativo de la posición de la curva binodal en el diagrama de fases es por efecto de la suspensión de *T. harzianum*, particularmente en los sistemas III y IV. El comportamiento de las suspensiones de *E. coli* y *S. cerevisiae* es muy similar, pero con el efecto contrario a la suspensión de *T. harzianum*, ya que en las primeras dos la mayor variación en las composiciones de PEG y fosfato se da en los sistemas I y II, lo que puede sugerir la influencia del debris celular sobre los sistemas con $V_r > 1$, ya que sus componentes pueden ser afines a la fase polimérica.

Las diferencias entre estos resultados lo podemos atribuir a la naturaleza molecular de las suspensiones. Se puede asociar este comportamiento considerando que las proteínas de *T. harzianum* son extracelulares (Vázquez-Garcidueñas, *et. al.*, 1998) por lo que no se necesitó el proceso de lisis celular, mientras que en las otras dos suspensiones sí, ya que sus proteínas son intracelulares (Brock y Madigan, 1994).

4.3 Suero de leche: Caso particular de estudio del efecto de suspensiones biológicas sobre la relación de volúmenes en sistemas de dos fases acuosos.

La suspensión de suero de leche se eligió como un caso particular para evaluar sus efectos en la posición de la curva binodal, por la relativa facilidad de su manejo para poder separar sus componentes, específicamente los sólidos.

Tabla 4.5. Efecto de la suspensión de suero de leche sobre el Vr de sistemas de dos fases acuosas con TLL cercana a la curva binodal.

Sistema	A	B	C	D	E
PEG1450 (%)	24.0	22.0	15.0	8.4	5.0
PO ₄ (%)	6.0	7.2	11.4	15.0	17.5
Vr Blanco	8.3	2.9	1	0.4	0.2
Vr suero de leche	6.7	4.3	1.1	0.4	0.2
% cambio	-19.28%	48.28%	10.00%	0.00%	0.00%
Preferencia sólidos	B/I	B/I	B/I	B/I	I

Todos los sistemas se encuentran a lo largo de una TLL (31.88%), cercana a la curva binodal (ver **Figura 3.1**). El porcentaje de cambio se estimó como %cambio= (Vr suspensión-Vr blanco)*100/Vr blanco. Un %cambio positivo indica el aumento que hubo en el Vr del sistema con la suspensión biológica, y uno negativo indica una reducción.

En el sistema A se observa una reducción del V_r (Tabla 4.5), la cuál puede atribuirse a la influencia de la biomasa en el sistema y a considerar que el resto de los componentes emigraron hacia la fase inferior, con el consecuente incremento en su volumen, condición favorable puesto que la proteína tiende a concentrarse en la fase polimérica (Huddleston, *et. al.*, 1991a). Sin embargo, en el resto de los sistemas, el V_r aumenta (Figura 4.10). Puesto que la concentración de fosfato va aumentando el volumen libre se reduce, así como la tensión superficial se reduce porque hay una concentración menor de PEG, se ocasiona que los componentes puedan estar forzados a emigrar hacia la fase superior, condición que no sería favorable al considerar que las operaciones de concentración del producto y de purificación se dificultarían por la presencia de contaminantes. Sin embargo, a medida que la fase inferior va creciendo ($V_r < 1$), el efecto de la suspensión sobre el sistema de dos fases es menor. En la Figura 4.10 se aprecian de forma visual los cambios en el V_r por efectos de la suspensión de suero de leche.

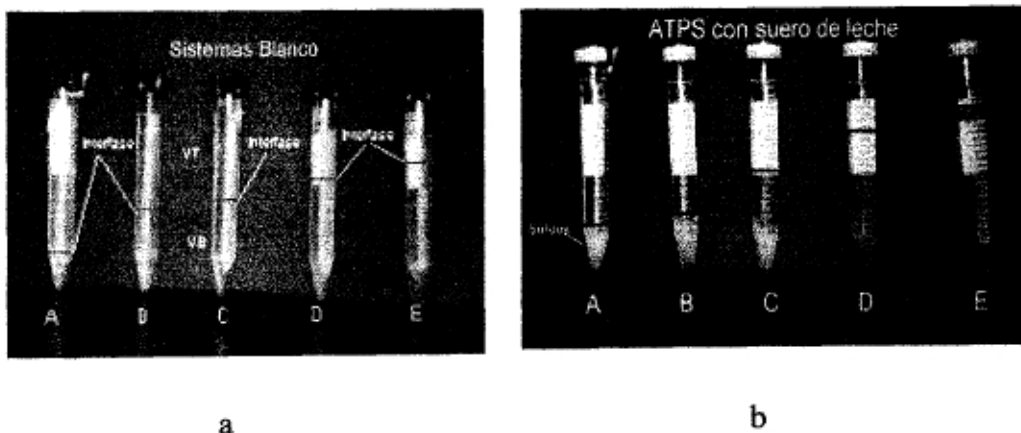


Figura 4.10 Efecto de la suspensión de suero de leche sobre la relación de volúmenes (V_r) de los sistemas de dos fases acuosas A-E (TLL= 31.88%).
a) Sistemas de dos fases de referencia, b) Sistemas con suspensión de suero de leche.

