

Separación de proteínas en mezclas biológicas complejas mediante procesos continuos de extracción líquido-líquido

Cabrera, Rosa¹; Stumpo, Rita²; López, Paula³; Ferraro, Graciela³; Cascone, Osvaldo^{1*}; Fernández-Lahore, Héctor M.¹

⁽¹⁾Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología;

⁽²⁾ Cátedra de Inmunología e IDEHU-CONICET;

⁽³⁾ Cátedra de Farmacognosia. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina.

Tel: 54 11 4964 8270; Fax: 54 11 4964 8274; e-mail: mflahore@huemul.fyb.uba.ar

RESUMEN: La cromatografía en contracorriente (CCC) se basa en un procedimiento repetido de extracción líquido-líquido y encuentra usos en la separación de productos naturales. A efectos de una CCC es posible retener la fase líquida estacionaria mediante aplicación de fuerza centrífuga sobre un tubo espiralado (o "columna") que rota sobre su propio eje y simultáneamente sobre el eje del rotor (centrífuga "planetaria"). De esta forma es posible obtener separaciones cromatográficas en ausencia de un soporte sólido. En este trabajo, extendemos la aplicación de la CCC al fraccionamiento de macromoléculas mediante el uso de sistemas de dos fases acuosas (ATPS) durante la CCC.

Utilizando columnas semipreparativas a una velocidad de rotación constante (1000 rpm), hemos obtenido retenciones de alrededor de 35% de la fase superior de un ATPS formado por polietilenglicol 1540 (12,5%) y fosfatos (12,5%). Dicho nivel de retención es estable en el tiempo y corresponde a un valor $\leq 1,8$ para la relación de volúmenes de fases, lo que compara ventajosamente con el de la cromatografía en columna.

La optimización del sistema CCC permitió separar mezclas artificiales de proteínas y su aplicación al fraccionamiento de un suero equino hiperinmune.

Estos resultados abren la posibilidad de realizar separaciones de proteínas mediante CCC/ATPS y el posterior escalado de la metodología propuesta en separadores industriales.

Palabras clave: Purificación, Proteínas, Cromatografía, Contracorriente.

SUMMARY: *Protein separation from biological complex mixtures by continuous liquid-liquid extraction processes.* Cabrera, Rosa⁽¹⁾; Stumpo, Rita⁽²⁾; López, Paula⁽³⁾; Ferraro, Graciela⁽³⁾; Cascone, Osvaldo^{(1)*}; Fernández-Lahore, Héctor M.⁽¹⁾. Counter-current chromatography (CCC) – based on a multiple liquid-liquid extraction principle - is successfully utilised for natural product separation. A purpose-designed "planetary" centrifuge allows retention of a stationary (liquid) phase into the column. In this way, chromatographic separations in the absence of a solid phase are possible. Herein, we are extending the application of counter current chromatography to the separation of complex protein mixtures through the utilisation of aqueous two-phase systems (ATPS).

By using semipreparative columns at 1000 rpm, 35% retention of the top phase of an ATPS composed by polyethyleneglycol 1540 (12.5%) and phosphate buffer (12.5%) was obtained. Such retention level is stable alongside the standard running separation time. Under such experimental conditions, a phase-volume ratio value of $\leq 1,8$ can be calculated, this comparing favourably with that of the column chromatography.

The optimised CCC system allowed the separation of model proteins as well as the fractionation of an hyperimmune horse sera. These results open the possibilities of achieve protein separation with CCC/ATPS and to envision the further process scale up by employing industrial separators.

Key words: Purification, Proteins, Chromatography, Counter-current.

Introducción

La posibilidad de separar entidades biológicas, tales como macromoléculas u organelas, mediante partición líquido-líquido fue reconocida por Albertsson (1). Este autor estudió en detalle las propiedades de sistemas bifásicos formados por dos polímeros (típicamente polietilenglicol -PEG- y dextrano) y agua en alta proporción (>85%), en relación con sus capacidades separativas. Los sistemas de dos fases acuosas (ATPS) permiten la purificación extractiva de bioproductos, bajo condiciones suaves que preservan su actividad biológica. Los ATPS se forman mezclando soluciones concentradas de dos polímeros "incompatibles" o de un polímero y una sal. La partición de proteínas depende de varios factores, incluyendo la composición de los sistemas, las propiedades superficiales de la macromolécula en estudio, y la presencia de ligandos de afinidad. Sin embargo, fueron Kula y col. (2) quienes promovieron el uso de dichos sistemas con fines industriales, introduciendo el concepto de "integración" en procesos *downstream*. De esta forma es posible en una sola operación (extracción líquido-líquido) lograr la clarificación del material crudo, proceder a su fraccionamiento y simultáneamente concentrar el producto. Esta estrategia se aplicó con éxito a un variado número de problemas de separación, tanto a escala de laboratorio (o piloto) como industrial. No obstante, la gran mayoría de las aplicaciones descriptas se basan en un solo paso de extracción termodinámicamente controlado (3, 4).

