

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TEXTIL**



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE SOPORTES  
MACROPOROSOS PARA LA SEPARACIÓN DE  
PROTEÍNAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA  
IMAC**

**MONTAÑA ELVIRO PÉREZ**

**JULIO 2017**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TEXTIL**



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE SOPORTES  
MACROPOROSOS PARA LA SEPARACIÓN DE  
PROTEÍNAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA  
IMAC**

**MEMORIA QUE, PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN INGENIERÍA  
QUÍMICA (CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICAS) POR LA UNIVERSIDAD DE  
SALAMANCA, PRESENTA:**

**DÑA. MONTAÑA ELVIRO PÉREZ**



El Dr. D. Miguel Ángel Galán Serrano, Catedrático de Ingeniería Química de la Universidad de Salamanca y la Dra. Dña. Eva María Martín del Valle, Catedrática de Ingeniería Química de la Universidad de Salamanca,

Informan:

Que la memoria titulada: *“Desarrollo y validación de soportes macroporosos para la separación de proteínas mediante cromatografía IMAC”*, que para optar al Grado de Doctor en Ingeniería Química, Programa de Doctorado *“Ciencia y Tecnología Químicas (RD 99/2011)”*, presenta Dña. Montaña Elviro Pérez, ha sido realizado bajo la dirección de los mismos en el Departamento de Ingeniería Química y Textil de la Universidad de Salamanca y que, considerando que constituye un trabajo de tesis.

Autorizan:

Su presentación ante tercer ciclo de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firman el presente informe, en Salamanca a 20 de junio de 2017.

D. Miguel Ángel Galán Serrano

Dña. Eva María Martín del Valle



## **Agradecimientos:**

En primer lugar, quiero agradecer toda la ayuda y entrega de mis directores de la presente tesis doctoral, los Catedráticos Miguel Ángel Galán Serrano y Eva M. Martín del Valle. Muchas gracias por vuestra confianza y por ser una fuente continua de aprendizaje.

Al Departamento de Ingeniería Química que me ha ayudado desde el primer momento, en especial Julián, Manolo, Belén (secretaría), María, Belén y Nekane. Gracias por tenderme la mano siempre que he necesitado ayuda.

A todos mis compañeros de laboratorio que han hecho más llevadero este camino, en especial a Milena, Gema, Celia, Chema, Sergio, Álvaro, Fernando, José, Mariano, Audelino, Guillermo y Antonio: Gracias por vuestros consejos, por vuestro apoyo y, en muchos casos, gracias por vuestra amistad sincera.

A mi querido Coro Universitario, gracias por hacerme vivir tantos buenos momentos, por ser mi vía de escape en muchas ocasiones y por ser una segunda gran familia. En especial, gracias a MaCUSal, donde merecen una mención especial Albertini, Jake, Valeska, y Anita.

A mis amigos, los de verdad, vosotros sabéis quiénes sois, no puedo decir nada más que GRACIAS por todo.

Gracias a Athanasios (Sakis) Mantalaris y Efstratios Pistikopoulos por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme trabajar con ellos, así como conocer a gente maravillosa: Joana, Susana, José, Ana, Mark, Asma, Sophie, Spyros, Nikos, Richard, Cristine, Simon: Gracias por hacer de esos tres meses una experiencia inolvidable. A María y Sofía, gracias por vuestra amistad sincera y por ser como mis hermanas.

A Pedro, gracias por tu paciencia y cariño.

Por último, pero no por ello menos importante, quiero agradecer de todo corazón a mis padres y hermanos su apoyo incondicional, sacrificio y cariño, sin el cual no hubiera podido conseguirlo. Muchas gracias por hacerme ser quien soy.





*“Hay locuras para la esperanza, hay locuras también del dolor,  
y hay locuras de allá, donde el cuerdo no alcanza, locuras de otro color.*

*Hay locuras que son poesía, hay locuras de un raro lugar.  
Hay locuras sin nombre, sin fecha, sin cura, que no vale la pena curar.*

*Hay locuras que son como brazos de mar, te sorprenden, te arrastran,  
te pierden y ya.*

*Hay locuras de ley pero no de juzgar.*

*Hay locuras que son la locura, personales locuras de dos.  
Hay locuras que imprimen dulces quemaduras, locuras de diosa y de dios.*

*Hay locuras que hicieron el día, hay locuras que estarán por venir.  
Hay locuras tan vivas, tan sanas, tan puras, que una de ellas será mi morir.”*

*-Silvio Rodríguez, Locuras.*



---

## Índice:

Índice de Tablas:.....	xiii
Índice de Figuras: .....	xix
Índice de Ecuaciones y Reacciones:.....	xxxi
Resumen: .....	xlix
Abstract: .....	lv
Capítulo 1. ....	1
Capítulo 2. ....	17
Capítulo 3. ....	21
3.1 PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS [2, 54, 55]. ....	23
3.1.1 Estructura primaria. ....	23
3.1.2 Estructura secundaria.....	25
3.1.3 Estructura terciaria.....	27
3.1.4 Estructura cuaternaria. ....	27
3.2 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD. ....	27
3.2.1 Modo de operación en cromatografía de afinidad [56]. ....	31
3.3 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON IONES METÁLICOS INMOVILIZADOS ( <i>Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC</i> ).....	34
3.3.1 Generalidades de la cromatografía IMAC.....	34
3.3.2 Antecedentes de la cromatografía IMAC. ....	36
3.3.3 Mecanismo de separación de la cromatografía IMAC. ....	39

---

3.3.4	Componentes necesarios en la cromatografía IMAC [95].	40
3.3.5	Tipos de metales.	42
3.3.6	Tipos de agente quelante.	45
3.3.7	Grupos funcionales superficiales en la proteína a separar [17].	47
3.3.7.1	Histidinas	48
3.3.7.2	Otros aminoácidos.	49
3.3.7.3	Efecto de la distribución de cadenas laterales.	51
3.3.8	Composición de la fase móvil.	52
3.3.8.1	Fuerza iónica (I).	52
3.3.8.2	Tipo de sales en disolución.	53
3.3.8.3	Efecto del pH.	54
3.3.8.4	Agentes competitivos.	55
3.3.9	Usos de la Cromatografía IMAC	55
3.4	Soportes utilizados en cromatografía.	57
3.5	Monolitos	62
3.5.1	Monolitos orgánicos o poliméricos.	64
3.5.2	Monolitos inorgánicos o de silicio.	66
3.5.3	Monolitos de agarosa.	66
Capítulo 4.		69
4.1	PREPARACIÓN DEL MONOLITO.	71
4.1.1	Materiales utilizados.	72
4.1.1.1	Reactivos.	72

---

4.1.1.2 Equipos.....	73
4.1.2 Emulsiones. ....	73
4.1.3 Selección del material estructural de la matriz cromatográfica (fase continua).....	75
4.1.4 Selección de la fase orgánica (fase dispersa).....	76
4.1.5 Selección de las condiciones de formación del monolito.....	77
4.1.5.1 Efecto de la concentración de Agarosa D5.....	77
4.1.5.2 Efecto de la adición de detergente [39]. ....	79
4.1.5.3 Efecto de la cantidad de fase orgánica [39].....	82
4.1.5.4 Efecto de la velocidad de agitación y del tiempo transcurrido entre la formación de la emulsión y la gelificación del polisacárido [39]. 83	
4.1.6 Método propuesto para la preparación del monolito de Agarosa Superporosa.....	84
4.2 CARACTERIZACIÓN DEL MONOLITO DE AGAROSA SUPERPOROSA.....	86
4.2.1 Método de procesado de imagen. ....	86
4.2.1.1 Distribución del diámetro Feret.....	89
4.2.1.2 Porosidad. ....	92
4.2.1.3 Volumen total del superporo. ....	93
4.2.1.4 Área superficial. ....	95
4.2.2 Densidades real y aparente, y capacidad de <i>swelling</i> . ....	96
4.2.3 Pérdida de carga a través del monolito.....	99
4.3 CONCLUSIONES.....	103

---

Capítulo 5. ....	105
5.1 ACTIVACIÓN DEL MONOLITO DE AGAROSA POROSA Y ENLACE DEL LIGANDO NECESARIO PARA SU UTILIZACIÓN EN CROMATOGRAFÍA IMAC. ....	107
5.1.1 Materiales y métodos. ....	108
5.1.1.1 Reactivos. ....	108
5.1.1.2 Equipos utilizados. ....	108
5.1.2 Activación del soporte y fijación del agente quelante. ....	109
5.1.2.1 Activación del soporte de Agarosa Superporosa. ....	110
5.1.2.2 Fijación del agente quelante. ....	112
5.1.3 Quelación del metal. ....	113
5.1.4 Método de análisis del Cu <sup>2+</sup> ....	115
5.2 ESTRUCTURAS DE LA BSA Y LA CATALASA. ....	116
5.2.1 Estructura de la BSA. ....	116
5.2.2 Estructura de la Catalasa de hígado bovino (EC 1.11.1.6). ....	118
5.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS SUPERFICIALES DE LA BSA Y LA CATALASA. ....	120
5.3.1 Determinación de aminoácidos superficiales: Histidina y Triptófano en la BSA. ....	121
5.3.1.1 Estructura primaria de la BSA. ....	121
5.3.1.2 Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini de la BSA (Emini Surface Accessibility Prediction). ....	123
5.3.2 Determinación de aminoácidos superficiales: Histidina y Triptófano en la Catalasa. ....	126

---

5.3.2.1	Estructura primaria de la Catalasa.....	127
5.3.2.2	Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini de la Catalasa (Emini Surface Accessibility Prediction).....	128
5.4	COMPARACIÓN ENTRE LOS ENLACES DE LA BSA Y LA CATALASA SEGÚN SUS HISTIDINAS Y TRIPTÓFANOS ACCESIBLES. ....	132
5.5	CONCLUSIONES.....	133
Capítulo 6.	.....	135
6.1	SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN.....	137
6.1.1	Materiales y métodos.....	138
6.1.1.1	Reactivos: .....	138
6.1.1.2	Equipos utilizados: .....	139
6.1.2	Adsorción. ....	139
6.1.3	Elución no específica o lavado. ....	141
6.1.4	Elución específica.....	142
6.1.5	Reequilibrio de la columna.....	143
6.1.6	Métodos de análisis. ....	144
6.1.6.1	Calibrado de la concentración de BSA.....	144
6.1.6.2	Curva de calibrado del Método de Bradford. ....	146
6.1.6.3	Calibrado de la concentración de Catalasa.....	147
6.1.6.4	Calibrado de la actividad de la Catalasa.....	149
6.2	ESTUDIOS PREVIOS AL PROCESO CROMATOGRÁFICO. ....	151
6.2.1	Estudio de la formación de enlaces no específicos entre la proteína y la matriz cromatográfica.....	151

---

6.2.2	Evaluación de la presencia de $\text{Cu}^{2+}$ en cada etapa cromatográfica: Estabilidad del ligando. ....	153
6.2.3	Método de análisis del $\text{CuCl}_2$ . ....	154
6.2.4	Evaluación de la pérdida de $\text{Cu}^{2+}$ en el proceso de adsorción: PBS 50 mM pH 7.4. ....	156
6.2.5	Evaluación de la pérdida de $\text{Cu}^{2+}$ en el proceso de elución específica: Imidazol 0.2M en tampón fosfato 50 mM, 1M NaCl pH 8.1.....	156
6.2.6	Evaluación de la pérdida de $\text{Cu}^{2+}$ en el proceso de regeneración: TRIS 50 mM pH 10. ....	157
6.3	VALIDACIÓN DEL MONOLITO EN CROMATOGRAFÍA IMAC UTILIZANDO UNA PROTEÍNA TIPO: BSA.....	160
6.3.1	Estudios de adsorción de la proteína BSA.....	160
6.3.2	Estudios de elución de la proteína BSA. ....	162
6.3.3	Reequilibrio y reutilización de la columna cromatográfica. ....	163
6.3.4	Resultados obtenidos con la proteína BSA.....	164
6.3.4.1	Ciclos de adsorción de BSA.....	164
6.3.4.2	Ciclos de elución de la BSA.....	171
6.3.4.3	Influencia del caudal en el rendimiento de elución. ....	178
6.3.5	Conclusiones de los ciclos de adsorción-elución de la BSA.....	180
6.4	ESTUDIO DE LA UTILIZACIÓN DEL MONOLITO EN CROMATOGRAFÍA IMAC CON ENZIMA TIPO: CATALASA.....	181
6.4.1	Estudios de adsorción de la enzima Catalasa. ....	182
6.4.1.1	Estudios de elución de la enzima Catalasa.....	183
6.4.1.2	Reequilibrio y reutilización de la columna cromatográfica. ....	185



---

6.4.1.3	Resultados obtenidos con la enzima Catalasa. ....	185
6.4.1.4	Ciclos de elución de la Catalasa. ....	193
6.4.1.5	Influencia del caudal en el rendimiento de elución. ....	198
6.4.2	Actividad de la Catalasa. ....	200
6.4.3	Conclusiones de los ciclos de adsorción-elución de la Catalasa. ....	201
6.5	ESTUDIO COMPARATIVO DE ADSORCIÓN-ELUCIÓN: BSA y CATALASA. ....	203
6.5.1	Comparación entre el monolito de Agarosa Superporosa y el Monolito Cerámico recubierto con Agarosa D5 [38, 53]. ....	207
6.6	CONCLUSIONES. ....	214
Capítulo 7.	.....	217
7.1	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA E INHIBICIÓN DE UNA ENZIMA. ....	219
7.1.1	Modelo de Michaelis-Menten [197]. ....	219
7.1.2	Linealización de Lineweaver- Burk [200]. ....	222
7.1.3	Inhibición enzimática. ....	224
7.1.3.1	Inhibidores reversibles. ....	224
7.1.3.2	Inhibidores irreversibles. ....	228
7.2	DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA. ....	229
7.2.1	Materiales y métodos. ....	230
7.2.1.1	Reactivos: ....	230
7.2.1.2	Equipos utilizados: ....	231

---

7.2.1.3	Calibrado de la concentración de sustrato para la determinación de la actividad enzimática de la Catalasa. ....	231
7.2.2	Actividad enzimática de la Catalasa. ....	233
7.2.2.1	Influencia del proceso cromatográfico y del tipo de disolución tampón en la actividad enzimática de la Catalasa. ....	233
7.2.2.2	Efecto de la concentración del imidazol en la actividad enzimática de la Catalasa: .....	240
7.2.2.3	Efecto de la fuerza iónica (I). ....	243
7.2.2.4	Efecto del pH en la actividad enzimática de la Catalasa. ....	245
7.2.2.5	Inhibición según el tipo de disolución tampón empleado. ....	248
7.2.2.6	Estudio de la inhibición por presencia o efecto del Cu <sup>2+</sup> . ....	251
7.2.2.7	Estudio de la actividad de la catalasa en NaSCN. ....	255
7.3	TRANSFERENCIA DE IONES METÁLICOS ( <i>METAL ION TRANSFER</i> ó <i>MIT</i> ). ....	255
7.3.1	Hipótesis que justifica la pérdida de la actividad de la Catalasa por Transferencia de Ion Metálico. ....	256
7.4	CONCLUSIONES. ....	263
Capítulo 8.	.....	267
8.1	BALANCE DE MATERIA A CADA PUNTO DE LA INSTALACIÓN. ...	270
8.2	ETAPAS DEL PROCESO DE ADSORCIÓN DE LA BSA EN EL MONOLITO. ....	277
8.3	ESTUDIO CINÉTICO Y DE EQUILIBRIO DE ADSORCIÓN DE LA BSA.	278
8.3.1	Estudio de la cinética de adsorción y del equilibrio de adsorción en Batch. 282	

---

8.3.1.1	Diseño de experimentos. ....	283
8.3.1.2	Determinación de la estabilidad de la proteína BSA.....	284
8.3.1.3	Preparación del soporte cromatográfico.....	285
8.3.1.4	Proceso de adsorción en Batch.....	286
8.3.1.5	Isoterma de adsorción.....	289
8.3.2	Estudio de la cinética de adsorción en el monolito. ....	291
8.3.3	Comparación entre ambos soportes.....	292
8.4	TRANSFERENCIA DE MATERIA EN EL INTERIOR DEL MONOLITO. 297	
8.4.1	Modelo del monolito. ....	297
8.4.2	Transferencia de materia externa.....	301
8.4.3	Transferencia de materia interna. ....	304
8.4.4	Etapas limitantes del proceso global.....	307
8.5	CONCLUSIONES.....	310
Capítulo 9.	.....	313
9.1	ANTECEDENTES EN LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (mAb) Y SU OPTIMIZACIÓN EN EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN BSEL [215]. ....	315
9.1.1	Esquema de trabajo PAROC. ....	316
9.1.1.1	Análisis y modelado de alta fidelidad . ....	317
9.1.1.2	Aproximación del modelo.....	318
9.1.1.3	Control del modelo.....	319
9.1.1.4	Validación del sistema de control o “closed loop”.....	319

---

9.1.2 Modelos de generación de anticuerpos monoclonales (mAb) a partir de cultivos celulares. ....	320
9.2 TRABAJO REALIZADO EN LA ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN. ....	321
9.2.1 Optimización dinámica de un modelo creado a partir de datos externos al grupo de investigación.....	322
9.2.2 Modificación del modelo incluyendo los términos de la cinética de formación de agregados y fragmentos.....	330
9.2.3 Optimización dinámica y “cierre del ciclo” de un modelo creado a partir de datos experimentales del grupo de investigación BSEL. ....	333
9.3 CONCLUSIONES.....	337
Capítulo 10.(Conclusiones) .....	339
Capítulo 11.(Bibliografía) .....	345
Apéndice A (Introducción a gPROMS) .....	371
Apéndice B (Publicaciones) .....	411

## **Índice de Tablas:**

Tabla 1.1. Resumen de algunas de las técnicas más utilizadas en la separación de biomoléculas.....	3
Tabla 1.2. Clasificación de algunos tipos de cromatografía de afinidad, según el tipo de ligando utilizado [7, 9]. .....	5
Tabla 1.3 Comparación entre procesos basados en la adsorción [16]. .....	8
Tabla 1.4. Comparación de las propiedades de los lechos particulados y los monolitos en cromatografía [6, 14, 18, 19, 30]. .....	10
Tabla 1.5. Resumen de los soportes utilizados en los últimos años en cromatografía IMAC.....	12
Tabla 1.6. Diferentes aplicaciones del monolito de Agarosa Superporosa [42-44]. .....	14
Tabla 3.1. Resumen de las diferentes estructuras de los aminoácidos. ....	23
Tabla 3.2. Tipos de estructura secundaria y sus características.....	26
Tabla 3.3. Tipos de ligando utilizados en cromatografía de afinidad y biomolécula con la que interactúa [7, 9, 56]. .....	28
Tabla 3.4. Principales ligandos inmovilizados mediante un enlace covalente [56]. .....	30
Tabla 3.5. Comparación entre la cromatografía IMAC y de afinidad bioespecífica [17]. .....	35
Tabla 3.6. Acontecimientos más importantes en la cromatografía IMAC [16, 45, 65].	36
Tabla 3.7. Componentes que conforman el soporte cromatográfico [95]. .....	40
Tabla 3.8. Metales más utilizados en cromatografía IMAC según la clasificación de Pearson [13, 96]. .....	42
Tabla 3.9. Tipos de metales según su objetivo [16, 45]. .....	43