En la **Figura 4.11** se presentan las variaciones entre los V_r de sistemas con suero de leche (A-E) y los sistemas de referencia. Considerar que el efecto contrario de los sistemas A y B puede atribuirse a una mayor tensión superficial en sistema A al haber más PEG, condición que puede ocasionar que los componentes afines a la fase polimérica no emigren hacia ésta.

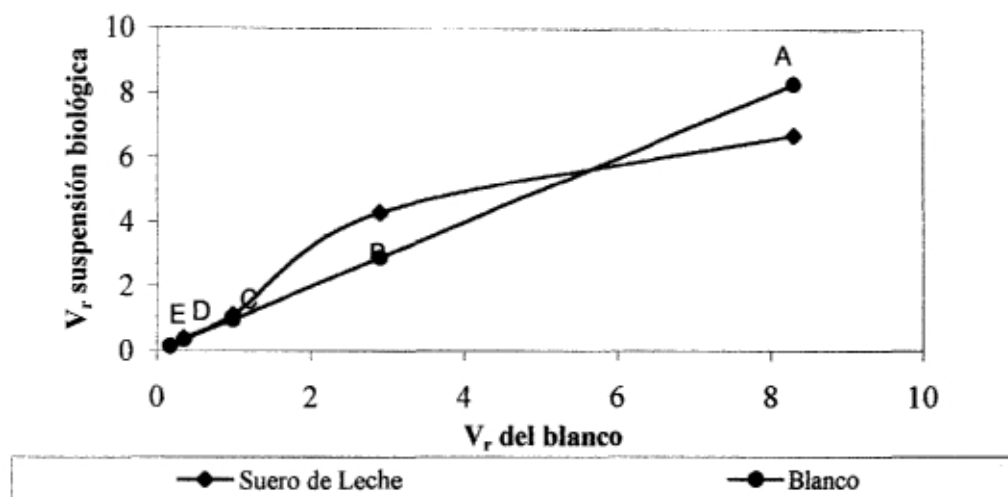


Figura 4.11 Comparación del V_r del blanco vs. V_r de la suspensión biológica de suero de leche en los sistemas de dos fases acuosas A-E.

Si los puntos correspondientes al valor del V_r de la suspensión biológica están por arriba de los puntos correspondientes al valor del V_r del blanco, se considera que el V_r ha incrementado con respecto a éste, y viceversa.

En los sistemas F-J, hay biopartículas en la fase inferior y la interfase (**Tabla 4.6**), como en los sistemas A-E, por lo que su efecto sobre el V_r de estos sistemas puede explicarse con los mismos argumentos que en los sistemas anteriores, además de que se observa el mismo patrón de comportamiento anteriormente observado.

Tabla 4.6 Efecto de la suspensión de suero de leche sobre el Vr de sistemas de dos fases acuosas con TLL intermedia a la curva binodal.

Sistema	F	G	H	I	J
PEG1450 (%)	24.0	21.0	17.5	12.0	9.4
PO ₄ (%)	8.5	10.6	13.0	16.9	18.7
Vr Blanco	2.3	1.4	1.0	0.5	0.4
Vr suero de leche	2.9	1.6	1.0	0.5	0.4
% cambio	26.09%	14.29%	0.00%	0.00%	0.00%
Preferencia sólidos	B	B/I	B/I	B/I	B/I

Todos los sistemas se encuentran a lo largo de una TLL (40.22%), cercana a la curva binodal (ver **Figura 3.1**). El porcentaje de cambio se estimó como $\% \text{cambio} = (\text{Vr suspensión} - \text{Vr blanco}) * 100 / \text{Vr blanco}$. Un $\% \text{cambio}$ positivo indica el aumento que hubo en el Vr del sistema con la suspensión biológica, y uno negativo indica una reducción.

En la **Figura 4.12** se aprecian de forma visual los cambios en el Vr por efectos de la suspensión de suero de leche.

En la **Figura 4.13** se presentan las variaciones entre los Vr de sistemas con suero de leche (F-J) y los sistemas de referencia. En los sistemas de referencia que tienen $\text{Vr} > 1$ el cambio es considerable, donde se registran incrementos en el Vr de los sistemas por efecto de la suspensión, mientras que el resto de los sistemas está casi en la misma posición de la curva binodal, por lo que se considera un efecto poco considerable.