Un producto puede ser eficientemente separado en un único paso de extracción cuando su comportamiento de partición es bien diferente al de sus contaminantes. Sin embargo, esta estrategia es insuficiente en un gran número de aplicaciones prácticas, debido a que la partición de las especies a considerar es semejante o porque se trata de muestras biológicas complejas. Como alternativa, se propuso incrementar la selectividad de los sistemas extractivos incorporando una fase sólida de afinidad (5, 6). Sin embargo, puede recurrirse también a un procedimiento de extracción múltiple. Existen varias alternativas tecnológicas que soportan físicamente este segundo modo operativo, entre las que podemos mencionar la distribución en contracorriente (CCD) y otros métodos de flujo continuo, incluyendo columnas de compartimentos agitados, la cromatografía de partición líquido-líquido (LLPC), y la cromatografía en contracorriente (CCC).

La CCC se basa en un proceso de partición repetido (semejante al que se verifica en la cromatografía tradicional) pero en ausencia de un soporte sólido. Utilizando instrumental diseñado *ad-hoc* (la centrifuga planetaria) es posible retener una de las fases que constituyen un ATPS dentro de un tubo espiralado por aplicación de fuerza centrífuga (fase líquida estacionaria). Por otra parte, la segunda fase (móvil) fluye en forma continua por irrigación del sistema, generando una serie de pasos extractivos a través de la primera y asegurando la existencia de un número importante de "platos" teóricos. La inexistencia de una matriz sólida minimiza problemas de adsorción inespecífica y reduce los costos asociados a los adsorbentes comerciales. La cromatografía líquido-líquido se aplicó fundamentalmente a la separación de productos naturales a partir de extractos vegetales, utilizando sistemas de solventes orgánicos inmiscibles con el agua (incompatibles con la presencia de biopolímeros), bajo condiciones analíticas y preparativas. Estas aplicaciones se han beneficiado de la alta capacidad que muestran las columnas de CCC en comparación con la cromatografía convencional como, por ejemplo, la cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

Ito (7) ha reseñado los varios diseños posibles y el funcionamiento de diferentes modelos de centrifugas planetarias en función de ciertas aplicaciones particulares. En la actualidad existe consenso en cuanto al uso del llamado rotor epicíclico como sistema de uso general. Este último cubre múltiples necesidades con un mismo sistema disponible comercialmente. El propósito de este trabajo fue evaluar el desempeño de este tipo de centrifuga para CCC en combinación con ATPS y con el objeto de realizar separaciones de proteínas a partir de mezclas complejas.

Materiales y Métodos

Materiales

Las proteínas taumatina (TAU), lisozima (HEWL), y seroalbúmina bovina (BSA), se obtuvieron de Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. El polietilenglicol (PEG 1540) fue provisto por Fluka, Buchs, Suiza. Las sales de fosfato fueron de grado técnico y obtenidas de proveedores locales. Toda otra sal y/o reactivo

químico empleado fue de grado analítico. El plasma equino entero fue provisto por el Instituto Biológico Argentino SAIC (Buenos Aires, Argentina) y presentó actividad antitética; el fibrinógeno presente en el mismo se eliminó por calentamiento a 57°C.

Métodos

Preparación de los sistemas de dos fases acuosas: Los sistemas de dos fases acuosas se construyeron de acuerdo con Albertsson (1), a partir de soluciones concentradas de polímeros (PEG 1540, 80% P/P) y sales (fosfatos, 40% P/P). Para la realización de experimentos de partición se procedió a la mezcla de las soluciones madre, agregando agua destilada c.s.p 10 g. La concentración de proteína total se fijó en 1 g/l. Los tubos cerrados se agitaron por inversión en un sistema mecánico por un lapso de 60 min a 25°C, suficiente para alcanzar el equilibrio. La separación de fases se aceleró mediante una breve centrifugación (1000 g, 5 min). Cuando se prepararon sistemas para ser usados como fases líquidas (estacionaria y móvil) durante la cromatografía se emplearon soluciones de sales concentradas, polímero a granel (escamas) y agua destilada. En este último caso la separación de las fases se realizó por decantación (18 h) a temperatura ambiente en una ampolla de 2 litros de capacidad. La relación de volúmenes de fases (superior e inferior, respectivamente) se fijó estudiando los diagramas de fases publicados (1). El largo de "tie-line" fue de 12-17%.

Cromatografía en contracorriente: Se utilizó un sistema de cromatografía en contracorriente de alta velocidad (CCC-1000, Pharma-Tech, Batimore, MD, USA). La fase móvil se impulsó con una bomba de pistón (300 LC Pump, SSI, State College, PA, USA). Se emplearon tres columnas semipreparativas dispuestas excéntricamente ($b \gg 0,5-0,8$; b se define como la relación entre los radios de rotación y revolución) en el rotor de la centrifuga planetaria (Figura 1). Dichas columnas están constituidas por un tubo espiralado de PTFE (0,5-1,0 m de longitud; diámetro interno 1,6 mm). La muestra se inyectó a través de una válvula de seis vías (LoBar, Merck, Darmstadt, Alemania) equipada con un loop de 2,5 ml de capacidad. A los efectos de conmutar el sentido del flujo de entrada a las columnas unidas en serie (cabeza-cola o cola-cabeza) se utilizó una válvula de cuatro vías (SRV-4, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala,

Suecia). La absorbancia del eluato en 280 nm se monitoreó en forma continua empleando un detector UV (Uvicord II, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). La señal obtenida se recogió mediante un registrador y/o se almacenó en una PC utilizando software desarrollado en nuestro laboratorio (PC Crom).