---

Tabla 3.10. Agentes quelante más habituales [45, 49]. .....	45
Tabla 3.11. Contribución y mecanismo de enlace de diferentes grupos funcionales [17]. .....	49
Tabla 3.12. Reconocimiento del metal según la topografía superficial de la proteína [101]. .....	51
Tabla 3.13. Aplicaciones más importantes de la cromatografía IMAC. ....	56
Tabla 3.14. Clasificación de matrices según su origen para cromatografía de afinidad [10, 57]. .....	58
Tabla 3.15. Ventajas de la agarosa como soporte cromatográfico. ....	59
Tabla 3.16. Materiales de soportes cromatográficos y condiciones de pH que resisten [56]. .....	60
Tabla 3.17. Monolitos comerciales y sus especificaciones [134]......	64
Tabla 4.1. Reactivos utilizados en la formación y caracterización del monolito de Agarosa Superporosa [38, 39, 42, 43]. .....	72
Tabla 4.2. Equipos utilizados en la formación y caracterización del monolito de Agarosa Superporosa. ....	73
Tabla 4.3. Propiedades del monolito según la fase orgánica. ....	76
Tabla 4.4. Concentraciones de Agarosa D5 y sus propiedades en el monolito. ....	78
Tabla 4.5. Números HLB de tensioactivos comerciales utilizados como emulsionantes [139]. .....	81
Tabla 4.6. Valores de porosidad obtenidos mediante <i>ImageJ</i> . ....	92
Tabla 4.7. Volumen total del superporo obtenido mediante <i>ImageJ</i> . ....	93
Tabla 4.8. Propiedades de los compuestos utilizados. ....	94
Tabla 4.9. Área superficial del monolito obtenido mediante estimaciones obtenidas mediante <i>ImageJ</i> . ....	95

Tabla 4.10 Datos de masas húmedas y secas y volúmenes de cuatro monolitos evaluados. ....	97
Tabla 4.11. Propiedades de densidad y <i>swelling</i> del monolito. ....	98
Tabla 4.12. Pérdida de carga en diferentes soportes cromatográficos. ....	101
Tabla 5.1. Reactivos utilizados y empresa comercializadora. ....	108
Tabla 5.2. Histidinas y Triptófanos con alta probabilidad de encontrarse en la superficie de la BSA ( <i>Bos Taurus</i> , Bovine). ....	126
Tabla 5.3. Histidinas y Triptófanos con alta probabilidad de encontrarse en la superficie de una subunidad de Catalasa ( <i>Bos Taurus</i> , Bovine). ....	131
Tabla 5.4. Resumen de las propiedades de enlace de la BSA y la Catalasa. ....	132
Tabla 6.1. Reactivos utilizados y empresa comercializadora. ....	138
Tabla 6.2. Valores de absorbancia para BSA en PBS 50 mM pH 7.4, a 280 nm. ....	145
Tabla 6.3. Valores de absorbancia para el Método de Bradford a 595 nm. ....	146
Tabla 6.4. Valores de absorbancia para Catalasa en PBS 50 mM pH 7.4, a 280 nm. ...	148
Tabla 6.5. Valores de absorbancia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en PBS pH 7.4 a 240 nm. ....	150
Tabla 6.6. Datos de adsorción de la BSA. ....	170
Tabla 6.7. Datos de elución de la BSA. ....	176
Tabla 6.8. Datos del rendimiento de elución de la BSA a diferentes caudales. ....	178
Tabla 6.9. Datos de adsorción de la Catalasa. ....	191
Tabla 6.10. Datos de elución de la Catalasa. ....	196
Tabla 6.11. Datos del rendimiento de elución de la Catalasa a diferentes caudales. ...	198
Tabla 6.12. Comparación entre los resultados de los experimentos con la BSA y la Catalasa en purificación mediante cromatografía IMAC utilizando un caudal de 1.5 ml/min en los experimentos de adsorción y elución. ....	203

---

Tabla 6.13. Comparación entre el comportamiento del monolito de Agarosa Superporosa y el monolito Cerámico recubierto con Agarosa D5 [53] para los experimentos de purificación de BSA 0.7 mg/mL con IMAC, utilizando un caudal de 1.5 mL/min en los experimentos de adsorción y elución. ....	209
Tabla 6.14. Comparación entre el comportamiento del monolito de Agarosa Superporosa y el monolito Cerámico recubierto con Agarosa D5 [53] para los experimentos de purificación de Catalasa con IMAC, utilizando un caudal de 1.5 mL/min en los experimentos de adsorción y elución. ....	211
Tabla 6.15. Comparación de cantidad de biomolécula adsorbida por unidad de área superficial, para los dos tipos de monolitos.....	213
Tabla 7.1. Esquema de los tipos de inhibición enzimática y cómo influye en los parámetros de la cinética enzimática para el caso de un inhibidor enzimático de unión reversible. ....	225
Tabla 7.2. Reactivos utilizados y empresa comercializadora.....	230
Tabla 7.3. Equipos utilizados y función. ....	231
Tabla 7.4. Valores de absorbancia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en PBS pH 7.4 a 240 nm.....	232
Tabla 7.5. Valores de los parámetros de la cinética enzimática obtenidos para diferentes disoluciones. ....	237
Tabla 7.6. Velocidades de reacción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 mM para diferentes concentraciones de imidazol. ....	241
Tabla 7.7. Relación entre la concentración añadida de NaCl y la fuerza iónica de la muestra utilizada.....	243
Tabla 7.8. Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten.....	251
Tabla 7.9. Resumen de los datos obtenidos del Western-Blott. ....	261
Tabla 8.1. Resumen de las pruebas de estabilidad de la proteína a 23°C.....	285



Tabla 8.2. Datos de las constantes cinéticas intrínsecas y de equilibrio obtenidos mediante estimación de parámetros para el proceso en Batch (Apéndice A). ....	288
Tabla 8.3. Resultados de los experimentos de adsorción para diferentes concentraciones de BSA.....	290
Tabla 8.4. Datos de las constantes cinéticas y de equilibrio obtenidos mediante estimación de parámetros para el proceso en columna monolítica (Apéndice A).....	291
Tabla 8.5. Resumen de las condiciones empleadas para la determinación de la velocidad de adsorción en el Monolito y en el Batch. ....	292
Tabla 8.6. Resumen de los datos experimentales obtenidos en la determinación de la cinética de adsorción en el Monolito.....	294
Tabla 8.7. Resumen de los datos experimentales obtenidos en la determinación de la cinética de adsorción en Batch. ....	295
Tabla 8.8. Datos de las constantes cinéticas y de equilibrio obtenidos mediante estimación de parámetros para el proceso en Batch (intrínseco) y en columna monolítica (global) (Apéndice A).....	296
Tabla 8.9. Parámetros del monolito obtenidos anteriormente. ....	298
Tabla 8.10. Parámetros calculados utilizando las Ecuaciones (8.16) - (8.30).....	300
Tabla 8.11. Resumen de los parámetros que intervienen en el cálculo del coeficiente de transferencia de materia interna.....	302
Tabla 8.12. Resumen de los valores obtenidos en el cálculo del coeficiente de transferencia de materia interna.....	303
Tabla 8.13. Resumen de los parámetros que intervienen en el cálculo del factor de eficacia interno. ....	306
Tabla 8.14. Resumen de los parámetros relacionados con la transferencia de materia.....	308
Tabla 9.1. Modelo matemático que describe el sistema upstream. ....	322

---

Tabla 9.2. Concentración de mAb obtenido (mg/L), utilizando diferentes estrategias de optimización. ....	329
Tabla 9.3. Concentración de mAb obtenido (mg/L) utilizando diferentes estrategias de optimización. ....	332
Tabla 9.4. Formulación de la optimización dinámica ejecutada para la maximización de la productividad del sistema de cultivo celular GS-NSO. ....	335

## Índice de Figuras:

Figura 1.1. Fundamento de la cromatografía de afinidad.....	5
Figura 1.2. Esquema del fundamento de la cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC). .....	7
Figura 3.1. Enlace peptídico entre dos aminoácidos. ....	24
Figura 3.2. Estructura resonante del enlace peptídico. ....	24
Figura 3.3 Estructuras cis y trans de la unión de dos aminoácidos. ....	25
Figura 3.4. Esquema del proceso típico de separación en cromatografía de afinidad a) Adsorción, b) Lavado, c) Elución.....	32
Figura 3.5. Diagrama del proceso seguido en la <i>elución on-off</i> . ....	33
Figura 3.6. Componentes principales de la cromatografía IMAC.....	40
Figura 3.7. Estructuras a) aminoácido histidina, b) cadena lateral histidil, c) imidazol. 44	
Figura 3.8. Orden de afinidad con el imidazol [97].....	44
Figura 3.9. Esquema de las estructuras de algunos agentes quelante, a) IDA, b) NTA, c) CM-Asp, d) TED [49]. ....	46
Figura 3.10. Estructura del IDA según su pH [99].....	47
Figura 3.11. Serie de Hofmeister [104]. ....	53
Figura 3.12. Clasificación de los soportes cromatográficos según su geometría [6]. ....	61
Figura 3.13. Estructura de los monómeros y del copolímero GMA/EDMA [30]. ....	65
Figura 3.14. Estructura de la agarosa [41]. ....	67
Figura 4.1. Emulsión formada en la preparación del monolito. ....	74

---

Figura 4.2. Esquema de la formación del monolito de Agarosa Superporosa. ....	85
Figura 4.3. Imágenes del monolito utilizando un microscopio óptico, donde se observan los macroporos y los canales convectivos, tanto verticales (a y c) como horizontales (b y d).....	87
Figura 4.4. Procesado de la imagen obtenida: a) Imagen del monolito obtenida con el microscopio ESEM, b) Imagen a) procesada mediante <i>Image J</i> . ....	88
Figura 4.5. Procesado de la imagen obtenida: a) Imagen del monolito obtenida con el microscopio ESEM, b) Imagen a) procesada mediante <i>Image J</i> . ....	88
Figura 4.6. Diámetro de Feret para la orientación del eje x. ....	89
Figura 4.7. Distribución del Diámetro de los canales de la Figura 4.4b). ....	90
Figura 4.8. Distribución del diámetro de los canales de la Figura 4.5b). ....	90
Figura 4.9. Distribución del diámetro de los canales en las imágenes anteriores (Figura 4.7 y Figura 4.8). ....	91
Figura 4.10. Imágenes del monolito a) Monolito tras la preparación, b) mismo monolito tras un secado en condiciones ambientales durante 24h y c) mismo monolito tras 72h de rehidratación d) dimensiones del monolito rehidratado durante 72h. ....	98
Figura 4.11. Esquema de la instalación utilizada en la pérdida de carga. ....	99
Figura 4.12. Pérdida de carga para diferentes longitudes de monolito y diferentes caudales. ....	100
Figura 5.1. Instalación en discontinuo, compuesta por la columna cromatográfica monolítica, la bomba peristáltica, la disolución de $\text{Cu}^{2+}$ y el espectrofotómetro.....	109
Figura 5.2. Activación del soporte cromatográfico mediante la adición de un brazo espaciador. ....	111
Figura 5.3. Estructura de la matriz activada. ....	111
Figura 5.4. Esquema del proceso de activación [38]. ....	112

Figura 5.5. Estructuras de la matriz activada y el agente quelante.....	112
Figura 5.6. Estructura del agente quelante inmovilizado en el soporte cromatográfico. .....	113
Figura 5.7. Esquema del proceso de la fijación del agente quelante [38]. .....	113
Figura 5.8. Ion metálico inmovilizado mediante la formación de un quelato. ....	114
Figura 5.9. Monolitos a) en columna antes de cargar con cobre, b) en columna después de cargar con cobre y c) después de cargar con cobre.....	114
Figura 5.10. Recta de calibrado del CuCl <sub>2</sub> en agua (812 nm). .....	116
Figura 5.11. Dominios y estructura de la BSA (código PDB 3V03) [155].....	117
Figura 5.12. Estructura cuaternaria de la Catalasa de hígado bovino (código PDB 3J7B)[164].....	119
Figura 5.13. Aminoácidos superficiales cercanos al grupo Hemo de la Catalasa de hígado bovino, con las Histidinas distales se encuentran coloreadas en azul y las Asparraginas distales, en rojo [165]. .....	119
Figura 5.14. Estructura primaria de la BSA ( <i>Bos Taurus</i> , Bovine) [168] .....	122
Figura 5.15. Estructura secundaria de la BSA ( <i>Bos Taurus</i> , Bovine) [169] .....	122
Figura 5.16. Características de la <i>Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini</i> [172]. .....	123
Figura 5.17. <i>Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini</i> de la BSA ( <i>Bos Taurus</i> , Bovine): estructura primaria.....	124
Figura 5.18. Probabilidad de que una secuencia de aminoácidos se encuentre en la superficie de la BSA ( <i>Bos Taurus</i> , Bovine) según la <i>Predicción de la Accesibilidad</i> <i>Superficial Emini</i> [167]. .....	124
Figura 5.19. Secuencias de aminoácidos con alta probabilidad de encontrarse en la superficie de la BSA ( <i>Bos Taurus</i> , Bovine) según la <i>Predicción de la Accesibilidad</i> <i>Superficial Emini</i> .....	125

---

Figura 5.20. Estructura primaria de una subunidad de Catalasa (Bos Taurus, Bovine) [173]. .....	127
Figura 5.21. Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini de una subunidad de Catalasa (Bos Taurus, Bovine): estructura primaria.....	128
Figura 5.22. Probabilidad de que una secuencia de aminoácidos se encuentre en la superficie de una subunidad de Catalasa (Bos Taurus, Bovine) según la Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini. ....	129
Figura 5.23. Secuencias de aminoácidos con alta probabilidad de encontrarse en la superficie de una subunidad de Catalasa (Bos Taurus, Bovine) según la Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini. ....	130
Figura 6.1. Esquema de las etapas en la reutilización del monolito [38, 175]. .....	138
Figura 6.2. Instalación para el proceso de adsorción, compuesta por la columna cromatográfica monolítica, el baño termostatzado, la bomba peristáltica, y un tanque de agitación. ....	140
Figura 6.3. Instalación de elución, compuesta por la columna cromatográfica monolítica, el baño termostatzado la bomba peristáltica, la disolución y el espectrofotómetro. ....	142
Figura 6.4. Recta de calibrado de BSA en PBS pH 7.4.....	145
Figura 6.5. Recta de calibrado del Método de Bradford. ....	147
Figura 6.6. Recta de calibrado de Catalasa en PBS 50 mM pH 7.4. ....	148
Figura 6.7. Recta de calibrado de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 240 nm.....	150
Figura 6.8. Adsorción no específica de la BSA en la superficie de un monolito no activado (línea azul) y en un monolito activado sin Cu <sup>2+</sup> inmovilizado (línea verde). 152	
Figura 6.9. Espectro de absorción del CuCl <sub>2</sub> 5 mg/mL en disolución acuosa.....	154
Figura 6.10. Máximos y mínimos relativos obtenidos en el espectro de absorción del CuCl <sub>2</sub> 5 mg/mL en disolución acuosa. ....	154

Figura 6.11. Recta de calibrado del $\text{CuCl}_2$ en agua (812 nm). .....	155
Figura 6.12. Espectros de absorción utilizando a disolución de lavado (Trizma 50 mM pH 10) como blanco, a) disolución de elución específica: Imidazol 0.2M en tampón fosfato 1M NaCl pH 8.1, b) disolución de ion metálico: $\text{CuCl}_2$ 5 mg/mL en agua. ...	158
Figura 6.13. Absorbancias de corriente de salida de la columna en la etapa de reequilibrio a 280 y 812 nm.....	159
Figura 6.14. Instalación para el proceso de adsorción a tiempo inicial y cuando se alcanza el equilibrio, compuesta por la columna cromatográfica monolítica en la que se mantiene la temperatura utilizando un baño termostatzado, la bomba peristáltica, y un tanque de agitación que se considera de mezcla perfecta.....	161
Figura 6.15. Esquema de las etapas en la reutilización del monolito [38]. .....	164
Figura 6.16. Curva de equilibrio de adsorción de la BSA para diferentes reutilizaciones (n). .....	165
Figura 6.17. Curvas de equilibrio de adsorción de la BSA (ciclos 1-6). .....	166
Figura 6.18. Curvas de equilibrio de adsorción de la BSA (ciclos 7-12). .....	167
Figura 6.19. Curvas de equilibrio de adsorción de la BSA (ciclos 13-18). .....	168
Figura 6.20. Curvas de equilibrio de adsorción de la BSA (ciclos 19 y 20). .....	169
Figura 6.21. Rendimiento de adsorción de la BSA para cada ciclo de reutilización....	171
Figura 6.22. Picos de elución de la BSA (ciclos 1-6). En círculos blancos, elución de la proteína no enlazada de forma específica (PBS 50 mM pH 7.4) y en círculos negros, elución específica (0.2M Imidazol en fosfato 50 mM 1M NaCl pH 8.1). .....	172
Figura 6.23. Picos de elución de la BSA (ciclos 7-12). En círculos blancos, elución de la proteína no enlazada de forma específica (PBS 50 mM pH 7.4) y en círculos negros, elución específica (0.2M Imidazol en fosfato 50 mM 1M NaCl pH 8.1). .....	173