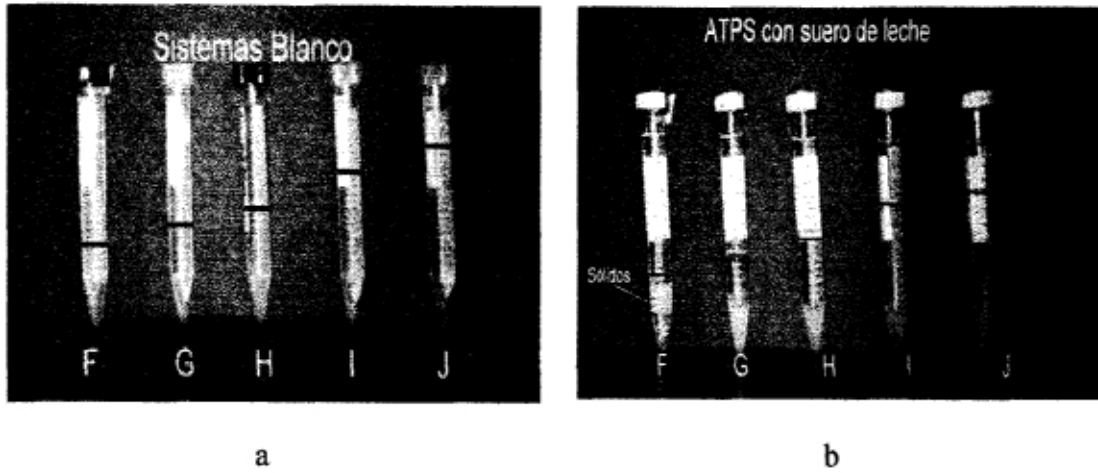


Figura 4.12 Efecto de la suspensión de suero de leche sobre la relación de volúmenes (V_r) de los sistemas de dos fases acuosas F-J (TLL= 40.22%).
 a) Sistemas de dos fases de referencia, b) Sistemas con suspensión de suero de leche.

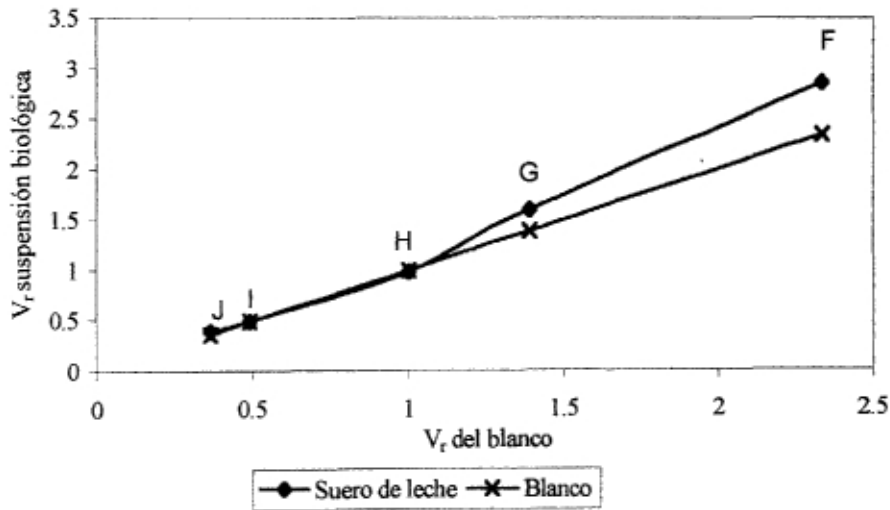


Figura 4.13 Comparación del V_r del blanco vs. V_r de la suspensión de suero de leche en los sistemas de dos fases acuosas F-J. Si los puntos correspondientes al valor del V_r de la suspensión biológica están por arriba de los puntos correspondientes al valor del V_r del blanco, se considera que el V_r ha incrementado con respecto a éste, y viceversa.

Los sistemas K-O son los que están sobre una línea de unión alejada a la curva binodal, por lo que se pueden considerar los sistemas más estables. Aquí se observan efectos contrarios a los casos anteriores, ya que el mayor efecto debido a la suspensión de suero de leche se observa en los sistemas con un $V_r < 1$, al registrarse una reducción importante con respecto al V_r original (Tabla 4.7).