Retención de la fase estacionaria: Se realizaron experimentos reteniendo alternativamente la fase superior (rica en PEG) o inferior (rica en fosfatos) del sistema bifásico PEG 1540 12,5% y fosfatos 12,5% (pH 7,2). Las columnas se llenaron con la fase a retener sin aplicación de fuerza centrífuga. A continuación se inició el proceso de rotación mediante incrementos discretos de la velocidad de centrifugación hasta alcanzar el valor deseado (400-1200 rpm). Una vez estabilizada la centrifuga se procedió a la introducción de la fase móvil por bombeo al flujo deseado (0,5-4,0 ml/min). La retención real de la fase estacionaria se calculó colectando el eluato del sistema cromatográfico en una probeta graduada desde el momento del inicio de la irrigación con la fase móvil: la cantidad de fase retenida se obtuvo restando al volumen total de las columnas el volumen de fase estacionaria desplazado en equilibrio. Éste normalmente se alcanzó una vez que el sistema se irrigó con al menos un volumen de columna.

Separación de proteínas: Las mezclas de proteínas (a una concentración total de 1-2 g/l) se fraccionaron empleando la fase superior (rica en PEG) como estacionaria a una tasa de retención del 25-35%. Se aplicó la fase móvil (rica en fosfatos) en sentido cola-cabeza, a un flujo de 0,5-0,8 ml/min. Se colectaron fracciones a los efectos de determinar proteínas totales (Bradford Protein Assay, BioRad, Hercules, CA, USA) y fraccionadas (SDS-PAGE Phast System, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia).

Resultados y Discusión

Incremento de la resolución en CCC

La principal diferencia entre CCC y un sistema cromatográfico convencional es la gran diferencia existente en el cociente V_m/V_s , es decir la relación de volúmenes de la fase móvil y de la fase estacionaria.

Efectivamente el módulo V_m/V_s reconoce en la CCC valores en el rango de 0,5 a 2,0 siendo su valor en HPLC del orden de 13-20. Este cociente posee un impacto directo sobre la resolución (R_s) en cromatografía de acuerdo con:

$$R_s = \left(\frac{1}{4} \right) (\alpha - 1) N^{1/2} [K_1 / K_2 + (V_m / V_s)]$$

donde α es el factor de separación, N es el número de platos teóricos, K_1 es el coeficiente de partición, y V_s y V_m son los volúmenes ocupados por las fases estacionaria y móvil, respectivamente. Esta predicción teórica se verifica experimentalmente, tal como puede observarse a partir de los datos provistos por Shibusawa (8) (Figura 2).

De esta forma, y asumiendo un conjunto de factores de separación y coeficiente de partición semejantes, la resolución de la CCC será mucho mayor que la propia de la cromatografía sólido-líquido para un número dado de platos teóricos. Por lo tanto, N no resultará un factor crítico a los efectos de lograr separaciones en CCC.

Parámetros operacionales y retención de fase estacionaria

Sobre la base de nuestra experiencia (6) y la de otros autores (8) en el fraccionamiento extractivo de mezclas proteicas complejas, se decidió utilizar un sistema formado por PEG 1540 (12,5%) y fosfatos (12,5%, pH 7) a los efectos de evaluar la tasa de retención de fase estacionaria en CCC. Esta particular elección del sistema bifásico obedece a la buena solubilidad de muchas proteínas en el mismo, lo que elimina una limitante en el uso de la CCC. Debe recordarse que la cromatografía líquido-líquido se caracteriza por una buena capacidad y ausencia de fenómenos de sobrecarga, de manera que la solubilidad de la muestra debe ser maximizada en aplicaciones preparativas.

La Figura 3 muestra la correlación obtenida entre la resolución y la retención de fase estacionaria en un rotor de tipo horizontal para determinadas proteínas modelo. Estos resultados sugieren que la retención de la fase estacionaria posee un efecto directo sobre la resolución alcanzada, tal como lo predice la teoría cromatográfica. En una primera etapa de optimización de nuestro sistema de CCC se decidió maximizar la retención de fase estacionaria

a través de los siguientes parámetros operacionales: a) velocidad de rotación, b) flujo volumétrico, y c) dirección de circulación de la fase móvil. Estos experimentos se realizaron siguiendo el criterio de punto final según la "primera gota"; esto es, se calculó la retención de fase estacionaria considerando el volumen retenido al aparecer la primera gota de fase móvil a la salida del sistema. El volumen de fase móvil requerido para alcanzar una tasa constante de retención fue objeto de una posterior optimización. Resultados preliminares nos permitieron constatar que el criterio de "primera gota" predice tendencias que se verificarán en el punto de equilibrio.