---

Figura 6.24. Picos de elución de la BSA (ciclos 13-18). En círculos blancos, elución de la proteína no enlazada de forma específica (PBS 50 mM pH 7.4) y en círculos negros, elución específica (0.2M Imidazol en fosfato 50 mM 1M NaCl pH 8.1).....	174
Figura 6.25. Picos de elución de la BSA (ciclos 19 y 20). En círculos blancos, elución de la proteína no enlazada de forma específica (PBS 50 mM pH 7.4) y en círculos negros, elución específica (0.2M Imidazol en fosfato 50 mM 1M NaCl pH 8.1).....	175
Figura 6.26. Rendimiento de elución de la BSA para cada ciclo de reutilización. En círculos negros se muestra la elución específica y en círculos blancos, elución no específica. ....	177
Figura 6.27. Rendimiento de elución de la BSA obtenido para diferentes caudales....	179
Figura 6.28. Instalación para el proceso de adsorción a tiempo inicial y cuando se alcanza el equilibrio, compuesta por la columna cromatográfica monolítica en la que se mantiene la temperatura utilizando un baño termostatzado, la bomba peristáltica, y un tanque de agitación que se considera de mezcla perfecta.....	182
Figura 6.29. Esquema de las etapas en la reutilización del monolito [38]. ....	186
Figura 6.30. Curvas de equilibrio de adsorción de la Catalasa para diferentes reutilizaciones (n). ....	187
Figura 6.31. Curvas de equilibrio de adsorción de la Catalasa (ciclos 1-6). ....	188
Figura 6.32. Curvas de equilibrio de adsorción de la Catalasa (ciclos 7-12). ....	189
Figura 6.33. Curvas de equilibrio de adsorción de la Catalasa (ciclos 13 y 14).....	190
Figura 6.34. Rendimiento de adsorción de la Catalasa para cada ciclo de reutilización. ....	192
Figura 6.35. Picos de elución de la Catalasa (ciclos 1-4). En círculos blancos, elución de la proteína no enlazada de forma específica (PBS 50 mM pH 7.4) y en círculos negros, elución específica (0.2M Imidazol en fosfato 50 mM 1M NaCl pH 8.1).....	193



Figura 6.36. Picos de elución de la Catalasa (ciclos 5-10). En círculos blancos, elución de la proteína no enlazada de forma específica (PBS 50 mM pH 7.4) y en círculos negros, elución específica (0.2M Imidazol en fosfato 50 mM 1M NaCl pH 8.1). .....	194
Figura 6.37. Picos de elución de la Catalasa (ciclos 11-14). En círculos blancos, elución de la proteína no enlazada de forma específica (PBS 50 mM pH 7.4) y en círculos negros, elución específica (0.2M Imidazol en fosfato 50 mM 1M NaCl pH 8.1). .....	195
Figura 6.38. Rendimiento de elución de la Catalasa para cada ciclo de reutilización. En círculos negros se muestra la elución específica y en círculos blancos, elución no específica. ....	197
Figura 6.39. Rendimiento de elución de la Catalasa obtenido para diferentes caudales. ....	199
Figura 6.40. Comparación de la actividad de la catalasa inicial (rojo) y recuperada (azul). ....	200
Figura 6.41. Comparación de la curva de equilibrio de la BSA y la Catalasa en el monolito de Agarosa Superporosa. ....	204
Figura 6.42. Comparación de la curva de elución de la BSA y la Catalasa en el monolito de Agarosa Superporosa. ....	205
Figura 6.43. Curvas de adsorción de la BSA en el monolito de Agarosa Superporosa (a la izquierda) y el monolito Cerámico recubierto por Agarosa D5 (derecha) [53]. ....	210
Figura 6.44. Curvas de adsorción de la Catalasa en el monolito de Agarosa Superporosa (a la izquierda) y el monolito cerámico recubierto por Agarosa D5 (derecha) [53]. ...	212
Figura 7.1. Representación de la velocidad de reacción ( $v_0$ en mM/s) frente a la concentración de sustrato (mM), en una reacción enzimática [199]. ....	221
Figura 7.2. Representación de la inversa de la velocidad de reacción (s/mM) frente a la inversa de la concentración de sustrato ( $\text{mM}^{-1}$ ) (linealización de Lineweaver-Burk) [199]. ....	223

---

Figura 7.3. Esquema de una reacción enzimática en presencia de un inhibidor enzimático de unión reversible.....	224
Figura 7.4. Esquema de la inhibición Competitiva [199].....	225
Figura 7.5. Representación de Lineweaver-Burk para la inhibición competitiva [199]. .....	226
Figura 7.6. Esquema de la inhibición Acompetitiva [199].....	226
Figura 7.7. Representación de Lineweaver-Burk para la inhibición acompetitiva [199]. .....	227
Figura 7.8. Esquema de las inhibiciones No competitiva y Mixta [199]. ....	227
Figura 7.9. Representación de Lineweaver-Burk para la inhibición no competitiva y mixta [199]. ....	228
Figura 7.10. Esquema de una reacción enzimática en presencia de un inhibidor enzimático de unión irreversible. ....	229
Figura 7.11. Recta de calibrado de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 240 nm.....	232
Figura 7.12. Velocidad de descomposición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 - 50 mM) por acción de Catalasa 0.05 M disuelta en tampón PBS 50 mM pH 7.4. ....	235
Figura 7.13. Velocidad de descomposición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 - 50 mM) por acción de Catalasa 0.05 M disuelta en tampón de elución PBS 50 mM 0.2 M imidazol 1 M NaCl, pH 8.1. ....	235
Figura 7.14. Velocidad de descomposición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 - 50 mM) por acción de Catalasa eluida 0.05 M disuelta en tampón de elución PBS 50 mM 0.2 M imidazol 1 M NaCl, pH 8.1.....	236
Figura 7.15. Velocidad de descomposición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 - 50 mM) por acción de Catalasa 0.05 M disuelta en tampón fosfato 50 mM pH 6.5. ....	236
Figura 7.16. Velocidad máxima de la reacción catalítica de la Catalasa en diferentes disoluciones. ....	238

Figura 7.17. Constante de Michaelis-Menten de la reacción catalítica de la Catalasa en diferentes disoluciones. ....	238
Figura 7.18. Constante catalítica de la reacción catalítica de la Catalasa en diferentes disoluciones. ....	239
Figura 7.19. Velocidad de descomposición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 mM por acción de Catalasa 0.05 M disuelta en tampón fosfato 50 mM 1M NaCl, con diferentes concentraciones de imidazol (0.01-0.25 M).....	241
Figura 7.20. Velocidad máxima de reacción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 mM frente a la concentración de imidazol presente en la muestra.....	242
Figura 7.21. Velocidad de descomposición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 mM por acción de Catalasa 0.05M disuelta en tampón fosfato 50 mM pH 7.66, con diferentes concentraciones de NaCl (0 -2 M). ....	244
Figura 7.22. Velocidad de reacción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 mM frente a la fuerza iónica presente en la muestra.....	244
Figura 7.23. Valor de pH para cada disolución con diferentes concentraciones de imidazol. ....	245
Figura 7.24. Valor de pH para diferentes disoluciones de Catalasa 0.05 M en tampón PBS 50 mM (sin NaCl ni KCl), con diferentes concentraciones de NaCl. ....	246
Figura 7.25. Velocidad de descomposición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 mM por acción de Catalasa 0.05 M disuelta en tampón fosfato 50 mM 1M NaCl, con diferente pH.....	247
Figura 7.26. Velocidad máxima enzimática de descomposición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 mM por acción de Catalasa 0.05M disuelta en tampón fosfato 50 mM 1M NaCl, con diferente pH. ....	247
Figura 7.27. Velocidad máxima de la reacción catalítica de la Catalasa en diferentes disoluciones. ....	252
Figura 7.28. Constante de Michaelis-Menten de la reacción catalítica de la Catalasa en diferentes disoluciones. ....	252

---

Figura 7.29. Constante catalítica de la reacción catalítica de la Catalasa en diferentes disoluciones. ....	253
Figura 7.30. Resultado del Western-Blott realizado con diferentes disoluciones de Catalasa. De izquierda a derecha: a) Catalasa desnaturalizada en tampón de adsorción, b) Catalasa eluida en el tampón de elución, c) Catalasa en el tampón de adsorción....	260
Figura 7.31. Representación de $\text{Log}(P_M)$ frente a $R_f$ , suponiendo que las cuatro bandas corresponden a moléculas compuestas por 1, 2, 3 y 4 subunidades de Catalasa. ....	261
Figura 7.32. Disminución de la actividad de la Catalasa de <i>Sarotherodon mossambicus</i> con la concentración de iones metálicos [206]. ....	263
Figura 8.1. Esquema de la instalación utilizada en el balance de materia. ....	270
Figura 8.2. Esquema de la instalación donde se muestra el volumen de control (V.C.) al que se le aplica el balance de materia a la cantidad de proteína. ....	271
Figura 8.3. Esquema de la instalación donde se muestra el volumen de control (V.C.) al que se le aplica el balance de materia a la cantidad de proteína. ....	272
Figura 8.4. Esquema de la instalación donde se muestran las variables que intervienen en el balance de materia a la cantidad de proteína. ....	273
Figura 8.5. Concentración de proteína (mg/mL) en el tanque de agitación a lo largo del tiempo (h). ....	275
Figura 8.6. Concentración de proteína adsorbida en el monolito (mg/mL) a lo largo del tiempo (h). ....	275
Figura 8.7. Representación de la concentración de proteína (mg/mL) a diferentes alturas del monolito (cm) a lo largo del proceso de adsorción en el monolito. ....	276
Figura 8.8. Esquema de la instalación utilizada, donde $C_p$ es la concentración de proteína en el tanque de agitación a lo largo del tiempo. ....	280
Figura 8.9. Cinética de adsorción en Batch. ....	287

Figura 8.10. Estimación de Parámetros de gPROMS a partir de los datos de la cinética de adsorción en Batch.....	289
Figura 8.11. Isotherma de adsorción de la BSA para diferentes concentraciones de proteína. ....	290
Figura 8.12. Moles de BSA adsorbidos por gramo de adsorbente seco para la adsorción de BSA en un Monolito (línea roja) y un Batch (línea azul), en las mismas condiciones (Tabla 8.5). ....	293
Figura 8.13. Esquema del monolito que se ajusta al modelo de canales paralelos. ....	297
Figura 8.14. Representación del módulo de Thiele ( $\Phi$ ) frente al espesor de canal (t <sub>canal</sub> , m). La línea discontinua (- -) marca el valor del módulo de Thiele a partir del cual la difusividad es el mecanismo limitante en el transporte interno, la línea roja (--) marca el espesor a partir del cual la difusividad es el mecanismo limitante. ....	307
Figura 8.15. Factor de efectividad del transporte interno frente al espesor de pared del monolito.....	310
Figura 9.1. Esquema general PAROC [216]. ....	317
Figura 9.2. Relación de compuestos considerando las rutas metabólicas básicas [7]. .	320
Figura 9.3. Relación entre la concentración de mAb producida y el tiempo de control empleado en la optimización. ....	330
Figura 9.4. Resultados de la simulación después de realizar la optimización dinámica para un cultivo durante 168h (a) estrategia de alimentación óptima, (b) concentración de mAb en el reactor batch (- -) y fed-batch (-), (c) población de células en el reactor batch (- -) y fed-batch (-) y (d) volumen del cultivo en el reactor batch (- -) y fed-batch (-).	336



## **Índice de Ecuaciones y Reacciones:**

Ecuación (4.1).....	97
Ecuación (4.2).....	97
Ecuación (4.3).....	97
Reacción (5.1).....	118
Ecuación (5.2).....	126
Ecuación (5.3).....	131
Reacción (6.1).....	149
Reacción (6.2).....	161
Ecuación (6.3).....	161
Ecuación (6.4).....	162
Reacción (6.5).....	179
Reacción (6.6).....	183
Ecuación (6.7).....	183
Ecuación (6.8).....	184
Reacción (6.9).....	199
Reacción (7.1).....	220
Ecuación (7.2).....	220
Ecuación (7.3).....	220
Ecuación (7.4).....	221

---

Ecuación (7.5).....	222
Ecuación (7.6).....	223
Ecuación (7.7).....	223
Ecuación (7.8).....	225
Ecuación (7.9).....	225
Reacción (7.10).....	229
Reacción (7.11).....	246
Ecuación (7.12).....	260
Ecuación (8.1).....	271
Ecuación (8.2).....	271
Ecuación (8.3).....	273
Ecuación (8.4).....	274
Ecuación (8.5).....	274
Ecuación (8.6).....	274
Ecuación (8.7).....	274
Reacción (8.8).....	278
Ecuación (8.9).....	278
Reacción (8.10).....	279
Ecuación (8.11).....	279
Ecuación (8.12).....	279
Ecuación (8.13).....	281
Ecuación (8.14).....	282



Reacción (8.15).....	286
Ecuación (8.16).....	298
Ecuación (8.17).....	298
Ecuación (8.18).....	299
Ecuación (8.19).....	299
Ecuación (8.20).....	299
Ecuación (8.21).....	299
Ecuación (8.22).....	299
Ecuación (8.23).....	299
Ecuación (8.24).....	299
Ecuación (8.25).....	299
Ecuación (8.26).....	299
Ecuación (8.27).....	300
Ecuación (8.28).....	300
Ecuación (8.29).....	300
Ecuación (8.30).....	300
Ecuación (8.31).....	301
Ecuación (8.32).....	301
Ecuación (8.33).....	301
Ecuación (8.34).....	301
Ecuación (8.35).....	301
Ecuación (8.36).....	303

---

Ecuación (8.37).....	304
Ecuación (8.38).....	304
Ecuación (8.39).....	304
Ecuación (8.40).....	305
Ecuación (8.41).....	307
Ecuación (8.42).....	308
Ecuación (8.43).....	308
Ecuación (8.44).....	309
Ecuación (8.45).....	309
Ecuación (8.46).....	309
Ecuación (8.47).....	309
Ecuación (9.1).....	322
Ecuación (9.2).....	322
Ecuación (9.3).....	322
Ecuación (9.4).....	322
Ecuación (9.5).....	322
Ecuación (9.6).....	322
Ecuación (9.7).....	322
Ecuación (9.8).....	323
Ecuación (9.9).....	323
Ecuación (9.10).....	323
Ecuación (9.11).....	323

Ecuación (9.12).....	323
Ecuación (9.13).....	323
Ecuación (9.14).....	323
Ecuación (9.15).....	323
Ecuación (9.16).....	323
Ecuación (9.17).....	323
Ecuación (9.18).....	323
Ecuación (9.19).....	323
Ecuación (9.20).....	323
Ecuación (9.21).....	323
Ecuación (9.22).....	323
Ecuación (9.23).....	331
Ecuación (9.24).....	331
Ecuación (9.25).....	331
Ecuación (9.26).....	331

## Nomenclatura:

$a$	Área específica	$\text{cm}^{-1}$
$A_{mon}$	Área superficial del monolito	$\text{cm}^2$
$A_{transv}$	Área transversal del monolito	$\text{cm}^2$
$A_{transv\ hueco}$	Área transversal de la fracción hueca del monolito	$\text{cm}^2$
$A_{transv\ canal}$	Área transversal de cada canal	$\text{cm}^2$
$C_{arg}$	Constante de proporcionalidad que relaciona el consumo de Glutamato con la transformación de Arginina	-
$C_{asn}$	Constante de proporcionalidad que relaciona el consumo de Glutamato con la transformación de Asparragina	-
$C_{asp}$	Constante de proporcionalidad que relaciona el consumo de Glutamato con el consumo de Aspartaro	-
$C_o$	Concentración inicial de biomolécula	$\text{mg/mL}$ ó $\text{moles/mL}$
$C$	Concentración de biomolécula en el sobrenadante del tanque agitado	$\text{mg/mL}$ ó $\text{moles/mL}$
$C_L$	Concentración de ligando	$\text{moles/mL}$
$C_P(t)$	Concentración de proteína en sobrenadante del tanque de agitación a lo largo del tiempo	$\text{mg/mL}$ ó $\text{moles/mL}$

---

$C_{salida}$	Concentración de biomolécula a la salida de la columna	mg/mL ó moles/mL
$D_{BSA}$	Difusividad de la BSA en PBS	m <sup>2</sup> /s
$D_{ef,BSA}$	Difusividad efectiva de la BSA en PBS	m <sup>2</sup> /s
$d_{canal}$	Diámetro medio del canal	µm
$F_{in}$	Caudal de entrada al Reactor	L/h
$F_{out}$	Caudal de salida del Reactor	L/h
$K$	Constante de proporcionalidad	-
$K_a$	Constante de afinidad de enlace	M <sup>-1</sup>
$k_a$	Constante cinética de adsorción	mL/(mg·h)
$k'_a$	Pseudoconstante cinética de adsorción	h <sup>-1</sup>
$k'_{a,int}$	Pseudoconstante cinética de adsorción intrínseca	h <sup>-1</sup>
$k'_{a,global}$	Pseudoconstante cinética de adsorción global	h <sup>-1</sup>
$k_{Aggr}$	Constante cinética de formación de agregados	L/mg·h
$K_{arg}$	Constante de saturación del crecimiento basado en el metabolismo de Arginina	mM
$K_{arg,lim}$	Constante de saturación de la muerte celular por la ausencia de Arginina	mM
$K_{asn}$	Constante de saturación del crecimiento basado en el metabolismo de Asparragina	mM
$K_{asn,lim}$	Constante de saturación de la muerte celular por la ausencia de Asparragina	mM

---

$K_{asp}$	Constante de saturación del crecimiento basado en el metabolismo de Aspartato	mM
$K_{asp,lim}$	Constante de saturación de la muerte celular por la ausencia de Aspartato	mM
$K_{cat}$	Constante catalítica	U/mg enzima
$k_d$	Constante cinética de desorción	$h^{-1}$
$k_{d,int}$	Constante cinética de desorción intrínseca	$h^{-1}$
$k_{d,global}$	Constante cinética de desorción global	$h^{-1}$
$K_{eq}$	Constante del equilibrio de adsorción	$cm^3/mol$
$K'_{eq}$	Pseudoconstante del equilibrio de adsorción	-
$K'_{eq,int}$	Pseudoconstante del equilibrio de adsorción intrínseco	-
$K'_{eq,global}$	Pseudoconstante del equilibrio de adsorción global	-
$k_{Frag}$	Constante cinética de formación de fragmentos	$h^{-1}$
$K_{glc}$	Constante de saturación del crecimiento basado en el metabolismo de Glucosa	mM
$K_{glc,lim}$	Constante de saturación de la muerte celular por la ausencia de Glucosa	mM
$K_{glu}$	Constante de saturación del crecimiento basado en el metabolismo de Glutamato	mM
$K_{glu,lim}$	Constante de saturación de la muerte celular por la ausencia de Glutamato	mM

---

$K_i$	Constante de equilibrio de inhibición por interacción con la Enzima	mM
$K'_i$	Constante de equilibrio de inhibición por interacción con el compuesto intermedio (ES)	mM
$K_L$	Coefficiente global de transferencia de materia film	m/s
$K_{MET}$	Constante de saturación del consumo preferencial de Glutamato	mM
$K_L$	Coefficiente global de transferencia de materia film	m/s
$K_{MET}$	Constante de saturación del consumo preferencial de Glutamato	mM
$K_S$	Constante de disociación	mM
$K_M$	Constante de Michaelis	mM
$k_0$	Constante del proceso total de transferencia de materia	1/s
$k_{-1}$	Constante cinética de la reacción inversa a la formación del compuesto intermedio enzima-sustrato	1/s
$k_1$	Constante cinética de la reacción directa a la formación del compuesto intermedio enzima-sustrato	1/(mM·s)
$k_2$	Constante cinética de la reacción irreversible para la formación del producto a partir del compuesto intermedio enzima-sustrato	1/s
$L_{canal}$	Longitud total del canal necesaria para que el área superficial del monolito sea igual al área lateral de los canales	μm