Tabla 4.7 Efecto de la suspensión de suero de leche sobre el V_r de sistemas de dos fases acuosas con TLL lejana a la curva binodal

Sistema	K	L	M	N	O
PEG1450 (%)	33.0	27.4	23.0	12.0	6.4
PO ₄ (%)	10.0	14.4	18.0	26.5	31.0
V_r Blanco	2.5	1.4	1.0	0.4	0.2
V_r suero de leche	2.5	1.5	1.0	0.3	0.1
% cambio	0.00%	7.14%	0.00%	-25.00%	-50.00%
Preferencia sólidos	I	I/B	I/B	I/B	I/B

Todos los sistemas se encuentran a lo largo de una TLL (57.54%), cercana a la curva binodal (ver Figura 3.1). El porcentaje de cambio se estimó como $\% \text{cambio} = (V_r \text{ suspensión} - V_r \text{ blanco}) * 100 / V_r \text{ blanco}$. Un %cambio positivo indica el aumento que hubo en el V_r del sistema con la suspensión biológica, y uno negativo indica una reducción.

Este hecho puede estar indicando que la presencia de la suspensión en el sistema está ayudando a formar las fases, además de que los componentes que no son proteínas están emigrando hacia la fase inferior, con la consecuente reducción de V_r . En la Figura 4.14 se aprecian de forma visual estos resultados.

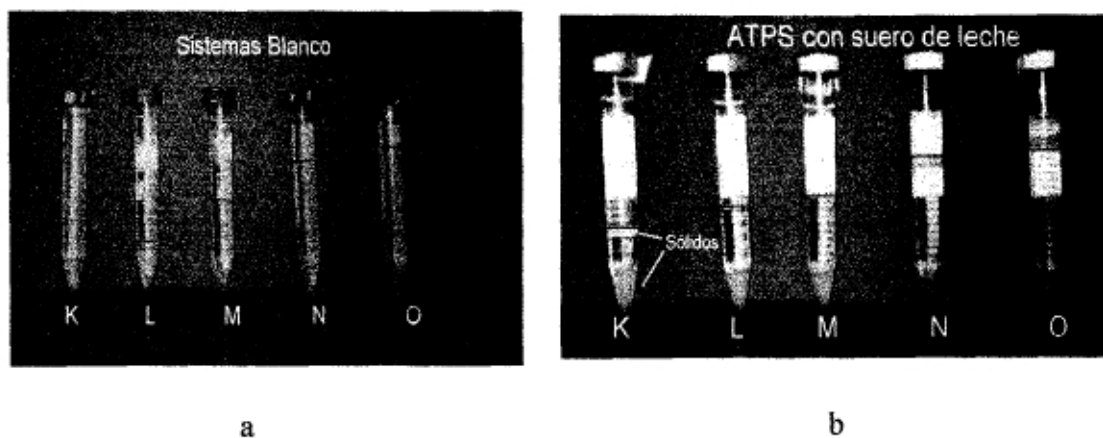


Figura 4.14 Efecto de la suspensión de suero de leche sobre la relación de volúmenes (V_r) de los sistemas de dos fases acuosas K-O (TLL= 57.54%).

a) Sistemas de dos fases de referencia, b) Sistemas con suspensión de suero de leche.

El V_r en los sistemas con suspensión de suero de leche que son menores que el V_r de los sistemas de referencia, sugieren una contribución de la biomasa a la formación de fases (Köhler, *et. al.*, 1989) así como un efecto observable en los sistemas con V_r menor que 1.0 (Rito-Palomares y Lyddiatt, 1996). En las suspensiones hay sólidos en la interfase, hecho evidente al considerar una interacción de éstos con el polímero. En la **Figura 4.15** se presentan las variaciones entre los V_r de la suspensión de suero de leche entre los sistemas K-O y los sistemas de referencia.

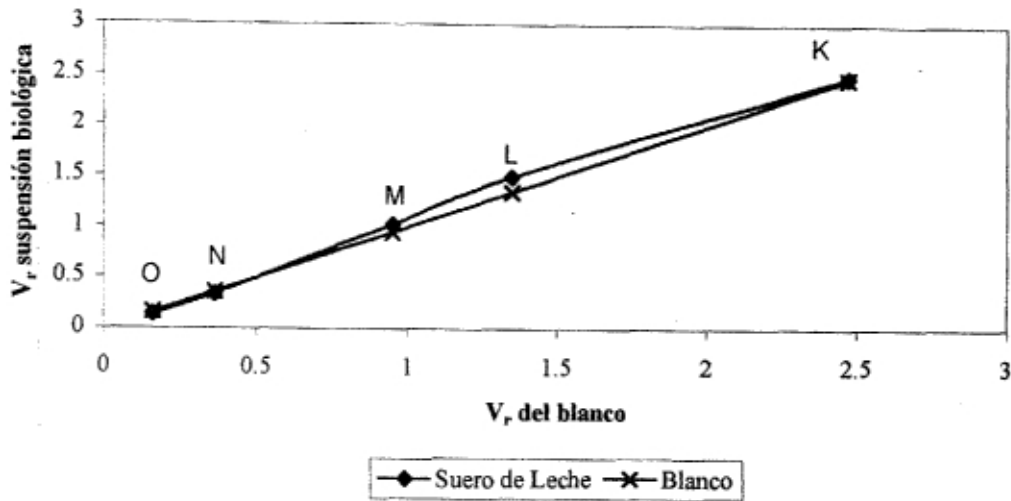


Figura 4.15 Comparación del V_r del blanco vs. V_r de la suspensión de suero de leche en los sistemas de dos fases acuosas K-O.