En términos generales, pudo observarse una respuesta del sistema caracterizada por un máximo de retención a 1000 rpm (curvas de distribución de fases, Figura 3). Por otra parte se verificó una menor tasa de retención para la fase inferior (rica en fosfatos) que para la superior (rica en PEG). En el primer caso, la alimentación del sistema en sentido cola-cabeza provocó una retención nula de la fase definida como estacionaria. La mayor retención de fase líquida superior se obtuvo al bombear la fase móvil (fosfatos) en sentido cola-cabeza. En este caso, trabajando a un flujo de 0,5 ml/min, se observó un incremento de la tasa de retención desde un 21% hasta un 49% cuando la rotación se incrementó desde 400 rpm a 1000 rpm; velocidades de giro algo más elevadas produjeron una moderada caída en el volumen de fase retenida (39% a 1200 rpm). El comportamiento observado concuerda con la hidrodinámica propia de la centrifuga planetaria sincrónica (7): las fases inmiscibles dentro del tubo espiralado bajo rotación se ubican -en el equilibrio hidrodinámico- separadamente a ambos extremos del tubo cerrado; la fase superior ocupará la sección de la cabeza y viceversa creándose una interfase a mitad del tubo. De esta forma si, por ejemplo, la columna se llena primero con fase superior y luego se introduce la fase inferior en dirección cabeza-cola se obtendrá una buena retención de fase estacionaria (modo normal). Alternativamente, invirtiendo tanto la fase retenida como la dirección del flujo pueden obtenerse también buenos resultados (modo reverso). Sobre la base de estos resultados se decidió fijar la velocidad de giro de la centrifuga en el valor de 970 ± 30 rpm y adoptar el modo normal de elución (es decir, la fase superior rica en PEG como fase estacionaria). Otros autores han sugerido igual modo de trabajo, aunque empleando modelos diferentes de rotor (9, 10). Por otra parte

los valores de retención obtenidos concuerdan con los publicados para sistemas de naturaleza polar como n-butanol/ ácido acético/ agua o sec-butanol/ agua, para valores comparables del parámetro b (0,5-0,75) en rotores de tipo J (7).

El tiempo de separación de las fases no demostró tener influencia sobre la retención en el sistema CCC al usar diversas composiciones globales de los sistemas bifásicos formados por PEG 1540 y fosfatos dentro del rango de largo de *tie-line* estudiados (12-17%).

Una segunda variable de gran impacto sobre la capacidad retentiva del rotor es el flujo de alimentación del sistema. En la Figura 4 se muestran las tasas de retención medidas empleando la fase superior como fase estacionaria, a una velocidad de giro de 1000 rpm. Puede observarse que el incremento del flujo provoca una caída en el nivel de fase estacionaria que permanece en el sistema. Este efecto es más pronunciado cuando la alimentación se produce en sentido cabeza-cola. En este último caso un incremento del flujo desde 0,5 ml/min hasta 4,0 ml/min provoca una disminución de 3,5 veces en la tasa de retención. En el caso de la alimentación con fase móvil en sentido cola-cabeza se observa una zona de declive suave en los niveles de retención de manera que es posible operar entre 0,5 ml/min y 2,0 ml/min con retenciones del orden de 49%-39%. Sobre la base de estos resultados se optó por una solución de compromiso entre tiempo de cromatografía y retención de fase estacionaria, fijando el flujo en un valor de 0,8 ml/min para conseguir una buena resolución cromatográfica en tiempos de corrida razonablemente breves.

Un factor que debe también considerarse en la optimización de la tasa de retención en el sistema CCC es el punto en el que se alcanza el equilibrio hidrostático. En términos prácticos esto significa encontrar el tiempo (a flujo constante) o bien el volumen de fase móvil requerido para alcanzar un valor constante de fase estacionaria retenida. Bajo estas condiciones es posible hablar de tasa de retención efectiva, es decir constante durante todo el proceso cromatográfico. La Figura 5 muestra la evolución del nivel de fase superior retenida en función del volumen de eluyente. Puede apreciarse que se alcanza una tasa efectiva (constante) de retención una vez que el equivalente a un volumen de columna ha pasado a través del sistema. Se observa además que este punto de equilibrio no varía en función del flujo

de trabajo. Puede concluirse también que una tasa de retención de 35% es factible con el equipamiento propuesto siempre que el flujo sea $\leq 0,8$ ml/min. Estas condiciones fueron por lo tanto escogidas a los efectos de intentar separaciones de proteínas.

Separación de proteínas modelo y fraccionamiento de mezclas biológicas complejas

Las condiciones de operación optimizadas para la retención de fase estacionaria permitieron la separación de proteínas modelo. La Figura 6 muestra la separación de mezclas artificiales de proteínas cuando el sistema se cargó con 5 mg de proteína. Se utilizó la centrífuga planetaria a una velocidad de giro de 1000 rpm. El sistema se irrigó con la fase inferior rica en fosfatos (fase móvil) a razón de 0,4 volúmenes de columna por hora en sentido cola-cabeza. Puede observarse que existe una razonable separación entre las proteínas modelo empleadas que correlaciona con sus correspondientes valores de coeficiente de partición. Éste se define como el cociente entre las concentraciones de una especie en las fases inferior y superior, respectivamente ($K = C_i/C_s$). Los coeficientes de partición se determinaron experimentalmente en tubos de hemólisis usando sistemas de 2 g de peso total y sus valores fueron: $K_{SAB} > 12$; $K_{HEWL} 1,2$; $K_{TAU} 0,58$. Los cromatogramas muestran una resolución comparable con la publicada por otros autores. Se observa también una muy marcada dispersión en el pico correspondiente a la TAU a pesar de ubicarse su K en el rango teórico de mayor performance resolutive ($0,5 \leq K \leq 2$). Este resultado puede explicarse considerando una importante contribución de la limitación de transferencia de masa entre las fases para solutos de alto peso molecular y considerando que la CCC es un sistema que opera fuera del equilibrio (11, 12).