---

$L_{Total}$	Longitud total que tendría un único canal con la misma área lateral que el monolito	$\mu\text{m}$
$m_{esp}$	Cantidad de biomolécula enlazada de forma específica	mg ó moles
$m_E _0$	Cantidad de enzima inicial en el tanque de agitación	mg ó moles
$m_E _{eq}$	Cantidad de enzima en el tanque de agitación en el equilibrio	mg ó moles
$m_{EL} _{eq}$	Cantidad de enzima enlazada en la matriz en el equilibrio	mg ó moles
$m_{glyc,glc}$	Término de mantenimiento de la glicólisis a partir de Glucosa	mmol/(célula·h)
$m_{mAb,x}$	Producción de mAb	mg/(célula·h)
$m_{no\ esp}$	Cantidad de biomolécula enlazada de forma no específica	mg ó moles
$m_{ocl}$	Cantidad de biomolécula ocluida	mg ó moles
$m_P _0$	Cantidad de proteína inicial en el tanque de agitación	mg ó moles
$m_P _{eq}$	Cantidad de proteína en el tanque de agitación en el equilibrio	mg ó moles
$m_{PL} _{eq}$	Cantidad de proteína enlazada en la matriz en el equilibrio	mg ó moles
$m_{PL}$	Cantidad de proteína enlazada en la matriz	mg ó moles
$M_P(t)$	Cantidad de proteína a lo largo del tiempo	mg ó moles
$\dot{m}_{P,out}$	Flujo másico en la corriente de salida	kg/h



---

$\dot{m}_{P,in}$	Flujo másico en la corriente de entrada	kg/h
$m_{tca,glc}$	Término de mantenimiento del ciclo tca a partir de Glucosa	mmol/(célula·h)
$m_{tca,glu}$	Término de mantenimiento del ciclo tca a partir de Glutamato	mmol/(célula·h)
$M_{agua}$	Masa de agua del monolito	g
$M_{húmedo}$	Masa del monolito húmedo	g
$M_{seco}$	Masa del monolito seco	g
$M_{total}$	Masa total del monolito	g
$n_{canal}$	Número de canales del monolito	-
$P_M$	Peso molecular de la Catalasa	Da
$Q$	Caudal	m <sup>3</sup> /h
$Q_{asp,asn}$	Consumo específico de Asparragina para la producción de Aspartato	mmol/(célula·h)
$Q_{glu,arg}$	Consumo específico de Arginina para la producción de Glutamato	mmol/(célula·h)
$Q_{glyc,glc}$	Consumo específico de Glucosa para la glicólisis	mmol/(célula·h)
$Q_{MET}$	Efecto de la concentración de Glutamato en el consumo de Glucosa para la glicólisis	mmol/(célula·h)
$Q_{tca,asp}$	Consumo específico de Aspartato para el ciclo tca	mmol/(célula·h)
$Q_{tca,glc}$	Consumo específico de Glucosa para el ciclo tca	mmol/(célula·h)

---

$Q_{tca,glu}$	Consumo específico de Glutamato para el ciclo tca	mmol/(célula·h)
$Q_{x,arg}$	Consumo específico de Arginina para la producción de biomasa	mmol/(célula·h)
$Q_{x,asn}$	Consumo específico de Asparragina para la producción de biomasa	mmol/(célula·h)
$Q_{x,asp}$	Consumo específico de Aspartato para la producción de biomasa	mmol/(célula·h)
$Q_{x,glc}$	Consumo específico de Glucosa para la producción de biomasa	mmol/(célula·h)
$Q_{x,glu}$	Consumo específico de Glutamato para la producción de biomasa	mmol/(célula·h)
$R_f$	Movilidad relativa, que se define como la distancia recorrida entre la distancia total del gel	-
$r_p$	Velocidad de generación o desaparición de proteína	mg/s ó mol/s
$t_{canal}$	Espesor entre los canales del monolito	m
$V$	Volumen del Reactor	L
$v_0$	Velocidad inicial de reacción	mM/s
$V_{máx}$	Velocidad enzimática máxima	mM/s
$V_{seco}$	Volumen del monolito seco	cm <sup>3</sup>
$V_{huecos\ mon}$	Volumen total de huecos del monolito	cm <sup>3</sup>
$V_{húmedo}$	Volumen del monolito húmedo	cm <sup>3</sup>
$V_{tanque}$	Volumen del tanque de agitación	m <sup>3</sup>

---

$X_d$	Concentración de células muertas	células/L
$X_v$	Concentración de células viables	células/L
$Y_{x,glc}$	Rendimiento de la formación de biomasa a partir de Glucosa	célula/mmol
$Y_{x,glu}$	Rendimiento de la formación de biomasa a partir de Glutamato	célula/mmol
$Y_{x,asp}$	Rendimiento de la formación de biomasa a partir de Aspartato	célula/mmol
$Y_{glyc,glc}$	Rendimiento de la glicólisis a partir de Glucosa	célula/mmol
$Y_{tca,glc}$	Rendimiento del ciclo tca a partir de Glucosa	célula/mmol
$Y_{tca,glu}$	Rendimiento del ciclo tca a partir de Glutamato	célula/mmol
$z$	Coordenada longitudinal	cm
$[Aggr]$	Concentración de agregados	mg/L
$[ARG]$	Concentración de Arginina	mM
$[ARG]_{in}$	Concentración de Arginina en la corriente de entrada	mM
$[ASN]$	Concentración de Asparragina	mM
$[ASN]_{in}$	Concentración de Asparragina en la corriente de entrada	mM
$[ASP]$	Concentración de Aspartato	mM
$[ASP]_{in}$	Concentración de Aspartato en la corriente de entrada	mM

---

$[E]$	La concentración de enzima	mM
$[E_0]$	Concentración de enzima libre inicial	mM
$[ES]$	La concentración de compuesto intermedio enzima-sustrato	mM
[Frag]	Concentración de fragmentos	mg/L
$[GLC]$	Concentración de Glucosa	mM
$[GLC]_{in}$	Concentración de Glucosa en la corriente de entrada	mM
$[GLU]$	Concentración de Glutamato	mM
$[GLU]_{in}$	Concentración de Glutamato en la corriente de entrada	mM
$[I]$	Concentración del inhibidor	mM
$[LAC]$	Concentración de Lactato	mM
$[mAb]$	Concentración de mAb	mg/L
$[mAb_{Total}]$	Concentración total de anticuerpos monoclonales, agragados y fragmentos.	mg/L
$[S]$	Concentración de sustrato ( $H_2O_2$ )	mM

**Letras griegas:**

$\alpha$	Factor de corrección para la inhibición por interacción con la enzima	-
$\alpha'$	Factor de corrección para la inhibición por interacción con el compuesto intermedio (ES)	-
$\beta$	Parámetro de la Ecuación de Tronconi	-
$\varepsilon$	Porosidad del monolito	-
$\eta$	Rendimiento ó Factor de eficacia	-
$\mu$	Velocidad de crecimiento de las células ó Viscosidad del fluido que atraviesa el canal	$\text{h}^{-1}$ $\text{kg/ m}\cdot\text{s}$
$\mu_d$	Velocidad de muerte celular	$\text{h}^{-1}$
$\mu_{d,max}$	Velocidad máxima de muerte celular	$\text{h}^{-1}$
$\mu_{max}$	Velocidad de crecimiento máximo de las células	$\text{h}^{-1}$
$\rho$	Densidad del fluido que traviesa el canal	$\text{kg/m}^3$
$\rho_{aparente}$	Densidad aparente del monolito	$\text{g/cm}^3$
$\rho_{real}$	Densidad real del monolito	$\text{g/cm}^3$
$v$	Velocidad del fluido a través del canal	$\text{m/s}$
$\Phi$	Módulo de Thiele	-

---

## Números adimensionales:

$Sh$	Número de Sherwood
$Gz$	Número de Graetz
$Re_{canal}$	Número de Reynolds del canal
$Sc$	Número de Schmidt

## Definiciones:

APS	Persulfato de amonio
BHb	Hemoglobina Bovina
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CM-Asp	Ácido aspártico carboximetilado
ConA	Concanavalina A
E	Enzima libre
ES	Compuesto intermedio enzima-sustrato
EDMA	Etilenglicol dimetacrilato
EL	Enzima enlazada a la matriz
ESEM	Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental
EVAL	Etilenvinilalcohol
GMA	Glicidil metacrilato
HETP	Altura de plato equivalente
HIC	Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

HLB	Balance hidrófilo-lipófilo
HSA	Albúmina de Suero Humano
HSAB	Ácidos y Bases Fuertes y Débiles
IDA	Ácido iminodiacético
IEC	Cromatografía de Intercambio Iónico
IgG	Immunoglobulina G
IgY	Immunoglobulina Y
IMAC	Cromatografía de Afinidad con Iones Metálicos Inmovilizados
mAb	Anticuerpo monoclonal
MIT	Transferencia de iones metálicos
NAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
NTA	Ácido nitrilotriacético
GS-NSO	Línea celular de ratón
O/W	Emulsión aceite en agua
P	Proteína libre ó producto de la reacción enzimática
PL	Proteína enlazada a la matriz
PBS	Tampón fosfato salino
PDB	Banco de Datos de Proteínas
PEO	Polióxido de etileno
PEVA	Polietilenvinilalcohol
PIT	Temperatura de inversión de fases
SAP	Glicoproteína componente humana serum amiloide

---

TCA	Ciclo del ácido Tricarboxílico
TED	Tri(carboximetil)etilendiamina
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TMOS	Tetrametoxilano
TREN	Tris 2-aminoetilamina
TRIS	Hidroximetilaminometano
W/O	Emulsión agua en aceite



## Resumen:

Dentro de los procesos *downstream* de separación de proteínas, la cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC) es una técnica muy utilizada por ser una alternativa más económica que la cromatografía de afinidad, y por su facilidad de escalado.

Tradicionalmente, estos procesos de separación de biomoléculas se llevan a cabo en columnas empaquetadas con partículas porosas. Sin embargo, este tipo de matrices presenta inconvenientes a escala industrial debido a que presentan una alta pérdida de carga, lo que hace que sea necesario la utilización de columnas de gran diámetro y altura reducida.

Con el fin de solventar este problema, en nuestro grupo de investigación se desarrolló un monolito cerámico recubierto de Agarosa D5, que aprovecha la resistencia mecánica del esqueleto cerámico y permite la utilización de caudales elevados sin generar problemas de pérdida de carga. Sin embargo, este monolito presenta una baja área superficial.

El objetivo del presente trabajo consiste en el **desarrollo y caracterización** de un **monolito macroporoso** válido para **cromatografía IMAC** que tenga una elevada área superficial y permita el flujo de fluidos con caudales elevados sin generar problemas de pérdida de carga.

En primer lugar, se **optimizó el proceso de formación** del monolito de agarosa superporosa y se **caracterizó** este monolito mediante un método de tratamiento de imagen utilizando el *software ImageJ*, con el que se estudiaron los parámetros más importantes del mismo. Los resultados obtenidos se validaron mediante la utilización de otros métodos convencionales, comprobándose que este método de tratamiento de imagen es válido.

Este monolito de Agarosa Superporosa presenta buenas propiedades tales como un **diámetro de Sauter de 68.63  $\mu\text{m}$**  que facilita el flujo convectivo, un área superficial

---

moderadamente alta (**779.53 cm<sup>2</sup> ó 0.4884 m<sup>2</sup> / g de monolito seco**), un valor de **porosidad del 33.79±4.03%** que está en concordancia con la porosidad deseada (entre 25-40%), una **capacidad de swelling del 94.8 ± 2.3 %**, una **densidad real de 0.80 ± 0.02 g cm<sup>-3</sup>**, una **densidad aparente de 0.04 ± 0.03 g cm<sup>-3</sup>**, un **volumen de superporo de 1.50 mL** y un **volumen de poro no convectivo de 0.65 mL**. Además, se determinó la **pérdida de carga** generada, la cual presenta valores muy bajos (<0.4MPa para un caudal de 50 mL/min) teniendo en cuenta las dimensiones del soporte cromatográfico y el flujo volumétrico empleado.

Posteriormente, se **modificó su estructura química** para su utilización en cromatografía IMAC, activándose con el brazo espaciador 1,4-butanodioldiglicidiléter, y fijándose el agente quelante ácido iminodiacético (IDA) mediante un enlace covalente, y utilizándose Cu<sup>2+</sup> como ligando.

A continuación, y antes de realizar los experimentos de validación, se realizó un **estudio bioinformático** para predecir si se va a producir una interacción entre las biomoléculas tipo escogidas (BSA y Catalasa) y el ligando, y qué tipo de enlace se va a formar. Mediante dicho estudio, se determinó que el rendimiento de adsorción y de elución es mayor para la BSA, y que el tiempo necesario del proceso es menor. Además, se concluyó que la BSA forma enlaces sencillos con el Cu<sup>2+</sup> inmovilizado, mientras que la Catalasa es más probable que forme enlaces dobles lo que, junto con un mayor impedimento estérico, hace que el rendimiento de elución de la BSA sea mayor que el de la Catalasa. Estos resultados se corroboraron posteriormente mediante los experimentos de adsorción-elución realizados.

Se estudió la presencia de interacciones no específicas con el monolito activado y sin activar, siempre en ausencia de Cu<sup>2+</sup> y se demostró que este monolito no presenta interacciones no específicas con la matriz.

Una vez que el monolito presentaba las propiedades necesarias para su utilización en **Cromatografía IMAC** y que se finalizaron los estudios previos de caracterización, se **validó** su utilización como soporte cromatográfico utilizando **BSA** como proteína tipo y **Catalasa** como enzima utilizada habitualmente en este tipo de procesos. Con el fin de poder comparar la influencia del tipo de biomolécula en los procesos de adsorción

y elución, y realizar una comparación válida entre este soporte cromatográfico y el monolito cerámico previamente utilizado en nuestro grupo, se decidió mantener constantes las condiciones experimentales empleadas.

Se realizaron los experimentos de adsorción-elución de la **BSA**, y se determinó que este monolito ha sido **reutilizado hasta 20 ciclos sin ser regenerado** y con un **rendimiento de adsorción constante (89.65%)**. El **tiempo** necesario para realizar el proceso de **adsorción** es prácticamente constante y presenta un valor de unos **75 min**.

La elución de la **BSA** se realizó utilizando un agente competitivo (imidazol), y se observó que todos los **picos de elución** tienen la **misma forma**, y el **tiempo** necesario para esta etapa es el mismo (unos 30 min en total). Además, utilizando un **caudal de 1.5 mL/min**, la cantidad de proteína recuperada se puede considerar prácticamente constante en todos los ciclos y presenta un valor de **81.93%**. Se estudió la influencia del **caudal de elución**, determinándose que se recupera **mayor cantidad de proteína** hasta un **valor máximo de rendimiento de elución del 99%** para un **caudal de 4 mL/min**.

Una vez finalizada la validación de la utilización de este nuevo soporte en procesos de cromatografía IMAC con BSA, se procedió a verificar su utilidad en la purificación de la enzima **Catalasa**, donde se realizaron ciclos de adsorción elución, a partir de los cuales se determinó que es posible utilizar el monolito durante **14 ciclos** sin necesidad de regenerar el soporte. Sin embargo, teniendo en cuenta factores económicos, a partir del ciclo 14 es más rentable regenerar la columna y comenzar el proceso desde el principio.

Además, las curvas de equilibrio de adsorción y el rendimiento de adsorción con el número de reusos muestran que **la capacidad de adsorción permanece constante (67.02%** a un caudal de 1.5 mL/min), pero que **el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio aumenta con el número sucesivo de reusos** (desde **80 min** (n=1) hasta **150 min** (n=14) para un caudal de 1.5 mL/min). Esto se podría deber a que algunos centros activos pueden no estar disponibles por la presencia de moléculas de enzima que no se han eluido de forma exitosa o a la presencia de imidazol que no ha sido retirado de forma efectiva. Por ello, al aumentar el número de reutilización, la enzima necesita más

---

**tiempo para encontrar un centro activo disponible.** Por tanto, el **tiempo** necesario para realizar el proceso de **adsorción** varía con el número de reutilización entre **80 min** para el primer ciclo y **150 min** para el ciclo número 14, como consecuencia de la presencia de Catalasa no eluida en el ciclo anterior.

Se realizó el proceso de elución de la enzima utilizando un agente competitivo (imidazol), donde se observó que, en todos los ciclos, los **picos de elución** tienen la **misma forma**, y el **tiempo** necesario para esta etapa es el mismo (unos **40 min** en total). Utilizando un **caudal de 1.5 mL/min**, la cantidad de proteína recuperada se puede considerar prácticamente constante en todos los ciclos y presenta un valor de **67.39 %**. Se estudió la influencia del **caudal utilizado** en el **rendimiento de elución**, determinándose que **al aumentar éste se recupera mayor cantidad de proteína** ya que se mejora la transferencia de materia, y el equilibrio de elución se desplaza hacia la enzima libre. El valor del rendimiento máximo de elución es de **80.02%** para un caudal de 3 mL/min.

Una vez finalizados los estudios de adsorción-elución con la enzima Catalasa se realizó un estudio de actividad con el fin de determinar la causa de una disminución de la misma, concluyéndose que **la Catalasa no es una enzima apropiada para su purificación mediante cromatografía IMAC** cuando se pretende purificar para su utilización en etapas posteriores como enzima, ya que en la etapa de elución su estructura se ve dañada de forma importante, separándose en subunidades. Sin embargo, una alternativa interesante es la inmovilización de Catalasa, ya que mejora los parámetros de la cinética enzimática respecto a los valores de la enzima libre.

Una vez finalizado el estudio de adsorción-elución de estas biomoléculas en columna, se caracterizó el sistema de la columna mediante un **balance de materia dinámico a cada punto de la instalación** con el fin de conocer la concentración de proteína en cada momento, obteniéndose la distribución de proteína en el interior del monolito.

Por último, se estudió la **transferencia de materia del proceso global de adsorción**, obteniéndose los datos de resistencia a la transferencia externa ( $K_L \cdot a = 0.001 \text{ s}^{-1}$ ), interna ( $\eta k'_{a,int} = 2.507 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) y cinética ( $k'_{a,int} = 8.011 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ), concluyéndose que

no hay una etapa limitante sino que la resistencia global es consecuencia de las tres resistencias.