Si los puntos correspondientes al valor del V_r de la suspensión biológica están por arriba de los puntos correspondientes al valor del V_r del blanco, se considera que el V_r ha incrementado con respecto a éste, y viceversa.

4.4 Suero de leche: Caso particular de estudio del efecto de suspensiones biológicas en la formación de sistemas acuosos.

Se ha reportado que los sólidos insolubles del suero de leche desplazan la posición de la curva binodal como consecuencia de su interacción con la fase polimérica, donde se sugiere que éstos se “solubilizan” en dicha fase (Hernández, 1997).

En el sistema 15 (Tabla 4.8), la suspensión de suero de leche se comporta de forma semejante que la suspensión de *T. harzianum* (Sección 4.2), de lo que se puede concluir que ésta también desplaza la posición de la curva binodal hacia abajo en el diagrama de fases, como ya se comentó anteriormente, teniendo el mayor efecto en los sistemas I y II

(Figura 4.16). Esta suspensión tampoco se trató con choque térmico, puesto que las proteínas están en la suspensión.

Tabla 4.8 Efecto de la suspensión de suero de leche en la posición de la curva binodal en los sistemas de dos fases acuosas 1-15

Sistema	No. de Fases		%PEG	%PO ₄
	Blanco	Suero de leche		
1	B	B	35.66	2.77
2	B	B	11.33	12.00
3	B	B	8.00	13.00
4	B	B	5.00	14.20
5	B	B	3.20	28.33
6	B	B	38.66	5.77
7	B	B	14.33	15.00
8	B	B	11.00	16.00
9	B	B	8.00	17.20
10	B	B	6.20	31.33
11	M	M	33.16	0.77
12	M	M	8.83	10.00
13	M	M	5.50	11.00
14	M	M	2.50	12.20
15	M	B	0.70	26.33

M = Sistema monofásico

B = Sistema bifásico

Igualmente, cuando se construyeron los sistemas I-IV con la suspensión de suero de leche (Tabla 3.3), se observó que ésta desplaza a la curva binodal hacia abajo por efecto de la biomasa presente en el sistema, aunque en el sistema IV este comportamiento no es tan notorio, estando casi sobre la curva binodal original (Figura 4.16). El desplazamiento de ésta hacia abajo es muy ligero.

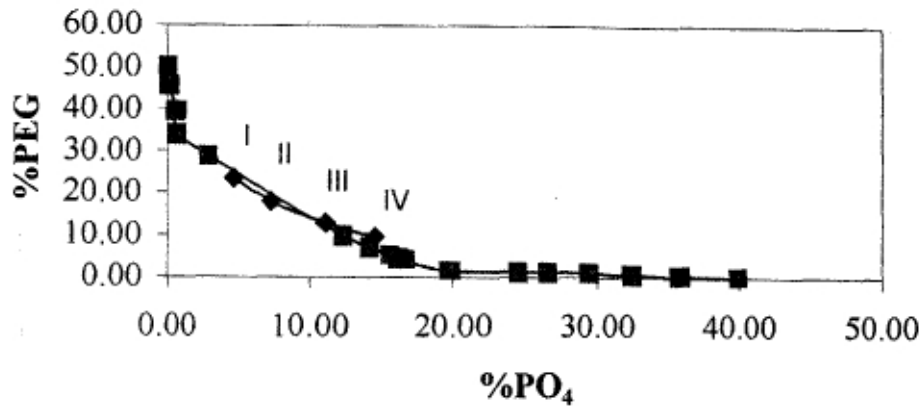


Figura 4.16 Efecto de la suspensión de suero de leche en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases.

Los puntos en azul indican las concentraciones finales de PEG y fosfato. Si la concentración de PEG correspondiente al sistema formado con suspensión biológica es mayor a la de la curva binodal, indica que ésta ha sido desplazada hacia arriba y viceversa.