Los resultados observados durante la separación de proteínas modelo se extendieron al fraccionamiento de mezclas biológicas complejas. Con esta finalidad, se procedió a la separación de los componentes proteicos presentes en un plasma equino hiperinmune. Este tipo de plasma se emplea habitualmente como material de partida en la preparación de sueros para la vacunación pasiva. La Figura 7 muestra la concentración total de proteína (medida en base a su extinción en 280 nm) luego de la introducción de la muestra en el sistema CCC. Puede apreciarse que una gran proporción del material so-

luble sembrado eluye en la fase móvil entre 0,7 y 1,2 volúmenes de columna. No se observó ningún comportamiento anómalo del sistema cromatográfico frente a la muestra compleja ni fenómenos de precipitación durante el desarrollo del proceso cromatográfico. Con el objeto de conocer qué proteínas específicas se encontraban presentes a diferentes tiempos (o volúmenes) de elución se procedió a la colección de fracciones y a su posterior análisis mediante SDS-PAGE. Esto permitió observar un cierto patrón de separación para los componentes mayoritarios del plasma. Mientras que la albúmina y la transferrina tendieron a diferenciarse en su comportamiento cromatográfico, la IgG se encontró presente en todas las fracciones analizadas. Este hecho no parece obedecer a una exagerada dispersión del pico correspondiente a una proteína homogénea (por ejemplo, IgG₁) sino al fraccionamiento de una población heterogénea de moléculas de la misma especie. En este sentido, Hansson (1989) ha descrito el comportamiento diferencial de las inmunoglobulinas en la cromatografía de partición líquido-líquido en función de la especificidad de las mismas (13). Este hecho señala una capacidad única de fraccionamiento de los sistemas de dos fases acuosas que podría ser aplicado a la preparación de sueros hiperinmunes con efectos secundarios reducidos.

Conclusiones

Se demostró la factibilidad técnica de realizar separaciones de proteínas mediante procesos extractivos múltiples que emplean sistemas de dos fases acuosas. En particular se estudió un sistema preparativo basado en la centrifuga planetaria que permitió una buena retención de la fase superior de un sistema PEG 1540 y fosfatos.

Bajo condiciones experimentales optimizadas fue posible separar mezclas artificiales de proteínas modelo. Además, se ensayó el fraccionamiento de

un plasma equino hiperinmune a los efectos de obtener fracciones inmunoreactivas. En ambos casos se observó una buena solubilidad de las especies separadas así como una separación relacionada con las propiedades únicas de partición en sistemas acuosos bifásicos.

Dado que la cromatografía en contracorriente opera fuera del equilibrio, a diferencia de lo que ocurre en la tradicional distribución en contracorriente (CCD), existe una notable influencia del tamaño molecular sobre la transferencia del producto entre las fases acuosas. Este fenómeno merece un estudio detallado en el futuro que permita minimizar la dispersión de los picos obtenidos y por tanto mejorar la resolución de pares, particularmente a mayores tiempos de retención, a través de un mecanismo retención de fase estacionaria independiente.

Trabajos en curso en nuestro laboratorio están demostrando la posibilidad de emplear el sistema CCC en modo frontal, de manera semejante a lo habitual para la cromatografía preparativa en lecho empacado o fluidizado (14). Estos estudios crean el marco apropiado para el escalado de este tipo de operaciones adoptando extractores centrifugos de uso industrial.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por la Fundación Antorchas, Buenos Aires, Argentina.

HMFL agradece el apoyo brindado por el Ministerio Alemán para la Cooperación Técnica y el Desarrollo (BMZ), Berlín, Alemania.

GF, HMFL y OC son miembros de la Carrera del Investigador Científico y Tecnológico (CONICET), Buenos Aires, Argentina.

Este trabajo se presentó en parte bajo la forma de póster en la XXXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB) que se desarrolló del 30 de octubre al 3 de noviembre de 2000 en Viña del Mar, Chile.

Figura 1: Diseño del rotor y la columna (formada a partir de la tubuladura espiralada) en una centrifuga planetaria de tipo J.