Realizando una comparación, las propiedades cromatográficas de esta nueva matriz presenta grandes mejoras en comparación con el monolito cerámico en términos de rendimiento de adsorción, cantidad de proteína total recuperada, tiempo necesario para cada etapa y número de reutilizaciones, lo que hace que sea un soporte interesante en este tipo de aplicaciones.

Mediante el presente trabajo se ha demostrado la viabilidad de este monolito como soporte cromatográfico para cromatografía IMAC, fácilmente escalable y con propiedades y rendimientos mejorados y apropiados para su utilización en cromatografía preparativa.



---

## Abstract:

Among all the *downstream* protein separation processes, Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) is a widely used technique because it is cheaper than Affinity Chromatography and because it is easy to scale up for industrial uses.

Traditionally, these biomolecular separation processes are performed in packed bead columns using porous particles. However, this kind of matrix presents some important drawbacks at industrial scale due to high back pressure, leading to a large diameter and low height column design.

In order to solve this problem, our research group developed a ceramic monolith coated with Agarose D5, which takes advantage of the mechanical resistance strength inherent to the ceramic structure and allows a high flow rate through the structure without back pressure problems. However, the main drawback of this monolith is its low superficial area.

The objective of the present work is the **development** and **characterization** of a macroporous monolith valid for **IMAC Chromatography**, with high superficial area and allowing a high flow rate through it without back pressure problems.

Firstly, the monolith formation process was **optimized** and the **characterization** of the monolithic support was carried out by an image processing method using the software *ImageJ*. The obtained results were validated by using other conventional methods to confirm validity of this characterization method.

This superporous Agarose Monolith has good chromatographic properties with a **Sauter diameter of 68.63  $\mu\text{m}$**  allowing a convective flow, a relatively high superficial area (**779.53  $\text{cm}^2$  or 0.4884  $\text{m}^2 / \text{g}$  dried monolith**), a **porosity value of 33.79 $\pm$ 4.03%**, which falls within is the desired porosity range (25-40%), a **swelling capacity of 94.8  $\pm$  2.3 %**, a **real density of 0.80  $\pm$  0.02  $\text{g cm}^{-3}$** , an **apparent density of 0.04  $\pm$  0.03  $\text{g cm}^{-3}$** , a **superporous volume of 1.50 mL** and a **non convective porous volume of 0.65 mL**. Furthermore, the **back pressure** was measured, concluding that

---

the generated value is very low (<0.4MPa para un caudal de 50 mL/min), taking into account the support dimensions and the flow rate utilized.

Later on, the **chemical structure of the monolith was modified** in order to be utilized in IMAC Chromatography. This was achieved through activating its structure by adding a spacer arm of 1,4-butenodiol diglycidyl ether, and linking iminodiacetic acid (IDA) as chelating agent with a covalent binding, and immobilizing  $\text{Cu}^{2+}$  as ligand.

After that, and before the validation experiments were carried out, a bioinformatic study was performed to predict if some interaction would occur between the biomolecules (BSA y Catalasa) and the ligand, and what kind of binding they will establish. With this study, it was concluded that the adsorption and elution yields will be higher for BSA and it will need lower time to reach the adsorption equilibrium. Furthermore, it was determined that BSA protein will bind the ligand by simple binding while Catalase will probably form double ones. This, in addition to the fact that it has a higher steric hindrance leads to a lower elution yield in Catalase than in BSA. These results were corroborated by later experimental findings from adsorption-elution experiments.

Non-specific interactions between the activated and non-activated monolithic supports (both without  $\text{Cu}^{2+}$ ) were studied, demonstrating that this monolith does not present non-specific interactions with the matrix.

Once the monolith had the adequate properties for IMAC utilization, and after the previous studies performed, its **validation for IMAC Chromatography** was carried out using BSA as a protein type and Catalase as enzyme (two standard biomolecules used for testing this type of process). The experimental conditions were chosen to be constant in order to compare the influence of the kind of biomolecule used in the adsorption and elution processes and to compare this monolithic support with the ceramic monolith used before in our research group.

Adsorption and elution experiments with **BSA** were carried out, and this monolith was **reutilized 20 times** without any regeneration step and with an **adsorption yield** that can be considered **constant (89.65%)**. The **time** needed for the **adsorption** process is considered to be nearly constant and has a value of **75 min**.



**BSA** elution was performed using imidazole as a competitive agent, and showing the same shape of the elution peaks, where the **time** needed for this step is the same (30 min for the overall step). Furthermore, using a **flowrate** of **1.5 mL/min**, the amount of recovered protein can be considered as constant in all the reutilizations, with an elution yield of **81.93%**. The influence of the **elution flowrate** was examined, and the findings showed that the **maximum amount of recovered protein (99%)** was obtained with a **flowrate** of **4 mL/min**.

After the validation of the utilization of this new monolith in IMAC chromatography with BSA, the Catalase purification was verified. Adsorption-elution experiments were carried out during 14 cycles without matrix regeneration. However, taking into account economic factors, from cycle 14 onward, it is likely more advantageous to regenerate the column and restart the whole process.

In addition, the equilibrium curves for the adsorption process and the adsorption yield for different levels of reutilizations show that the adsorption capacity remains constant (**67.02%** using a flow rate for 1.5 mL/min), but the time needed for reaching equilibrium is higher with the number of reutilization, (from **80 min** (n=1) to **150 min** (n=14) for a flow rate of 1.5 mL/min. These behaviours can be explained due to the fact that some active sites could not be available as a consequence of the presence of enzyme molecules that have not been effectively eluted. Therefore, with higher numbers of reutilization come increases in time needed to find a free active site. So the time needed for the adsorption process changes with the reutilization number from 80 min for the first cycle to 150 min for the 14<sup>th</sup> cycle, as a consequence of non-eluted Catalase for the previous cycle.

The eluted process of the enzyme was performed using a competitive agent (imidazole), where it can be observed that all the **elution peaks** have the same shape, and the **time** needed for the elution step is the same (around **40 min** in total). Using a **flow rate** of **1.5 mL/min**, the amount of the eluted enzyme can be considered as a constant in all the cycles with an elution yield of **67.39 %**.

Furthermore, the influence of the **elution flowrate** was studied, concluding that the **maximum amount of recovered protein (80.2%)** was obtained during the

---

maximum flow rate evaluated, **3 mL/min**, attributable to improvements in mass transfer and displacement of equilibrium to the eluted enzyme.

Once the adsorption-elution experiments were finished, the activity of the Catalase enzyme was evaluated in order to clarify the reason for its decline, concluding that Catalase is not an appropriate enzyme for IMAC purification when the aim is to use it in subsequent processes. Because of the elution step its structure is critically altered and divided into subunits. However, an interesting alternative is Catalase immobilization, that improves the enzymatic kinetic parameters compared with free enzyme values.

After the adsorption-elution process of the biomolecules in the column, the system was characterized with a dynamic mass balance to all installation in every moment, obtaining the protein distribution inside the monolith.

Finally, the **mass transfer of the overall adsorption process** was performed, where the resistances to the external transfer ( $K_L \cdot a = 0.001 \text{ s}^{-1}$ ), internal transfer ( $\eta k'_{a,int} = 2.507 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) and kinetic transfer ( $k'_{a,int} = 8.011 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) were obtained, concluding that there is not a limiting step but rather the overall resistance is a consequence of the three resistances.

Compared with the ceramic monolith properties, this new monolith presents some advantages in terms of adsorption, total amount of protein recovered, time needed for each step and number of reutilizations. Consequently this newly proposed monolith should be considered for use in a variety of applications as biotechnology products purification or enzyme immobilization.

This work demonstrated the viability of a newly proposed monolith for IMAC chromatographic support that is easily scalable, possesses improved properties and yields, and is highly suitable for preparative chromatography.





# **Capítulo 1.**

## **Introducción**



En los procesos industriales de producción de compuestos biológicos una de las etapas que encarecen el proceso es la de purificación, ya que por exigencias legales han de tener un grado de pureza elevado.

Así, en los procesos de obtención de biomoléculas tales como proteínas, enzimas y anticuerpos monoclonales, su coste viene condicionado por la separación y purificación, que representa hasta el 70-80% del coste total del proceso [1].

Por ello, es imprescindible la búsqueda de mayor eficacia en dichos procesos, así como una mejora en el rendimiento de la purificación y la bioactividad, además de una reducción del tiempo total de proceso necesario.

Las técnicas más utilizadas en la separación de biomoléculas se pueden resumir en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1. Resumen de algunas de las técnicas más utilizadas en la separación de biomoléculas.**

<b>Técnica de separación</b>	<b>Tipo de operación de separación</b>	<b>Propiedad en que se basa la separación</b>	<b>Referencia</b>
<b>Separación de membrana</b>	Microfiltración Ultrafiltración Diálisis	Tamaño	[2]
<b>Centrifugación</b>	Bandas de densidad constante Depósitos de no equilibrio	Densidad	[2]
<b>Extracción</b>	Extracción de fluidos Extracción líquido-líquido	Solubilidad	[3, 4]
<b>Precipitación</b>	Precipitación fraccional	Cambio en la solubilidad	[5]

**Tabla 1.1. Resumen de algunas de las técnicas más utilizadas en la separación de biomoléculas (Continuación).**

<b>Técnica de separación</b>	<b>Tipo de operación de separación</b>	<b>Propiedad en que se basa la separación</b>	<b>Referencia</b>
<b>Cromatografía</b>	Intercambio iónico	Carga	[6]
	Filtración en gel	Tamaño	[6]
	Afinidad	Interacción específica	[6, 7]
	Interacción hidrofóbica	Hidrofobicidad	[6]
	Adsorción	Estructura molecular	[6]
	IMAC	Interacción con metales	[6]

Dentro de estas técnicas, una de las más empleadas para la purificación de proteínas es la cromatografía de afinidad, ya que consigue una separación altamente selectiva con una alta pureza en una única etapa de separación [8].

La cromatografía de afinidad es uno de los tipos de cromatografía líquida más selectiva y versátil [9, 10]. Se basa en interacciones altamente específicas y reversibles entre la biomolécula de interés y un ligando específico inmovilizado en el soporte cromatográfico, tal como se observa en la Figura 1.1.





**Figura 1.1. Fundamento de la cromatografía de afinidad.**

La característica fundamental de este tipo de cromatografía es la utilización de ligandos altamente específicos hacia la proteína de interés [7, 9] siendo, por tanto, un factor importante ya que determina el rendimiento de la separación.

La cromatografía de afinidad puede dividirse en varios tipos dependiendo del tipo de ligando empleado (Tabla 1.2):

**Tabla 1.2. Clasificación de algunos tipos de cromatografía de afinidad, según el tipo de ligando utilizado [7, 9].**

Tipo de cromatografía de afinidad	Tipo de ligando inmovilizado	Biomolécula purificada	Referencia
Cromatografía de inmuoafinidad	Anticuerpos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hormonas</li> <li>• Enzimas</li> <li>• Péptidos</li> <li>• Virus</li> </ul>	[11]
Cromatografía de afinidad con Proteína A o Proteína G	Proteína A Proteína G	Diferentes inmunoglobulinas de distintas especies	[12]

**Tabla 1.2. Clasificación de algunos tipos de cromatografía de afinidad, según el tipo de ligando utilizado[7, 9] (Continuación).**

<b>Tipo de cromatografía de afinidad</b>	<b>Tipo de ligando inmovilizado</b>	<b>Biomolécula purificada</b>	<b>Referencia</b>
Cromatografía de afinidad con Lecitina	Lecitina	Algunos residuos de carbohidratos presentes en plantas y animales, y algunos microorganismos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicoproteínas</li> <li>• Glicopéptidos</li> <li>• Glicolípidos</li> <li>• Oligosacáridos</li> </ul>	[11]
Cromatografía de afinidad con boronatos	Boronato	A pH básicos, grupos cis-diol: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Compuestos que contienen carbohidratos.</li> </ul>	[11]
Cromatografía de afinidad con colorantes	Colorantes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteínas</li> <li>• Enzimas</li> </ul>	[12]
Cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados	Agente quelante + Metal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteínas de membrana</li> <li>• Proteínas His-tagged</li> <li>• Proteínas recombinantes</li> <li>• Proteínas fosforiladas</li> <li>• Proteínas con Histidina en su superficie</li> </ul>	[13]

Por tanto, según las características bioquímicas del compuesto que se quiera purificar será necesaria la aplicación de algunos de los diferentes tipos de cromatografía de afinidad descritas.

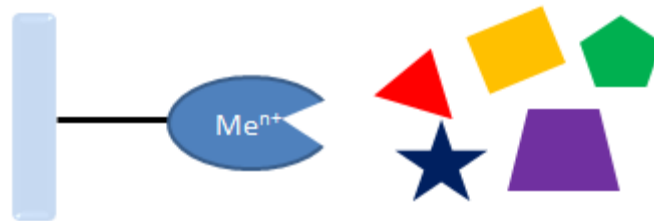
Por otra parte, la desventaja más importante de esta técnica es el elevado coste de los ligandos específicos [14].

Dentro de los tipos de cromatografía de afinidad existe una técnica más económica y adaptable, la cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (*Immobilized Metal Affinity Chromatography* o IMAC).

Este tipo de cromatografía aprovecha la afinidad que presentan algunos aminoácidos superficiales de las proteínas, como histidinas y triptófanos, por los iones metálicos inmovilizados en la matriz cromatográfica [15].

Dado que la interacción entre el ion inmovilizado y la cadena lateral del aminoácido tiene carácter reversible, esta técnica puede ser utilizada para adsorber la proteína y después recuperarla utilizando condiciones suaves [16].

Por lo tanto, la cromatografía IMAC no utiliza interacciones con ligandos específicos sino que se basa en la interacción entre algunas moléculas en la superficie de la proteína capaces de compartir electrones con los iones metálicos inmovilizados en el soporte cromatográfico.



**Figura 1.2. Esquema del fundamento de la cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC).**

En la Tabla 1.3 se muestra una comparación entre la técnica IMAC y otras técnicas basadas en principios de adsorción.

**Tabla 1.3 Comparación entre procesos basados en la adsorción [16].**

<b>Propiedad</b>	<b>Iones metálicos inmovilizados (IMAC)</b>	<b>Afinidad</b>	<b>Intercambio iónico (IEC)</b>	<b>Interacción hidrofóbica (HIC)</b>
<b>Capacidad de separación</b>	Alta (media)	Baja	Alta	Alta (media)
<b>Recuperación de la proteína</b>	Alta	Media	Alta	Media
<b>Carga de la proteína</b>	Suave	Suave	Suave	A veces duro
<b>Condiciones de elución</b>	Suave	Duro	Suave	Suave
<b>Recuperación del ligando tras la regeneración</b>	Completa	Incompleta	Completa	Incompleta
<b>Selectividad</b>	Media-alta	Alta	Baja-media	Baja-media
<b>Coste</b>	Bajo	Alto	Bajo	Bajo

En esta comparación (Tabla 1.3) se puede observar que las propiedades de la cromatografía IMAC son intermedias entre las propiedades de la cromatografía de afinidad y el resto de cromatografías en las que se adsorben los compuestos que se quieren separar [16].

De todo lo anterior se puede deducir que la cromatografía IMAC es una de las técnicas más eficaces para la separación y purificación de proteínas tanto a escala de laboratorio como a gran escala [17, 18], debido a que proporciona una alta capacidad de adsorción en el soporte comparado con otras técnicas cromatográficas [17, 18], presenta facilidad de escalado, posee gran capacidad de regeneración de la matriz cromatográfica pudiendo ser reutilizada cientos de veces sin la pérdida de las características

cromatográficas [19] y, por último, la elución utilizada en esta técnica no es desnaturalizante [13, 17-19].

Por todos estos motivos, la cromatografía IMAC constituye una técnica importante para la purificación de todo tipo de proteínas, tanto naturales como recombinantes [20].

Además, los pequeños quelatos metálicos utilizados como ligandos son estables bajo un amplio rango de condiciones de disolventes y temperaturas, lo que hace que puedan ser reutilizados un gran número de veces sin mostrar pérdida de su capacidad de separación [17].

Aunque las primeras aplicaciones de la cromatografía IMAC la consideraban una técnica de baja selectividad, en la actualidad se ha demostrado que puede ser utilizada para separaciones altamente selectivas. Por ejemplo, es posible separar once péptidos de ocho cadenas laterales similares (angiotensinas) utilizando un gradiente de pH [21].

Las matrices cromatográficas que se emplean habitualmente son columnas de relleno o de lecho fijo, donde se emplean partículas porosas pequeñas para aumentar la superficie disponible para la adsorción, lo que hace que la transferencia de materia hacia el interior sea más rápida, disminuyendo el tiempo total de proceso.

Sin embargo, este tipo de soporte presenta un gran inconveniente a escala industrial: la pérdida de carga generada es elevada. Esto aumenta los costes e impide que se puedan utilizar grandes caudales y alturas de lecho adecuadas, lo que se traduce en separaciones más largas y menos eficientes [14, 22-24].

Para hacer frente a estos problemas de pérdida de carga, en las últimas décadas se han desarrollado nuevos soportes cromatográficos que mejoran el escalado industrial y las propiedades cromatográficas del lecho [25, 26].

Dentro de estos soportes se encuentra un grupo de matrices cromatográficas (membranas y monolitos) que disminuyen la pérdida de carga sin disminuir drásticamente la superficie disponible para la adsorción, y presentan una alta capacidad de carga en comparación con otros lechos empacados tradicionales [25].

Los *monolitos* o *soportes continuos* se definen como matrices cromatográficas porosas y continuas, es decir, compuestos de una única pieza [25].

Estos soportes están diseñados para tener una estructura porosa altamente conectada, lo que permite la utilización de caudales más elevados sin que la pérdida de carga se vea comprometida. De esta forma, se consigue una separación más eficiente [27-29].

Además, el tamaño de poro puede ser optimizado para conseguir un compromiso entre el área superficial disponible para la adsorción y la pérdida de carga [25].

En general, los monolitos son más fáciles de preparar y más baratos que los lechos de relleno, y la columna cromatográfica se puede empaquetar más rápido.

Por esto, en la actualidad se están empleando monolitos en cromatografía de afinidad [14].

En la Tabla 1.4 se comparan las propiedades de los lechos fijos con los monolitos.