En esta suspensión, los resultados son análogos a los sistemas blanco, por lo que se puede decir que la estructura y el peso molecular del polímero dominan la distribución de los componentes de las fases, particularmente en los sistemas III y IV, (Hustedt, *et. al.*, 1989)

4.4.1 Influencia de los sólidos del suero de leche sobre la posición de la curva binodal en el diagrama de fases

En la **Figura 4.17**, se puede apreciar que la curva del suero de leche sin sólidos está recorrido más abajo que la curva de los sólidos en solución salina, y la curva de suero con sólidos está en medio de las dos anteriores. Esto entonces, sugiere que por efecto de los sólidos, el desplazamiento neto de la curva binodal en el diagrama de fases es hacia

arriba. Este resultado sugiere una interacción de estos sólidos con la fase polimérica, pero no como componente que ayuda a la formación de un sistema bifásico, sino como uno que desplaza la curva binodal hacia concentraciones mayores de PEG y fosfato. Este comportamiento podría explicarse entonces, como una interacción de los sólidos con el PEG tal como sugiere Hernández (1997), proponiendo que éstos se disolviesen en el PEG.

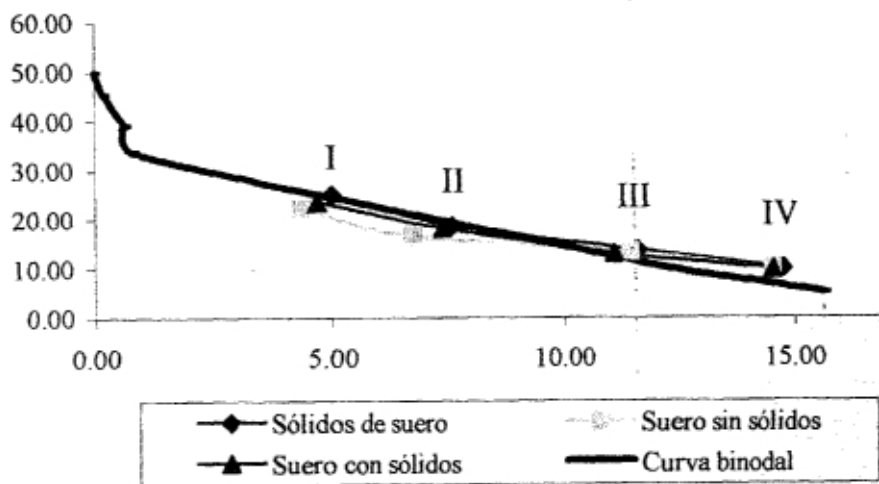


Figura 4.17 Efecto de la suspensión de sólidos del suero de leche y del suero de leche sin sólidos en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases.

Los sólidos del suero de leche son responsables de un desplazamiento de la curva binodal hacia arriba, como lo indica la curva en verde, mientras que el suero sin sólidos, representado por la curva en rosa, desplaza la curva binodal hacia abajo. Como consecuencia, el suero de leche con sólidos (curva en morado) tiene valores intermedios.

La posición de la curva binodal con suspensión biológica sin sólidos presenta desplazamiento hacia abajo en el diagrama de fases, siendo más significativo en los sistemas I y II, mientras que para los sistemas III y IV es casi imperceptible, indicando

que a esas composiciones de PEG y fosfato la influencia es insignificante. Cabe mencionar que los sistemas I y II tienen una concentración mayor de PEG que los sistemas III y IV, hecho que puede relacionarse con las interacciones sólido-PEG ya mencionadas, siendo éstas menores en los sistemas III y IV por efectos de reducción de volumen libre.

Capítulo 5. Conclusiones

Se evaluó el impacto de cuatro suspensiones biológicas en sistemas de dos fases acuosas localizados sobre diferentes líneas de corte (TLL) situadas a distancias cercana, intermedia y lejana de la curva binodal en el diagrama de fases, midiendo sus efectos en dos parámetros de los sistemas: el cambio en la relación de volúmenes de las fases (V_r) y el desplazamiento de la posición de la curva binodal en el diagrama de fases. La experimentación se llevó a cabo bajo condiciones constantes de pH, temperatura y cantidad de biomasa agregada a los sistemas.

En los estudios del efecto de las suspensiones biológicas sobre el V_r de los sistemas estudiados, éstas muestran efectos particulares sobre el V_r de los sistemas que originalmente tienen un $V_r > 1$, comportamiento que se puede asociar a diferentes factores: la composición PEG-fosfato de los sistemas de dos fases, la hidrofobicidad de los componentes de la biomasa, la afinidad de los componentes por una de las fases y las propiedades de estabilidad de estos sistemas en función de la TLL sobre la cuál están. Sin embargo, los efectos de las suspensiones biológicas sobre el V_r de aquellos sistemas que originalmente (sistemas de referencia) tienen un $V_r < 1$ son similares.

En los sistemas de mayor estabilidad, se observan cambios similares en el V_r con todas las suspensiones biológicas, es decir, que los cambios son independientes a la suspensión presente, situación que representa una ventaja a nivel proceso debido a la posibilidad de

operar en las mismas circunstancias con todas las suspensiones utilizadas. Estos cambios en el V_r concuerdan con resultados que han sido reportados anteriormente, mientras que en los sistemas cercanos a la curva binodal se presentan comportamientos sin un patrón esperado.