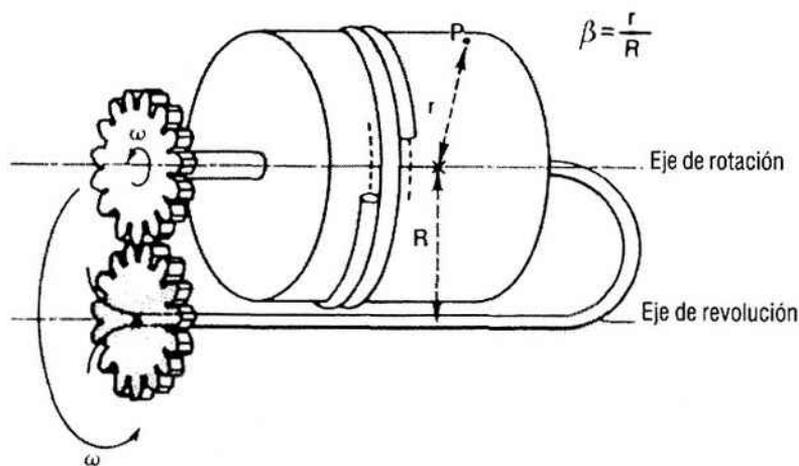


Figura 2: Correlación experimental entre resolución y retención de fase estacionaria en CCC para los pares (-) citocromo / mioglobina y (o) mioglobina / ovoalbúmina. Las proteínas se separaron en una centrifuga horizontal (tipo J) usando un sistema PEG 1540 (12,5%) / fosfato dibásico de potasio (12,5%). El flujo fue de 0,5 ml/min y como fase móvil se empleó la inferior, rica en fosfatos. Se utilizó una columna de 220 ml de capacidad total ($b=0,3$).

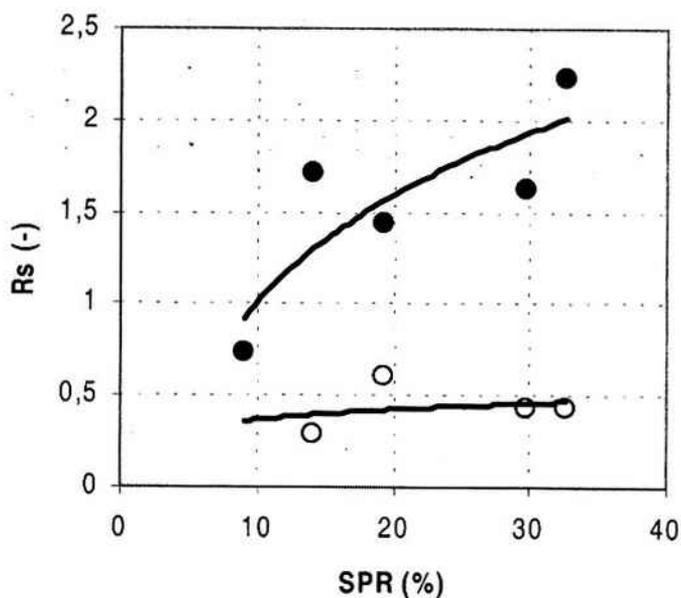


Figura 3: Retención de la fase líquida (estacionaria) en función de la velocidad de rotación en la centrifuga planetaria del sistema CCC-1000 (Pharmatech). Se empleó un sistema bifásico formado por PEG 1540 (12,5%) y fosfatos (12,5%). La centrifuga se alimentó en sentido cabeza-cola reteniendo la fase superior (rica en PEG) (○) o inferior (rica en fosfatos) (◻) Alternativamente, se trabajó en sentido cola-cabeza con retención de la fase superior (■) o de la fase inferior (△). Se empleó una columna semipreparativa de 120 ml de capacidad total ($\beta = 0,5-0,8$).

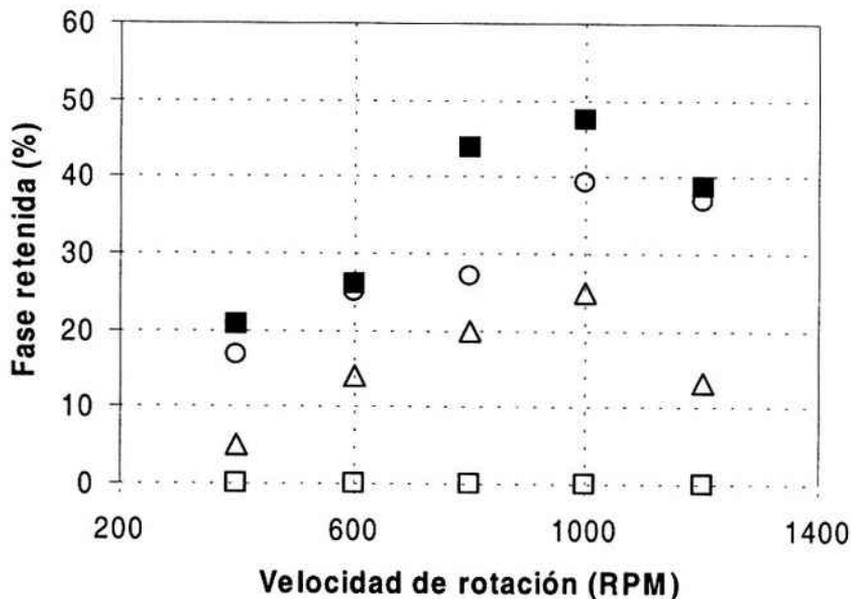


Figura 4: Efecto del flujo volumétrico sobre la retención de fase estacionaria (fase superior rica en PEG) en un sistema bifásico formado por PEG 1540 (12,5%) y fosfatos (12,5%). La centrifuga planetaria se operó a 1000 rpm. El sistema se alimentó en dirección cola-cabeza (●) o cabeza-cola (○).