**Tabla 1.4. Comparación de las propiedades de los lechos particulados y los monolitos en cromatografía [6, 14, 18, 19, 30].**

<b>Característica</b>	<b>Lecho poroso</b>	<b>Monolito</b>
<b>Geometría</b>	Partículas porosas pequeñas, generalmente esféricas	Estructura porosa altamente interconectada, generalmente cilíndrica
<b>Poros</b>	Poros internos Porosidad externa	Poros optimizables, generalmente macroporos
<b>Altura de la columna a escala industrial</b>	Baja	Alta
<b>Área superficial disponible</b>	Alta	Alta

**Tabla 1.4. Comparación de las propiedades de los lechos particulados y los monolitos en cromatografía [6, 14, 18, 19, 30] (Continuación).**

<b>Característica</b>	<b>Lecho poroso</b>	<b>Monolito</b>
<b>Pérdida de carga</b>	Elevada	Baja
<b>Capacidad de separación</b>	Alta	Alta
<b>Velocidad de flujo permitida</b>	Normal	Alta
<b>Tiempo de separación</b>	Normal	Rápido
<b>Eficiencia de separación</b>	Normal	Mayor
<b>Transferencia de materia</b>	Difusión Convección	Convección predominante
<b>Escalado</b>	Difícil	Fácil
<b>Preparación</b>	Difícil	Fácil
<b>Coste</b>	Elevado	Barato
<b>Tiempo necesario para empacar el lecho</b>	Alto	Bajo

En la Tabla 1.5 se recogen algunos de los soportes nuevos empleados en cromatografía IMAC.

**Tabla 1.5. Resumen de los soportes utilizados en los últimos años en cromatografía IMAC.**

<b>Matriz</b>	<b>Funcionalización</b>	<b>Proteína</b>	<b>Referencia</b>
EVAL + 20-40 $\mu\text{m}$ lechos activados con grupos epoxi	IDA-Cu <sup>2+</sup>	BHb BSA	[31]
Poliacrilamida	IDA-Cu <sup>2+</sup>	IgY	[32]
Agarosa	IDA-Cu <sup>2+</sup>	BSA Lisozima Insulina BIgG ConA	[33]
Ni <sup>2+</sup> zeolita/ferroesfera Ni <sup>2+</sup> sílice/ferroesfera	Zeolita-Ni <sup>2+</sup>	Proteínas recombinantes (20-30 kDa) 10His-cgreGFP	[34]
Membrana nanofibrosa de PVA-co-PE	IDA-Cu <sup>2+</sup>	Lisozima de clara de huevo de pollo	[35]
Fibras PEVA	CM-Asp-Ni <sup>2+</sup> CM-Asp-Co <sup>2+</sup>	IgG	[36]
Fibras PEVA	PEVA-TREN-Cu <sup>2+</sup> PEVA-IDA-Cu <sup>2+</sup>	IgG	[37]

BHb (bovine hemoglobin), BSA (Bovine Serum Albumine), IgY (Immunoglobulin Y), ConA (Concanavalin A), IgG (Immunoglobulin G), CM-Asp (aspartato carboximetilado), PEVA (polietilenvinilalcohol), TREN (tris 2-aminoetilamina)



Sin embargo, algunos de los nuevos soportes cromatográficos desarrollados, entre los que destacan monolitos y membranas, presentan algunos inconvenientes como adsorción no específica [31, 36] y necesidad de regeneración del ligando entre ciclos [35, 36]. Además, las proteínas adsorbidas no fueron eluidas en muchos casos [31, 32], o los soportes no fueron reutilizados [31-33], lo que hace pensar que no sean adecuados para la separación a escala industrial.

Para solventar estos problemas, en nuestro grupo de investigación se desarrolló y estudió un monolito Cerámico recubierto con Agarosa D5 [38]. De esta forma, el esqueleto cerámico proporcionaba resistencia mecánica y permitía el uso de un caudal elevado sin prácticamente pérdida de carga.

Sin embargo, este monolito presentaba una baja área superficial para la adsorción de proteínas, con la consiguiente desventaja de eficiencia en la separación [38].

Por otra parte, Larsson [39] ha desarrollado un nuevo monolito de Agarosa Superporosa que presenta características atractivas para su utilización en cromatografía.

En primer lugar, su morfología macroporosa facilita la transferencia de materia, que se considera predominantemente convectiva. Además, presenta gran área superficial, lo que aumenta la superficie disponible para el acople de ligandos.

Asimismo aprovecha todas las propiedades de la Agarosa como soporte cromatográfico: estabilidad física y química, carga neutral, carácter hidrofílico, estructura abierta, capacidad de utilizarse con muchos tipos de ligando, bajo enlace no específico y estabilidad en un rango amplio de pH [40, 41].

Sin embargo, la principal desventaja de la utilización de la Agarosa Superporosa como soporte cromatográfico es su estabilidad mecánica. Pero este problema puede reducirse de forma significativa utilizando un *crosslinking* químico [41].

Este monolito de Agarosa Superporosa ha sido utilizado como soporte en cromatografía de afinidad en varios tipos de separación (Tabla 1.6), pero nunca había sido utilizado hasta ahora como matriz de cromatografía IMAC.

**Tabla 1.6. Diferentes aplicaciones del monolito de Agarosa Superporosa [42-44].**

<b>Técnica de aplicación</b>	<b>Ligando</b>	<b>Objetivo</b>
Cromatografía de exclusión por tamaños	-	Calcular HETP con BSA
Cromatografía de afinidad	NAD <sup>+</sup>	Purificación de deshidrogenasa láctica bovina
Cromatografía de afinidad	Proteína A	Purificación de IgG de ratón
Cromatografía de hidroxiapatita	hidroxiapatita	Separar BSA, lisozima y citocromo c
Electroforesis	-	Electroforesis
Cromatografía de afinidad	Cibacron Blue 3GA	Purificación de deshidrogenasa láctica de corazón bovino
Inmovilización enzimática	B-galactosidasa	Producción de leche sin lactosa

NAD: Dinucleótido de nicotinamida y adenina.

Se puede concluir que la mejora de la cromatografía IMAC para la purificación de proteínas es un área de investigación activo. Aunque existen numerosos estudios que dicen haber optimizado el soporte y los ligandos para cromatografía IMAC, sigue habiendo relativamente pocos trabajos donde esta técnica haya sido empleada en purificación de proteínas a gran escala [45-48]. Esto se debe, principalmente, a la pérdida potencial de ión metálico de la matriz, lo que provoca la presencia de iones metálicos en las fracciones eluidas que interfieren en la pureza, vida útil y actividad de la proteína [49-51].

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente descrito, esta tesis doctoral propone un nuevo soporte cromatográfico, alternativo a lo utilizado hasta ahora en cromatografía IMAC. Este nuevo soporte es válido a escala industrial, y solventa las principales

desventajas de las matrices empleadas a gran escala: pérdida de carga, caudales de operación bajos, largos tiempos de proceso, baja longitud de columna, etc.

Para ello, se optimizará la formación de la matriz cromatográfica y se estudiarán sus características principales, así como los parámetros necesarios para validar la utilización de este soporte en la aplicación deseada.



## **Capítulo 2.**

### **Objetivos**



Como se mencionó en la introducción, la forma convencional de trabajar en cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) es, al igual que en cromatografía de afinidad, utilizar partículas porosas como matriz cromatográfica.

Sin embargo, aunque estos soportes aportan ventajas como una alta área superficial disponible para el enlace proteína-ligando, presentan problemas de pérdida de carga al operar a gran escala, además de resistencia al transporte de materia, lo que limita en gran medida el caudal de operación y aumenta el tiempo de proceso.

En un intento de solventar estos problemas, en nuestro grupo de investigación se desarrolló previamente un monolito cerámico recubierto con Agarosa D5 [38], aprovechando la resistencia mecánica del esqueleto cerámico empleado. Este monolito permitió operar a caudales relativamente elevados sin generar problemas de pérdida de carga [52], así como purificar proteínas como BSA y la enzima Catalasa con buenos rendimientos de recuperación [38, 53].

Sin embargo, este monolito cerámico disponía de una baja área disponible para la adsorción y, como consecuencia, presentaba un bajo rendimiento de adsorción. Además, la eficiencia de separación disminuía al reutilizar el monolito, por lo que a partir del quinto ciclo de uso era conveniente su regeneración.

El objetivo principal de este trabajo consistirá en **desarrollar un soporte macroporoso válido para su utilización en purificación de proteínas y enzimas mediante cromatografía IMAC.**

Para ello, en primer lugar se **optimizará la formación del monolito** de agarosa superporosa desarrollado por Larsson [39], y utilizado previamente en otros tipos de cromatografía (nunca IMAC), de forma que sus propiedades sean las más adecuadas para la aplicación deseada.

Posteriormente, se **caracterizará** este monolito estudiando los parámetros más importantes en cromatografía de afinidad y se **modificará químicamente** para su utilización en cromatografía IMAC. En este caso se activará y añadirá 1,4-butanodioldiglicidiléter como brazo espaciador, ácido iminodiacético (IDA) como agente quelante y  $\text{Cu}^{2+}$  como ligando. **La proteína tipo que se estudiará** para validar la

aplicación de este monolito será la BSA, y posteriormente **se estudiará la adsorción** de la catalasa, así como la **pérdida de actividad enzimática** producida por el proceso de adsorción y posterior elución.

Además, se determinará **la eficiencia del adsorbente** en sucesivos ciclos de reutilización sin necesidad de regenerar el soporte, se estudiará **la cinética de adsorción**, se realizará un **balance de materia dinámico a cada punto de la instalación** y **se determinará la transferencia de materia en el proceso de adsorción**. De esta forma se obtendrán los datos necesarios para poder realizar el diseño del equipo a escala industrial.

Mediante este trabajo se espera demostrar la viabilidad de este monolito como soporte cromatográfico, fácilmente escalable y con propiedades y rendimientos mejorados y apropiados para su utilización en cromatografía preparativa.



## **Capítulo 3.**

### **Fundamento Teórico**



Una vez enumerados los objetivos del presente trabajo se procederá a describir las propiedades de las proteínas utilizadas así como los fundamentos de la Cromatografía de Afinidad y la Cromatografía IMAC, haciendo énfasis en los tipos de columnas utilizadas y las propiedades necesarias para su utilización industrial.

### **3.1 PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS [2, 54, 55].**

Las proteínas son biopolímeros anfóteros altamente estructurados formados por aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Presentan masas moleculares entre 5 y 20000 kDa y gran variedad de estructuras y composiciones, las cuales condicionan en gran medida sus propiedades y juegan un papel fundamental en su función biológica.

Estas estructuras se organizan en cuatro niveles diferentes (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1. Resumen de las diferentes estructuras de los aminoácidos.**

<b>Estructura primaria</b>	Secuencia de aminoácidos
<b>Estructura secundaria</b>	Plegamiento de las cadenas de aminoácidos
<b>Estructura terciaria</b>	Asociación de dominios de estructuras secundarias
<b>Estructura cuaternaria</b>	Asociación de múltiples cadenas polipeptídicas plegadas

#### **3.1.1 Estructura primaria.**

La estructura primaria de una proteína es la secuencia de aminoácidos que conforma dicha proteína. Esta secuencia puede estar formada por hasta 20 tipos diferentes de aminoácidos.

La unión de aminoácidos se realiza mediante un enlace peptídico, entre un grupo carboxilo de una proteína y el grupo amino de otra, con la eliminación de una molécula de agua Figura 3.1. Este enlace es propio de la formación de proteínas y péptidos.

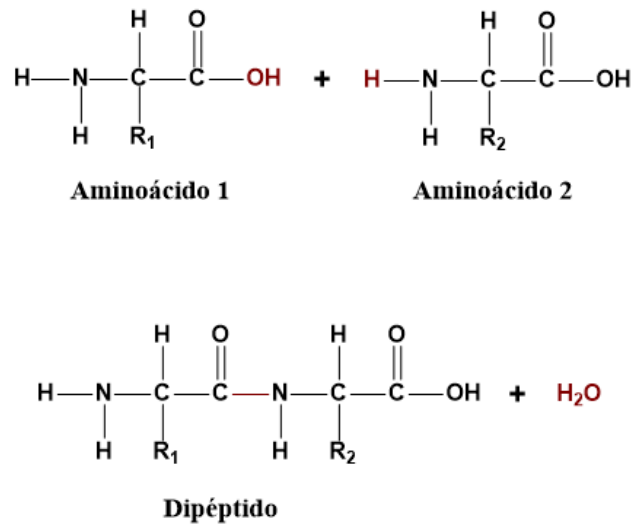


Figura 3.1. Enlace peptídico entre dos aminoácidos.

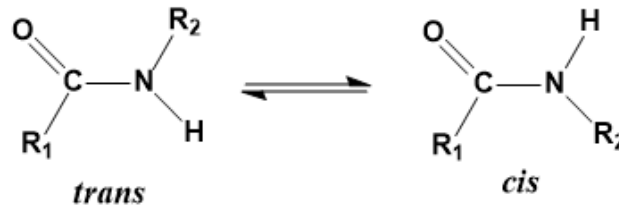
El enlace peptídico se representa generalmente como un enlace sencillo, pero posee unas características especiales:

- Su unión C-N tiene menor distancia que un enlace típico C-N.
- Presenta propiedades más cercanas a un enlace doble, como consecuencia de su estructura resonante (Figura 3.2).



Figura 3.2. Estructura resonante del enlace peptídico.

Como consecuencia al carácter especial del enlace peptídico, la rotación del enlace C-N queda restringido, produciendo mayoritariamente las conformaciones tipo *trans*, energéticamente más favorables que las de tipo *cis* (Figura 3.3).



**Figura 3.3 Estructuras cis y trans de la unión de dos aminoácidos.**

La orientación de los aminoácidos en el enlace peptídico hace que se origine una cadena principal o *esqueleto*, a partir de la cual emergen las *cadena laterales* de los aminoácidos. Dichas cadenas laterales pueden estar cargadas iónicamente, ser polares o hidrofóbicas, y por tanto determinan las propiedades de las proteínas y son fundamentales en la predicción del plegamiento de la cadena polipeptídica.

Además, estas cadenas laterales pueden tener carácter ácido, básico o neutro según su  $pK_a$ . Por tanto, el pH del medio influye en la carga total de la proteína.

### 3.1.2 Estructura secundaria.

La estructura secundaria, como ya se ha mencionado anteriormente, hace referencia al tipo de plegamiento básico de la cadena de aminoácidos, en forma de hélices  $\alpha$ , hojas  $\beta$  y giros reversos o *loops*.

Las **hélices  $\alpha$**  consisten en un ordenamiento en espiral de la cadena polipeptídica que consta de 3.6 cadenas laterales por giro. La hélice está estabilizada por enlaces por puentes de hidrógeno internos y tiene carácter hidrofóbico, hidrofílico o anfifílico, según la secuencia de aminoácidos de la estructura primaria.

Las **hojas  $\beta$**  son elementos planos muy estables que también aparecen como resultado de un gran número de enlaces por puente de hidrógeno. Tienen una estructura

bidimensional que puede ser paralela, antiparalela o mixta, según el alineamiento direccional de las cadenas polipeptídicas. Este tipo de estructuras se observan a menudo durante la agregación irreversible de proteínas. Como consecuencia de las fuerzas intermoleculares presentes en estas estructuras se necesitan agentes desnaturalizantes severos para eliminar los agregados formados.

Los **giros reversos o loops** son secciones muy flexibles de la proteína que generalmente unen otras estructuras secundarias entre sí.

**Tabla 3.2. Tipos de estructura secundaria y sus características.**

Tipo de estructura secundaria	Geometría	Peculiaridades
<b>hélices <math>\alpha</math></b>	Espiral	Tiene carácter hidrofóbico, hidrofílico o anfifílico según las cadenas laterales
<b>hojas <math>\beta</math></b>	Plano - Paralelo - Antiparalelo - Mixto	Agregación irreversible de proteínas
<b>giros reversos o loops</b>	Variable e irregular	Necesarios para que la cadena polipeptídica pueda doblarse y formar estructuras compactas

El número relativo de elementos de estructura secundaria presentes en una proteína puede ser medido por diferentes métodos espectroscópicos, como el dicroísmo circular o DC y la espectroscopía infrarroja.

### 3.1.3 Estructura terciaria.

La estructura terciaria se refiere a la estructura tridimensional del polipéptido completo, y se forma cuando elementos de la estructura secundaria se pliegan en una disposición tridimensional.

La estabilidad de la estructura terciaria se debe principalmente a interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro entre diferentes puntos de la cadena polipeptídica.

### 3.1.4 Estructura cuaternaria.

Muchas proteínas están compuestas por dos o más cadenas polipeptídicas llamadas *subunidades*, que se asocian mediante interacciones no covalentes y, en algunos casos, mediante enlaces disulfuro. La disposición espacial de estas subunidades es lo que conforma la estructura cuaternaria.

Esta estructura es, en muchos casos, esencial para que la proteína pueda desarrollar su función biológica.

Una vez determinada la estructura funcional de la proteína se procederá a estudiar algunos métodos de purificación de las mismas. Como se ha visto anteriormente, uno de los métodos más eficaces de separación de proteínas es la Cromatografía de afinidad, que se describe a continuación.

## 3.2 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.

Dentro de los métodos de separación de biomoléculas, la cromatografía de afinidad destaca por ser una técnica ampliamente empleada debido a su facilidad de operación, rendimiento, producción relativamente alta y gran especificidad [3, 4]. Además, puede ser utilizada tanto en cromatografía preparativa como analítica.

La cromatografía de afinidad fue introducida por Cuatrecasas y col. [5]. Es el tipo de cromatografía líquida más selectiva y versátil [3, 6] que se basa en el enlace reversible y específico entre la biomolécula y su ligando altamente específico (Tabla

3.3). Estas interacciones, que son generalmente reversibles, se usan para purificar compuestos biológicos. Para ello, se inmoviliza el ligando de afinidad en una matriz cromatográfica sólida para crear la fase estacionaria, mientras que la molécula de interés se encuentra en la fase móvil.

**Tabla 3.3. Tipos de ligando utilizados en cromatografía de afinidad y biomolécula con la que interactúa [7, 9, 56].**

<b>Enzima</b>	Sustrato Inhibidor Cofactor	<b>Lecitina</b>	Polisacárido Glicoproteína Receptor de superficie celular Célula
<b>Anticuerpo</b>	Antígeno Virus Célula	<b>Glutación</b>	Glutación-S-transferasa o proteínas de fusión GST
<b>Ácido Nucleico</b>	Secuencia base complementaria Histona Polimerasa de ácido nucleico Proteína de enlace al ácido nucleico.	<b>Iones metálicos inmovilizados</b>	Proteínas nativas con Histidina, Cisteína o Triptófano en su superficie. Proteínas con cadenas de poli-histidinas
<b>Hormona o vitamina</b>	Receptor Proteína de transporte	<b>Boronatos</b>	Polisacáridos Glicoproteínas RNA
<b>Aminoácidos</b>	Proteasas	<b>Proteína A y G</b>	Inmunoglobulinas



De forma general, estos ligandos se pueden clasificar en dos grupos:

- **Ligandos generales:** Presentan afinidad por una característica que es común para un grupo de compuestos. Por ejemplo, iones metálicos inmovilizados, lecitinas, proteína A y proteína G o boronatos [7, 9, 56]. Muchos de estos ligandos tienen un **origen no biológico** y presentan una **fuerza de enlace moderada**. Una excepción son las lecitinas y proteínas A y G, que generan una unión natural muy fuerte con muchos tipos de inmunoglobulinas [7, 9, 56].
- **Ligandos altamente específicos:** Se enlazan con una única biomolécula o compuestos muy relacionados. Por ejemplo, anticuerpos (que se enlazan con sus antígenos correspondientes), antígenos (que se enlazan con sus anticuerpos correspondientes), cofactores, sustratos e inhibidores (para enlazar enzimas) [7, 9, 56]. Se suelen utilizar cuando se quiere analizar o capturar un tipo concreto de biomolécula de una muestra compleja debido a que suelen ser **más caros y más difíciles de usar** en purificaciones a gran escala que los ligandos generales. Los ligandos con mayor fuerza de enlace suelen tener **origen biológico** [7, 9, 56].