La estabilidad de los sistemas no se debe arriesgar a nivel proceso en un intento por minimizar la cantidad de componentes para formar los sistemas. En los sistemas sobre una TLL de distancia intermedia a la curva binodal se presentan efectos muy diversos entre las diferentes suspensiones, a diferencia de aquéllos que están sobre una TLL lejana a la curva binodal, donde los resultados presentan más uniformidad. De aquí se concluye que los sistemas sobre la TLL a distancia intermedia de la curva binodal son más susceptibles a inestabilizarse dependiendo de la suspensión presente.

En los estudios del efecto de las suspensiones biológicas en la posición de la curva binodal en el diagrama de fases, se concluye que las suspensiones desplazan la curva hacia menores concentraciones de PEG y fosfato, indicando que la biomasa contribuye a la formación de los sistemas bifásicos. Desde el punto de vista de proceso, estas condiciones son favorables puesto que la demanda de componentes del sistema es menor, siempre y cuando se asegure la estabilidad de los sistemas que se van a utilizar.

En el caso simplificado de estudio que fue el suero de leche, se concluye que los sólidos insolubles tienden a desplazar a la curva binodal hacia mayores concentraciones de componentes del sistema bifásico, condiciones desfavorables para el proceso. Este efecto

se puede atribuir a la marcada afinidad de los sólidos por la fase polimérica, en la que anteriormente se ha sugerido que éstos se “disuelven” en ésta.

La recuperación de proteínas de suspensiones biológicas utilizando sistemas de dos fases acuosas puede ser una técnica que puede aplicarse convenientemente a nivel proceso aprovechando la similitud en el comportamiento de las diferentes suspensiones biológicas bajo ciertas condiciones de los sistemas de dos fases (V_r de los sistemas de referencia es menor a 1), implicando que las mismas condiciones de operación pueden aplicarse a los diferentes tipos de suspensiones, siendo que en caso de observar un comportamiento particular de cada suspensión en los sistemas de dos fases resultaría costoso adecuar las condiciones de proceso para cada tipo de suspensión que se utilice.

No obstante que el desarrollo de esta metodología ha sido empírica hasta la fecha por la dificultad en la comprensión de los mecanismos que gobiernan la partición, se pueden establecer condiciones de operación controlando parámetros importantes como el pH, la temperatura y la estabilidad de los sistemas.

Bibliografía

- Albertsson, P.A. "Partition of Cell Particles and Macromolecules". 3rd. Edition. Wiley, New York. (1986).
- Asenjo, J.A. "Separation Processes in Biotechnology". 1990. Marcel Dekker, Inc. New York: 801 p.
- Baskir, J.N., Hatton, T.A. and Suter, U.W. 1989. "Thermodynamics of the Partitioning of Biomaterials in Two-Phase Aqueous Polymer Systems: Comparison of Lattice Model to Experimental Data". *J. Phys. Chem.* 93:2111-2122.
- Belter, P.A., Cussler, E.L., and Hu, W.S. 1988. "Bioseparations : downstream processing for biotechnology". Wiley, New York: 368p.
- Brock, T.D. "Biología de los microorganismos". Ediciones Omega, S.A. Barcelona. (1976).
- Brock, T.D. and Madigan, M.T. "Microbiología". Sexta Edición. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. México, D.F. (1994).
- Cabezas, H. 1996. "Theory of phase formation in aqueous two-phase systems". *J. of Chromatography B.* 680:3-30.
- Chen, J.P. y Lee, M.S. 1995. "Enhanced Production of *Serratia marcescens* chitinase in PEG-Dextran Aqueous Two-Phase Systems". *Enzyme and Microbial Technology.* 17(11):1021-1027.
- Cliffe, K. 1996. En "Biotecnología para Ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos" (Scragg, A.) 1a. Edición. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México, D.F.
- Diamond, A.D. y Hsu, J.T. 1990. "Protein Partitioning in PEG/Dextran Aqueous Two-Phase Systems. *AIChE Journal.* 36(7). 1017-1024.
- Grossman, P.D. y Gainer, J.L. 1988. "Correlation of Aqueous Two-Phase Partitioning of Proteins with Changes in Free Volume". *Biotechnology Progress.* 4(1):6-11.
- Hamad, E.Z., Ijaz, W, Ali, S.A., and Hastaoglu, M.A. 1996. "Influence of Polymer Structure on Protein Partitioning in Two-Phase Aqueous Systems". *Biotechnol. Prog.* 12(2):173-177.
- Harris, E.L. y Angal, S. 1990. "Protein purification applications, a practical approach". Oxford University Press. 179 p.