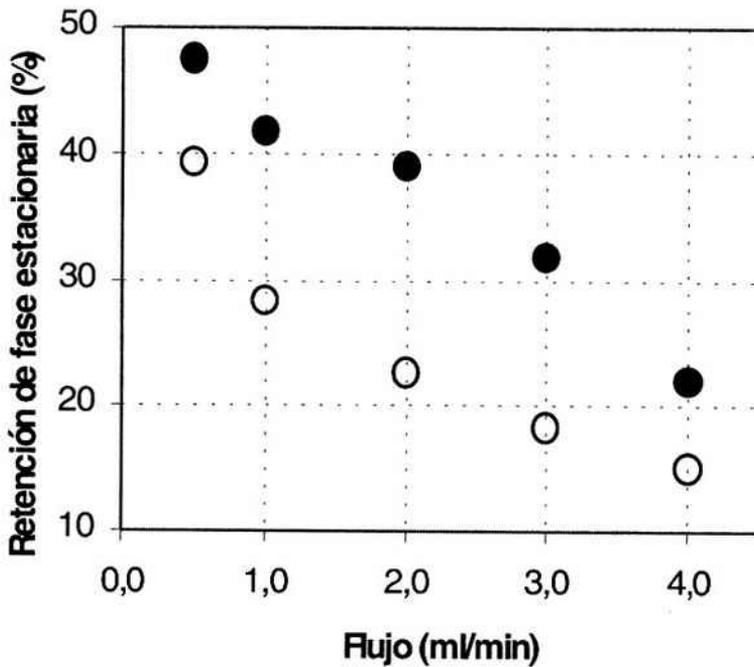


Figura 5: Efecto del volumen de fase móvil eluída sobre la tasa efectiva de retención de fase estacionaria en la centrífuga planetaria. Se trabajó con tres columnas semipreparativas, con un sistema bifásico formado por PEG 1540 (12,5%) y fosfatos (12,5%), a una velocidad de rotación de 1000 rpm. El flujo se fijó en 0,5 ml/min, 0,8 ml/min, 1,1 ml/min y 1,5 ml/min.

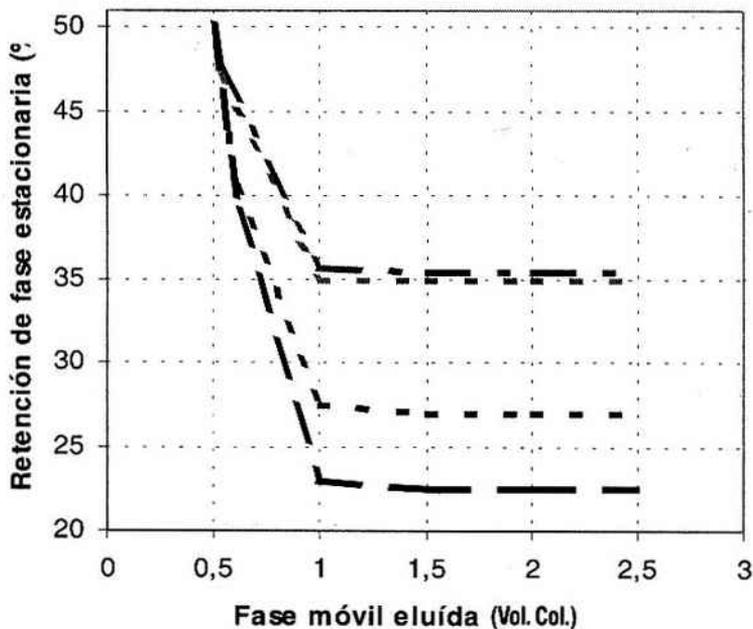


Figura 6: Separación de una mezcla artificial de proteínas bajo condiciones optimizadas, tal como se describe en el texto. BSA: seroalbúmina bovina; HEWL: lisozima; TAU: taumatina. La flecha señala el momento de la inyección de la muestra. La carga total fue de 7,5 mg de proteína.