Estos ligandos de afinidad deberían ser inmovilizados de forma estable y el método de inmovilización empleado no debería interferir con la biomolécula objetivo ni generar enlaces no específicos. Las diferentes formas de inmovilización de ligandos se dividen en varios grupos [56]:

- **Inmovilización covalente [56]:** Es el método de inmovilización de ligandos más utilizada. Para ello, se activa el soporte y sus centros activos se hacen reaccionar con grupos funcionales de los ligandos de afinidad. Algunos agentes activadores de soportes con grupos hidroxilo (agarosa, celulosa, etc.) se resumen en la Tabla 3.4.

**Tabla 3.4. Principales ligandos inmovilizados mediante un enlace covalente [56].**

Tipo de activación	Reactivo de activación	Molécula a enlazar
Inmovilización por enlace covalente	Bromuro de cianógeno	Aminas primarias
	Epiclorhidrina	Aminas primarias, hidroxilos, tioles
	1,4-Butanodiol diglicidiléter	Aminas primarias, hidroxilos, tioles
	Glutaraldehído	Aminas primarias

- **Adsorción física [12, 56]:** El ligando de afinidad es retenido en el soporte mediante fuerzas no covalentes como interacciones de Coulomb. Es un método fácil de aplicar pero genera interacciones no específicas y pérdida del ligando de afinidad con el tiempo.
- **Adsorción bioespecífica [12, 56]:** El ligando de afinidad se une a un ligando secundario que se ha unido previamente al soporte cromatográfico. Este método es utilizado para la adsorción de anticuerpos en soportes que contienen agentes enlazantes de anticuerpos inmovilizados (proteína A o proteína G).
- **Atrapamiento físico o encapsulación del ligando de afinidad [12, 57]:** Este método consiste en la inmovilización de una molécula mediante la polimerización alrededor del mismo. Para ello, se necesita un monómero, un agente *crosslinking* y un iniciador de la polimerización. Esta técnica es, en general, menos agresivo que otros métodos de inmovilización y no requieren la utilización de proteínas recombinantes. Además, no existe pérdida del ligando de afinidad [12]. Un ejemplo de este tipo de proceso es el atrapamiento de Albúmina de Suero Humano (HSA) utilizando soportes activados con hidrazida y utilizando glicógeno oxidado como agente capante [58]. En este caso, se produce la retención del ligando (proteína) mediante

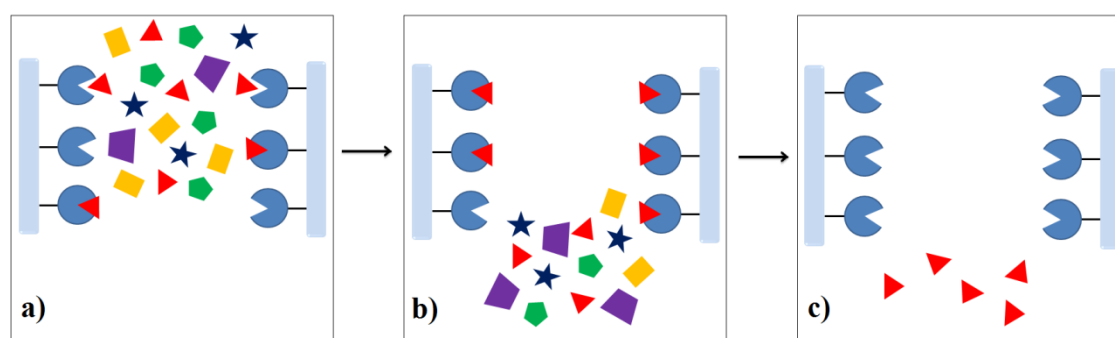
interacciones con el compuesto de activación del soporte (hidrazida), y la utilización de un agente capante (glicógeno oxidado) para retener la proteína [58].

- **Atrapamiento sol-gel [12]:** Es un método de encapsulación de ligandos de afinidad. En él, se forma la fase sol a partir de un precursor de silicio (alcoxilano o silano glicerado). Una vez que se ha formado el sol, se añade una disolución tampón con proteína y se inicia la reacción de gelación. Este proceso viene acompañado de un envejecimiento en el que el sol-gel se seca y se produce el crosslinking del silicio, quedando atrapada la proteína dentro del gel de silicio. Mediante esta técnica se pueden encapsular enzimas como creatinkinasa y fosfatasa alcalina, lipasas, anticuerpos, incluso células [59].
- **Molecular imprinting [12, 60]:** El soporte cromatográfico se forma mediante la polimerización de una suspensión con el ligando que se quiere fijar, que actúa como molde. Tras la polimerización, se elimina este ligando del polímero, y queda con huecos capaces de reconocer de forma específica este ligando o una molécula similar.

### 3.2.1 Modo de operación en cromatografía de afinidad [56].

Generalmente, la cromatografía de afinidad se realiza en cuatro pasos, aplicando lo que en ocasiones se denomina *método de elución on-off* (Figura 3.4):

1. Preparación de la muestra.
2. Carga de la muestra en la columna para que se produzca el enlace (Figura 3.4a).
3. Lavado para retirar los compuestos no enlazados (Figura 3.4b).
4. Elución de los compuestos fijados al ligando (Figura 3.4c).



**Figura 3.4. Esquema del proceso típico de separación en cromatografía de afinidad a) Adsorción, b) Lavado, c) Elución.**

Este método consiste en hacer circular la muestra que contiene el compuesto a separar a través de la columna cromatográfica (donde previamente se ha inmovilizado el ligando bioespecífico correspondiente) mediante la aplicación de una disolución tampón.

La disolución tampón empleada permite que el ligando específico reconozca y enlace el compuesto deseado. Por otra parte, el resto de compuestos atraviesan la columna sin interactuar con el ligando (Figura 3.4a).

A continuación, se introduce una corriente de disolución tampón con la intención de retirar los solutos que no hayan sido capturados por el ligando (Figura 3.4b).

Por último, los compuestos adsorbidos pueden ser liberados al cambiar las condiciones externas como la fuerza iónica, pH, disolvente, temperatura, etc. o utilizando agentes eluyentes. Para ello, se hace pasar a través de la columna el tampón de elución con el objetivo de desorber o recuperar el compuesto que se quería purificar (Figura 3.4c) que puede ser recogido, cuantificado o llevado a otro proceso de separación o purificación [56, 57].

Este tipo de operación es el utilizado habitualmente para compuestos que presentan una afinidad relativamente alta con su ligando específico ( $K_a > 10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), ya que en estas condiciones se necesitarían tiempos de elución elevados [56]. Por ello, la elución se realiza en una etapa diferente, aplicando un tampón de elución para recuperar la biomolécula de interés.

Además, esta elución o desorción se puede realizar con diferentes agentes eluyentes, según la afinidad entre el ligando y la biomolécula:

- Utilizando un agente competitivo, **elución bioespecífica**. Se añade un agente que compita por el ligando o por la biomolécula. Es un modo de elución suave o poco agresivo, pero lento. Generalmente, requiere una optimización de la concentración del agente competitivo para asegurar un desplazamiento total de la biomolécula [57].
- Disminuyendo la fuerza de enlace ligando-compuesto, mediante la modificación del pH, la fuerza iónica o la polaridad, **elución no específica**. Es más rápida que la elución bioespecífica, pero puede producir una pérdida del ligando, limitando el número de reutilizaciones del soporte [57].
- Para compuestos con menor afinidad de enlace ( $K_a < 10^5-10^6 \text{ M}^{-1}$ ) es posible realizar la elución en **condiciones isocráticas**, es decir, utilizando el mismo tampón tanto en la etapa de adsorción como en la de elución [56].

Otras ventajas de este tipo de **elución on-off** son la posibilidad de concentrar disoluciones diluidas y mejorar la estabilidad de proteínas lábiles [56].

Tras recuperar la proteína purificada, la columna debe ser regenerada antes de poder ser utilizada para una nueva separación (Figura 3.5).

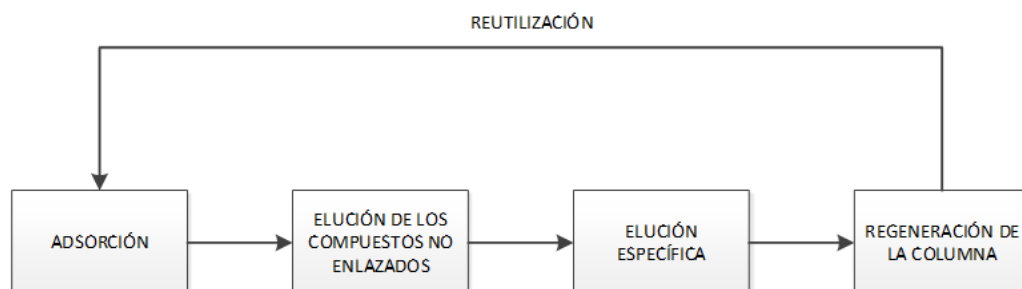


Figura 3.5. Diagrama del proceso seguido en la **elución on-off**.

### **3.3 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON IONES METÁLICOS INMOVILIZADOS (*Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC*).**

La cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) es un tipo de cromatografía que aprovecha la diferente afinidad que presentan algunos grupos funcionales presentes en la superficie de las proteínas o biomoléculas por iones metálicos [16, 17]. Esta diferencia de interacción se debe al enlace covalente coordinado o dativo que se produce entre el ion metálico y las cadenas laterales de los aminoácidos superficiales [16].

En este tipo de cromatografía de afinidad un ion metálico funciona como ligando de afinidad. Para ello, el ion metálico debe ser inmovilizado por un agente quelante fijado en el soporte cromatográfico.

#### **3.3.1 Generalidades de la cromatografía IMAC.**

La unión entre los iones metálicos inmovilizados y las cadenas laterales de las proteínas afines a estos metales pueden asemejarse a la fuerza de interacciones bioespecíficas [17].

Aunque la coordinación con metales quelados ha sido utilizada en separaciones cromatográficas de pequeñas moléculas, este concepto fue explotado por Porath para la adsorción selectiva de proteínas en 1975 [15]. Desde ese momento, la cromatografía IMAC se ha convertido en una herramienta importante ampliamente utilizada en la purificación de proteínas en cromatografía analítica y preparativa [17].

La cromatografía IMAC presenta algunas ventajas importantes respecto a la *cromatografía de afinidad bioespecífica* cuando se trata de purificación de proteínas [17], como se puede observar en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Comparación entre la cromatografía IMAC y de afinidad bioespecífica [17].

<b>Propiedad</b>	<b>IMAC</b>	<b>Cromatografía de afinidad bioespecífica</b>
<b>Estabilidad del ligando</b>	Alta	Baja
<b>Carga de la proteína</b>	Alta	Baja
<b>Condiciones de elución</b>	Suaves	Generalmente extremas
<b>Recuperación del ligando después de la regeneración</b>	Completa	Generalmente incompleta
<b>Selectividad</b>	Media-baja	Alta
<b>Coste</b>	Bajo	Alto

Los pequeños quelatos metálicos utilizados habitualmente en este tipo de separaciones son estables bajo un amplio rango de condiciones de disolventes y temperaturas. Como consecuencia, pueden ser reutilizados gran número de veces prácticamente sin pérdida de eficiencia [17].

Otra de sus ventajas reside en la alta capacidad de carga de metales en el soporte cromatográfico, lo que implica una alta capacidad de retención de proteínas y una relativa facilidad tanto de elución del producto como de regeneración del ligando [17].

Para romper el enlace metal-proteína se utilizan condiciones suaves: reduciendo el pH se protonan las cadenas laterales de aminoácidos que intervienen en el enlace metálico, mientras que utilizando agentes competitivos como el imidazol se ocupan los centros de coordinación metálicos, desplazando a la proteína [17].

Además, este tipo de columnas se regeneran simplemente mediante una nueva aplicación del metal quelado [17].

Por último, este tipo de ligando (ion metálico) es barato en comparación con los ligandos de afinidad bioespecíficos, que son productos biológicos altamente purificados [17].

### 3.3.2 Antecedentes de la cromatografía IMAC.

En 1975, Porath y colaboradores ya conocían la afinidad entre metales en disoluciones (es decir, entre iones metálicos) y algunos aminoácidos como histidina o cisteína [61] y la aplicaron en la separación de proteínas, inmovilizando fuertemente el ion metálico a un soporte cromatográfico [15].

Durante los años sucesivos, esta nueva técnica fue evaluada para purificar diferentes proteínas y péptidos. Estos resultados se recogen en la primera revisión bibliográfica sobre IMAC, publicada por Sulwovski en 1985 [62].

A finales de los años 70, se produjo un aumento de técnicas de biología molecular recombinante, y en los años 80 se comenzó a utilizar un nuevo agente quelante, el ácido nitrilotriacético (NTA) [63]. Mientras tanto, la purificación de proteínas recombinantes modificadas genéticamente para generar colas de histidina (*His-tagged*) utilizando NTA como agente quelante [64] representó la aplicación más importante en cromatografía IMAC [45].

A continuación se resumen la cronología histórica con los acontecimientos más importantes en la Cromatografía IMAC hasta 1990 (Tabla 3.6).

**Tabla 3.6. Acontecimientos más importantes en la cromatografía IMAC [16, 45, 65].**

Año	Acontecimiento	Ref.
1975	Porath y colaboradores desarrollan la cromatografía de afinidad mediante metales quelados para la separación de proteínas.	[15]
1978	Investigación de la adsorción por transferencia de carga en cromatografía de metales quelados.	[66]



**Tabla 3.6 Acontecimientos más importantes en la cromatografía IMAC [16, 45, 65]**  
(Continuación).

<b>1981</b>	Primeros estudios de cromatografía IMAC usando $\text{Ca}^{2+}$ como ligando.	[67]
	Primera inmovilización de proteínas para mejorar su estabilidad y reutilización.	[68]
<b>1982</b>	Sugerencia del mecanismo de enlace en la cromatografía IMAC.	[69]
<b>1983</b>	Utilización de sílice como soporte para cromatografía IMAC de alta resolución.	[70]
	Estudio de la influencia de varios parámetros en IMAC: carga del ion metálico, sales, detergentes, disolventes, muestra cargada, pH y elución.	[71, 72]
	Utilización de metales con carácter ácido como ligando. Distinción de los tipos de metales.	[72]
	Porath acuña el término <i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i> .	[71]
<b>1985</b>	Sulkowski resume una década de trabajos sobre IMAC.	[62]
<b>1986</b>	Aislamiento de fosfoproteínas con $\text{Fe}^{3+}$ inmovilizado.	[73]
	Utilización de un polímero hidrofílico basado en resinas ( <i>TSK gel 5PW</i> ) para cromatografía IMAC en HPLC.	[74]
	Estudio de transferencia de iones metálicos (MIT).	[75]
	Soportes de sílice con ácido iminodiacético (IDA) como agente quelante para HPLC. Información cuantitativa de los efectos del pH y sales en la retención.	[76, 77]

**Tabla 3.6 Acontecimientos más importantes en la cromatografía IMAC [16, 45, 65]**  
(Continuación).

<b>1987</b>	Nuevo quelato: ácido nitrilotriacético (NTA).	[63]
	Desarrollo de un péptido quelante (CP-IMAC) para la separación de proteínas genéticamente modificadas.	[78]
	Estudios cuantitativos de adsorción de proteínas en IMAC por análisis frontal.	[79]
	Evaluación del <i>TSK gel chelate 5PW</i> en análisis por HPLC.	[80]
	Aislamiento demipreparativo de isoenzimas carboxipeptidasa usando IMAC.	[81]
<b>1988</b>	Análisis cuantitativo de la interacción de proteínas con ligandos metálicos inmovilizados.	[82]
	Combinación entre un detector de quimiluminiscencia y una columna con un metal quelado para detectar pequeñas cantidades de compuestos biológicos.	[83]
	Separación de inmunoglobulinas, transferrina y lactoferrina de productos de agricultura mediante IMAC. Evidencia experimental de que la histidina es el aminoácido más importante en el enlace con el ligando metálico.	[84, 85]
<b>1989</b>	Purificación de la glicoproteína componente humana serum amiloide (SAP) usando $\text{Ca}^{2+}$ como ligando.	[86]
	Detección de histidinas superficiales en proteínas modelo.	[87]
	Interacciones entre histidinas y transferencia de iones metálicos. Interacciones con ligandos metálicos inmovilizados.	[88]
	Distinción de proteínas modificadas genéticamente.	[89]
	Importancia de la selección del brazo espaciador para la separación.	[90]
	Introducción de la precipitación mediante metales de afinidad.	[5]

**Tabla 3.6 Acontecimientos más importantes en la cromatografía IMAC [16, 45, 65]**  
(Continuación).

1990	Interacciones entre péptidos y superficies de proteínas con iones metálicos y superficies inmovilizadas por iones metálicos.	[91]
	Primer enlace $\text{Fe}^{3+}$ con apoferritina.	[92]
	Extracción líquido-líquido usando partición de afinidad de metales inmovilizados. Modelo matemático.	[93]

### 3.3.3 Mecanismo de separación de la cromatografía IMAC.

Como se comentó previamente, la adsorción de proteínas mediante esta técnica se basa en la interacción que se produce entre las cadenas laterales de los aminoácidos situados en la superficie de las proteínas y los iones metálicos inmovilizados [13, 15].

Esto se debe a que algunos aminoácidos como la histidina, cisteína y triptófano contienen en sus cadenas laterales átomos dadores de electrones, mientras que los iones metálicos tales como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  presentan uno o varios centros de coordinación accesibles [15, 94].

Estos iones metálicos se encuentran complejados por la presencia de un agente quelante que los inmoviliza y estabiliza y, a su vez, permite su interacción.

De esta forma, se produce un enlace covalente coordinado o dativo en el que las cadenas laterales dadoras de electrones presentes en los aminoácidos comparten sus electrones con el ion metálico inmovilizado.