- Hernández, M.A. 1997. "Suero de Leche: Un Caso de Estudio Sobre la Utilización de Sistemas de Dos Fases Acuosa para la Recuperación de Proteínas de Residuos". (Tesis de Maestría). ITESM.
- Huddleston, J. Veide, A., Köhler, K., Flanagan, J., Enfors S., and Lyddiatt A. 1991a. "The Molecular Basis of Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems". *TIB TECH.* 9(11):381-388.
- Hustedt, H. 1986. *Biotech. Lett.* 8(11) 791-796.
- Hustedt, H., Kroner, K.H. and Kula, M.R. 1989. In *Partitioning in Aqueous Two Phase Systems* (Walter, H., Brooks, D. and Fisher D., eds), pp. 529-587, Academic Press.
- Johansson, H.O., Karlström, G., Tjerneld, F., and Haynes, C.A. 1998. "Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems". *J. of Chromatography B.* 711:3-17.
- Köhler, K., Bonsdorff-Lindeberg, L., y Enfors, S. 1989. "Influence of disrupted biomass on the partitioning of galactosidase fused protein A". *Enzyme and Microbial Technology.* 11(11):730-735.
- Kuboi, R., Umakoshi, H., and Komazawa, I. 1995. "Extractive Cultivation of *Escherichia coli* using Poly(ethyleneglycol)/Phosphate Aqueous Two-Phase Systems to Produce Intracellular β -galactosidase". *Biotechnol. Prog.* 11:202-207.
- Lehninger, A.L. 1990. "Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular". Segunda Edición. Ediciones Omega, España. 1117p.
- Negrete, J.A. 1998. "Partición de 6-n-pentil- α -pirona producida por *Trichoderma harzianum* Rifai en sistemas de dos fases acuosa". Tesis de maestría. ITESM.
- Newlander, J.A. y Atherton, H.V. 1964. "The Chemistry and Testing of Dairy Products". Tercera Edición. Olsen Publishing. Milwaukee. 365p.
- Persson, J., Nystrom, L., Ageland, H., and Tjerneld, F. 1998. "Purification of Recombinant Apolipoprotein A-1^{Milano} Expressed in *Escherichia coli* using Aqueous two-Phase Extraction followed by Temperature-induced Phase Separation". *Journal of Chromatography B.* 711:97-109.
- Pires, M.J., Aires-Barros, M.R., y Cabral, J.M. 1996. "Liquid-liquid Extraction of Proteins with Reversed Micelles". *Biotechnol. Prog.* 12(3): 290-301.

- Rito-Palomares, M. y Lyddiatt, A. 1996. "Impact of Cell disruption and polymer recycling upon aqueous two-phase processes for protein recovery". *Journal of Chromatography B*, 680:81-89.
- Sambrook, J. Fritsch, E.F., Maniatis, T. "Molecular cloning : a laboratory manual". 2nd Ed. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory, (1989).
- Schluck, A., Maurer, G., y Kula, M.R.. 1995. "Influence of Electrostatic Interactions on Partitioning in Aqueous Polyethylene Glycol/Dextran Biphasic Systems: Part II". *Biotechnology and Bioengineering*. 47: 252-260.
- Scragg, A. 1996. "Biotecnología para Ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos". 1o Edición. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México, D.F.: 410 p.
- Serrano-Carreón, L., Hathout Y., Bensoussan, M., and Belin, J.M. 1992. "Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* from 18:n fatty acid methyl esthers. *Biotechnol. Lett.* 14(11): 1019-1024.
- Stryer, L. 1995. "Bioquímica". Cuarta Edición. Editorial Reverté. Barcelona, 485 p.
- Umakoshi, H., Yano, K., Kuboi, R. y Komosawa, I. 1996. "Extractive cultivation of Recombinant *E. coli* using ATPS for production and separation of Intracellular Heat Shock Proteins". *Biotechnol. Prog.* 12(1): 51-56.
- Vazquez-Garcidueñas S. Leal-Morales, C. y Herrera-Estrella, A. 1998. "Analysis of the β -1,2-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*". *Applied and environmental microbiology*". 64(4): 1442-1446.
- Walker, S.G. and Lyddiatt, A. 1998. "Aqueous two-phase systems as an alternative process route for the fractionation of small inclusion bodies". *Journal of chromatography B*. 711:185-194.
- Walter, H., Brooks, D.E., and Fisher, D. 1985. "Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. Theory, Methods, Uses, and Applications to Biotechnology". Academic Press. Orlando, 704p.
- Zijlstra, G.M., de Goojier, C.D, van der Pol, L.A., y Tramper, J. 1996. "Design of Aqueous Two-Phase Systems Supporting Animal Cell Growth: a First Step Toward Extractive Bioconversions". *Enzyme and Microbial Technology*. 19(7):2-8