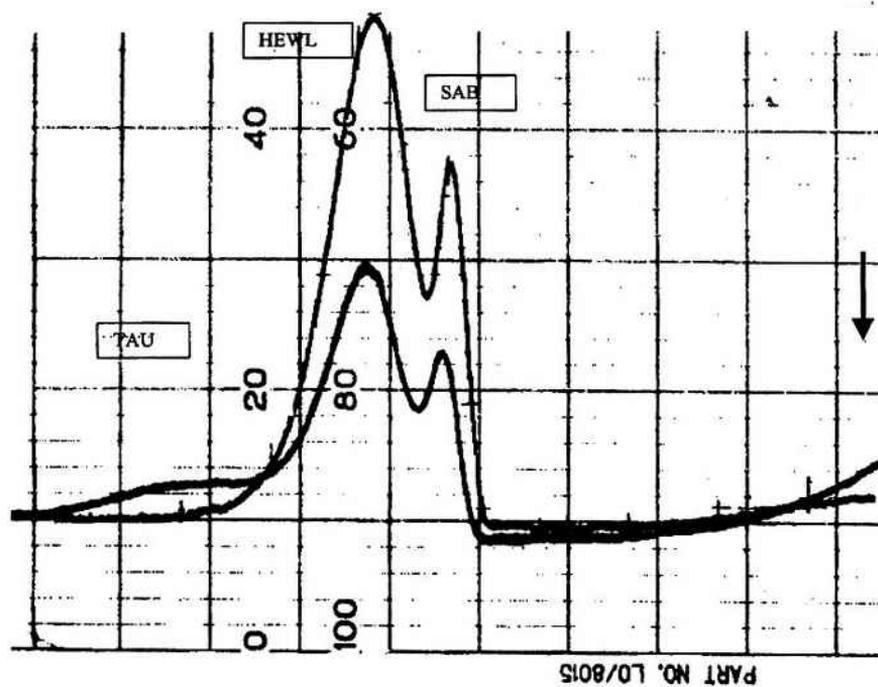
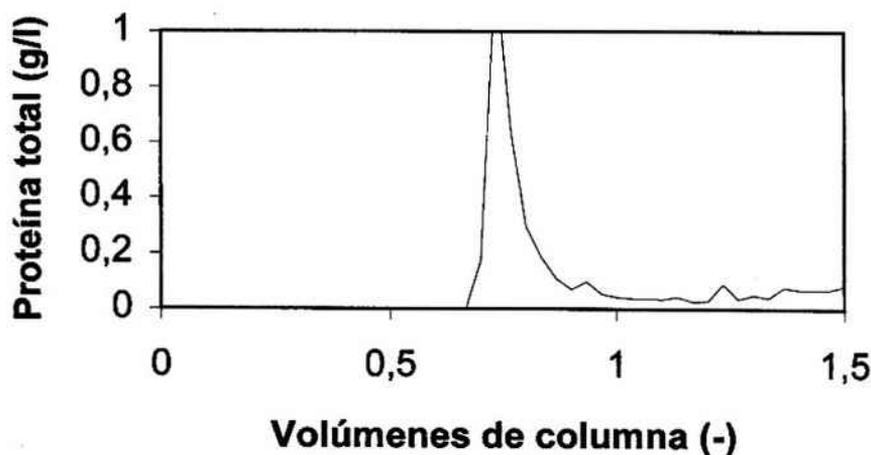


Figura 7: Fraccionamiento del suero equino hiperinmune mediante CCC.

Bibliografía

- 1- P.A. Albertsson, 1986. "Partition of Cell Particles and Macromolecules", 3rd revised edition, John Wiley & Sons, New York.
- 2- Kula, M.R., 1990. Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. *Bioseparation* **1**: 181-189.
- 3- Fernández-Lahore, H.M., Miranda, M.V., Fraile, E.R., Biscoglio, M., and Cascone, O., 1995. Partition behaviour and purification of a *Mucor bacilliformis* acid protease in aqueous two-phase systems. *Process Biochem.* **30**: 615-621.
- 4- Bompensieri, S., González, R., Kok, R., Miranda, M.V., Nutgeren-Roodzant, I., Hellingwerf, K., Cascone, O., and Nudel, C., 1996. Purification of a lipase from *Acinetobacter calcoaceticus* AAC323-1 by hydrophobicity-exploiting methods. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **23**: 77-81.
- 5- Miranda, M.V., Fernández-Lahore, H.M., and Cascone, O., 1998. Peroxidase extractive purification from plant raw materials in aqueous two-phase systems. *Acta Biotechnol.* **18**: 179-188.
- 6- Kijak, G., Camperi, S.A., Stumpo, R., Cascone, O. and Fernández-Lahore, H.M., 2001. Extractive fractionation of hyperimmune horse sera. *Sep. Sci. Technol.* **36**: 59-79.
- 7- Ito, Y., 1996. Principle, apparatus, and methodology of high-speed counter-current chromatography. En: "High-Speed Counter-current Chromatography", Y. Ito and W.D. Conway Ed., John Wiley & Sons, New York.
- 8- Shibusawa, Y., 1996. Separation of proteins by high-speed counter-current chromatography. En: "High-Speed Counter-current Chromatography", Y. Ito and W.D. Conway Ed., John Wiley & Sons, New York.
- 9- Shibusawa, Y., Yamagushi, M. and Ito, Y., 1998a. Polyethyleneglycol-potassium phosphate aqueous two-phase systems for counter-current chromatography of proteins. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **21**: 121-133.
- 10- Shibusawa, Y., Kihira, S., and Ito, Y., 1998b. One-step purification of proteins from chicken egg-white using counter-current chromatography. *J. Chromatogr. B*, **709**, 301-305.
- 11- Joshi, J.B., Sawant, S.B., Raghava Rao, K.S.M.S., Patil, T.A., Rostami, K.M., Sikdar, S.K., 1990. Continuous counter-current two-phase aqueous extraction. *Bioseparation* **1**: 311-324.
- 12- Ito, Y., Matsuda, K., Ma, Y., Qi, L., 1998. Toroidal coil counter-current chromatography study of the mass transfer rate of proteins in aqueous-aqueous polymer phase system. *J. Chromatogr. A* **802**: 277-283.
- 13- Hansson, U.B., Andersson, K., Liu, Y. and Albertsson, P.A., 1989. Fractionation of immunoglobulins by liquid-liquid partition chromatography in aqueous two-phase systems. *Analyt. Biochem.* **183**: 305-311.
- 14- Fernández Lahore, H.M. and Thömmes, J., 1999. Expanded bed adsorption as a primary recovery step in protein purification. *Récent Progrès en Génie de Procédés* **13**: 537-544.