Por ejemplo, el ácido iminodiacético (IDA) es un agente quelante tridentado que enlaza al ion metálico a través de su átomo de nitrógeno y dos oxígenos del carboxilato. Como el metal se coordina con 4-6 ligandos, los demás sitios de coordinación son ocupados por agua o tampón, que pueden ser desplazados por grupos funcionales de proteínas [15].

Las proteínas enlazadas a los metales quelados se eluyen utilizando ácidos de Lewis (como  $H^+$ ,  $Zn^{2+}$ ), que compiten con el metal por la proteína, o introduciendo bases de Lewis (como imidazol), que compite con la proteína por el metal [13, 17].

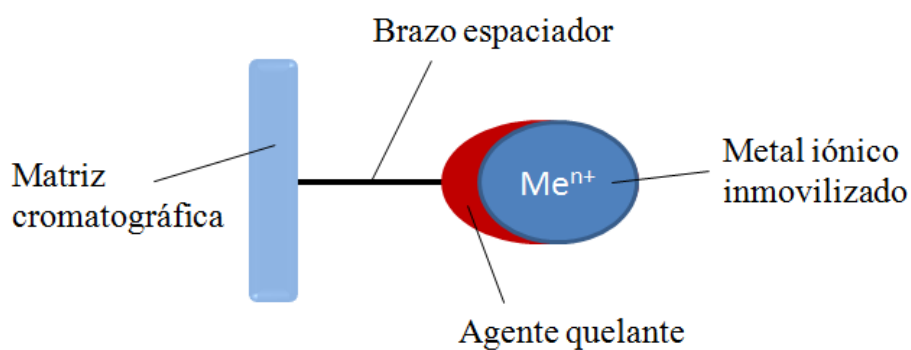
Esta fuerza de enlace es diferente según la proteína y metal involucrados, lo que puede ser aprovechado para separar o purificar proteínas [13].

### 3.3.4 Componentes necesarios en la cromatografía IMAC [95].

Los componentes característicos de la cromatografía IMAC se resumen y detallan a continuación (Tabla 3.7 y Figura 3.6):

**Tabla 3.7. Componentes que conforman el soporte cromatográfico [95].**

Componente	Función
Soporte cromatográfico	Estructura
Brazo espaciador	Eliminar impedimentos estéricos
Agente quelante	Inmovilizar el ion metálico
Ion metálico	Adsorber la proteína



**Figura 3.6. Componentes principales de la cromatografía IMAC.**

En primer lugar, la matriz debe ser activada para poder ser utilizada como soporte cromatográfico.

Generalmente, la activación se produce a través de la unión de un brazo espaciador mediante enlaces covalentes irreversibles, donde los agentes utilizados con más frecuencia son los compuestos descritos anteriormente como ligandos de afinidad, que se resumen en la Tabla 3.4.

**Tabla 3.4 Principales ligandos inmovilizados mediante un enlace covalente [56].**

Tipo de activación	Reactivo de activación	Molécula a enlazar
Inmovilización por enlace covalente	Bromuro de cianógeno	Aminas primarias
	Epiclorhidrina	Aminas primarias, hidroxilos, tioles
	1,4-Butanodioldiglicidiléter	Aminas primarias, hidroxilos, tioles
	Glutaraldehído	Aminas primarias

De esta forma, es posible la introducción del brazo espaciador en la estructura química, lo que reduce considerablemente los impedimentos estéricos y mejora la interacción proteína-ligando.

Una vez fijado el brazo espaciador, se enlaza el agente quelante, que estabilizará y fijará el ion metálico de forma reversible.

Por último, se fija el ion metálico, que es inmovilizado por el agente quelante de forma reversible. La fuerza de esta retención depende tanto del agente quelante como del ion metálico empleados, como se explicará a continuación.

El quelato formado es el ligando que, si posee centros de coordinación libres, interaccionará con los aminoácidos externos presentes en la estructura de la proteína.

### 3.3.5 Tipos de metales.

La cromatografía IMAC utiliza un ligando no biológico, el quelato formado por un ion metálico y un agente quelante [56]. Estos ligandos no específicos son atractivos en la purificación a gran escala por su bajo coste y buena estabilidad ante las disoluciones típicas utilizadas en la limpieza de columnas [56].

Los metales utilizados en IMAC se clasifican generalmente en tres tipos, según la teoría de ácidos y bases fuertes y débiles (*Hard and Soft Acids and Bases, HSAB*) desarrollada por Pearson [96], según su afinidad por diferentes nucleófilos.

Esta teoría establece que cuando dos átomos forman un enlace, uno de ellos actúa como ácido de Lewis y el otro como base de Lewis. La fuerza de este enlace está gobernada por la fortaleza o debilidad de los ácidos y bases involucrados. Esta teoría HSAB concluye que aquellos enlaces entre compuestos con una clasificación similar son los más fuertes, por ejemplo: el enlace entre un ácido fuerte y una base fuerte.

A continuación se clasifican algunos metales empleados en cromatografía IMAC según su comportamiento como ácido de Lewis. Debido a que el tipo de ion metálico influye en la afinidad que presentan hacia las proteínas, en la Tabla 3.8 se muestra esta preferencia de enlace hacia diferentes átomos.

**Tabla 3.8. Metales más utilizados en cromatografía IMAC según la clasificación de Pearson [13, 96].**

Tipo de metal	Carácter	Metales	Preferencia de enlace
<b>Duro</b>	Ácido fuerte	Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Al <sup>3+</sup>	Oxígeno, nitrógeno alifático y fósforo
<b>Intermedio</b>	Intermedio	Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	Nitrógeno aromático, oxígeno y azufre
<b>Blando</b>	Ácido débil	Cu <sup>+</sup> , Ag <sup>+</sup> , Hg <sup>2+</sup>	Azufre

De esta forma, según la clasificación de Pearson, un metal duro es un ácido fuerte de Lewis, y presenta preferencia por las bases fuertes de Lewis tales como el oxígeno, nitrógenos alifáticos y fósforo.

Además, los iones metálicos también se pueden clasificar según su aplicación, como se muestra en la Tabla 3.9.

**Tabla 3.9. Tipos de metales según su objetivo [16, 45].**

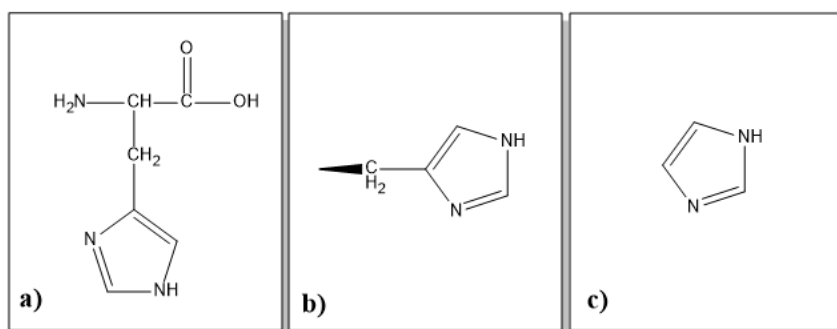
<b>Tipo de compuesto a purificar</b>	<b>Iones metálicos empleados</b>	<b>Bibliografía</b>
Fosfoproteínas y fosfopéptidos	Cationes tri- y tetravalentes $Al^{3+}$ , $Ga^{3+}$ , $Fe^{3+}$ , $Zr^{4+}$	[45]
Una única histidina superficial	$Cu^{2+}$	[13, 88]
Dos histidinas superficiales cercanas	$Cu^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Zn^{2+}$	[13, 88]
Al menos dos histidinas superficiales adyacentes	$Cu^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Zn^{2+}$ , $Co^{2+}$	[13, 88]
Varios triptófanos en superficie	$Cu^{2+}$	[13]

Por tanto, la histidina es el aminoácido superficial que presenta una mayor interacción con los metales intermedios [17].

Teniendo en cuenta que los iones metálicos intermedios son los más versátiles (Tabla 3.8), son los más empleados habitualmente. Además, teniendo en cuenta la interacción de los diferentes aminoácidos con los iones metálicos intermedios (Tabla 3.9), y la escasez de cisteína y triptófano en la superficie de las proteínas se considera

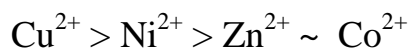
que la histidina es el aminoácido superficial que presenta una mayor interacción con este tipo de metales [17].

Este aminoácido histidina (Figura 3.7a) contiene grupos histidil en sus cadenas laterales (Figura 3.7b), que interacciona con el ion metálico mediante el grupo imidazol (Figura 3.7c).



**Figura 3.7. Estructuras a) aminoácido histidina, b) cadena lateral histidil, c) imidazol.**

Por tanto, la retención de la proteína se basa en la interacción con el grupo histidil (Figura 3.7b) y refleja la afinidad del ion metálico por el grupo imidazol (Figura 3.7c) que viene determinada por las constantes de formación del complejo (Figura 3.8).



**Figura 3.8. Orden de afinidad con el imidazol [97].**

Por tanto, la afinidad del imidazol por el  $\text{Cu}^{2+}$  es 15 veces mayor que la afinidad por el  $\text{Ni}^{2+}$ , cuya afinidad a su vez es más de tres veces mayor que las del  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  [17].

Además, este orden mostrado en la Figura 3.8 también corresponde a la capacidad de retención de los metales por el agente quelante IDA [98].



Como consecuencia de la mayor afinidad del imidazol por el  $\text{Cu}^{2+}$ , las proteínas que contienen histidinas accesibles se unen con mayor fuerza a  $\text{Cu}^{2+}$ -IDA que a otros quelatos de IDA. Sin embargo, estas altas afinidades no se traducen necesariamente en separaciones más eficaces, ya que cuanto mayor sea la unión imidazol-metal, más difícil será recuperar la proteína [17].

### 3.3.6 Tipos de agente quelante.

De todas las estructuras de quelatos conocidas, sólo algunas son utilizadas en cromatografía IMAC. Entre ellos, el que se emplea con mayor frecuencia es el ácido iminodiacético o IDA, utilizado por primera vez por Porath [15, 49].

El IDA es una molécula pequeña y de naturaleza hidrofílica que forma quelatos con iones divalentes, con los que neutraliza su carga. Esto minimiza las interacciones secundarias entre el quelato metálico y la proteína [17]. Además, el IDA quela metales como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  ligeramente, pero es capaz de dejar libres sitios de coordinación disponibles para el enlace con la proteína (Tabla 3.10 y Figura 3.9a).

**Tabla 3.10. Agentes quelante más habituales [45, 49].**

Agente quelante	Tipo de agente quelante	Centros libres de coordinación para enlazar la proteína	Iones metálicos inmovilizados
IDA	Tridentado	3	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$
NTA	Tetradentado	2	$\text{Ni}^{2+}$
CM-Asp	Tetradentado	2	$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$
TED	Pentadentado	1	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$

IDA: ácido iminodiacético, NTA: ácido trinitrilotriacético, CM-Asp: Ácido aspártico carboximetilado o TALON (cuando el metal inmovilizado es  $\text{Co}^{2+}$ ), TED: tri(carboximetil)etilendiamina

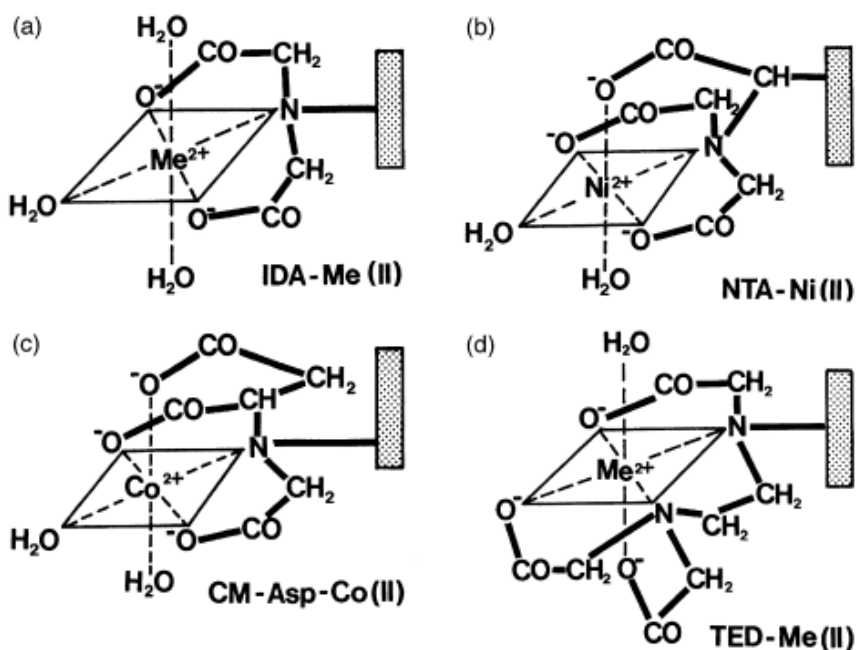
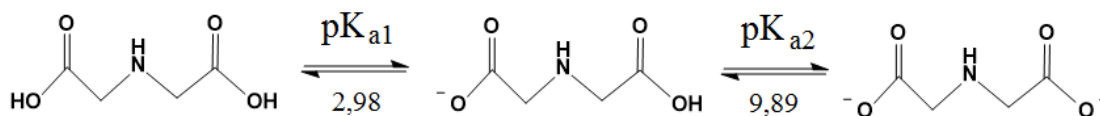


Figura 3.9. Esquema de las estructuras de algunos agentes quelante, a) IDA, b) NTA, c) CM-Asp, d) TED [49].

En general, los agentes quelantes tetradentados como NTA y CM-Asp presentan mayores afinidades por los iones metálicos que el IDA, pero también generan menor fuerza de enlace con la proteína debido a la pérdida de un centro de coordinación (Figura 3.9b y c). Esto es incluso más pronunciado en el caso del agente quelante pentadentado TED, donde en una geometría octaédrica con un ion metálico divalente solo tiene libre un centro de coordinación para el enlace con la proteína (Figura 3.9d). En este caso, además quela el metal con menor fuerza que el IDA [49].

Sin embargo, es lógico pensar que al utilizar IDA, al quelar el metal con menos fuerza que otros agentes quelantes, podría haber pérdida del metal [63]. Para evitar esto en la medida de lo posible, se puede trabajar a pH que favorezcan el quelato. Para ello, es necesario tener en cuenta los pK<sub>a</sub> del IDA (Figura 3.10).



**Figura 3.10. Estructura del IDA según su pH [99]**

Como consecuencia, cuanto menor sea el pH de trabajo mejor quelado estará el metal, lo que evitará en gran medida la pérdida del mismo.

Por todos estos motivos, el IDA es el agente quelante más empleado en purificación de proteínas [17].

### 3.3.7 Grupos funcionales superficiales en la proteína a separar [17].

Como se comentó previamente, se sabe que el enlace entre la proteína y los metales quelados utilizados habitualmente ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ ) se produce mayoritariamente mediante cadenas laterales de histidinas [88] mientras que los quelatos de  $\text{Fe}^{3+}$  presentan una alta afinidad por los grupos fosfato y fosfoproteínas [17].

Aunque las cisteínas también pueden enlazar potencialmente metales quelados, en la práctica pocas veces se encuentran disponibles en la superficie y además en su estado apropiado: reducido. Por tanto, no es habitual su implicación en los procesos de cromatografía IMAC.

Por último, otras cadenas laterales y grupos funcionales así como los átomos de N accesibles también contribuirán a la retención, aunque en menor medida que el grupo histidil mencionado anteriormente.

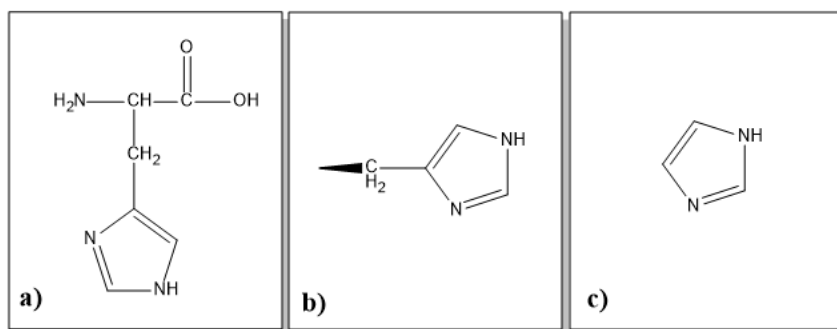
A continuación se resumen los aminoácidos implicados en la unión con el ligando metálico y así como su efecto en la distribución de los mismos.

### 3.3.7.1 Histidinas

Numerosos estudios [21, 87] demuestran que la adsorción de una proteína en un ion metálico quelado viene dada, fundamentalmente, por el contenido en histidinas en su superficie.

La histidina es un aminoácido relativamente escaso, llegando a ser el 2% en proteínas globulares [100]. De ellas, sólo la mitad se encuentran en la superficie de la proteína.

La estructura de la histidina, tanto el aminoácido completo como el residuo histidil, y la estructura del imidazol, se muestran en la Figura 3.7.



**Figura 3.7. Estructuras a) aminoácido histidina, b) cadena lateral histidil, c) imidazol.**

El nitrógeno del grupo imidazol presente en la histidina (Figura 3.7c) se coordina con iones metálicos cuando no está protonado. Por tanto, como el pK<sub>a</sub> de las cadenas laterales de histidina presentan generalmente valores entre 6 y 7, un descenso del pH hasta valores de 4 o 5 sería suficiente para eluir las proteínas retenidas mediante histidinas superficiales [17]. Además, la afinidad de las histidinas por los metales varían según el pK<sub>a</sub> y el impedimento estérico que presenten, por lo que es importante tener en cuenta el conjunto de la proteína [17].

Como se vio en la Tabla 3.9, las proteínas interaccionan con diferentes iones metálicos según el número de histidinas accesibles. De hecho, numerosos estudios [14,

45, 52] demuestran que una única histidina en la superficie de la proteína es suficiente para que una biomolécula sea retenida por un ligando  $\text{Cu}^{2+}$ -IDA.

### 3.3.7.2 Otros aminoácidos.

Además de la histidina, existen otros aminoácidos capaces de interactuar con el ion metálico inmovilizado, dando lugar a la retención de la proteína.

En la Tabla 3.11 se resumen los grupos funcionales empleado para dicha interacción, la contribución que realiza a la interacción total y el tipo de mecanismo por el cual el grupo funcional contribuye a la separación, que puede ser de dos tipos:

- Directamente, mediante un enlace con el ion metálico.
- Indirectamente, mediante efectos en la accesibilidad de histidinas superficiales,  $\text{pK}_a$ , o solvatación del metal iónico y la histidina.

**Tabla 3.11. Contribución y mecanismo de enlace de diferentes grupos funcionales [17].**

Grupo funcional	Contribución	Mecanismo
<b>Cadenas laterales</b>		
His	++++	Directo
Cys	++++ <sup>1</sup>	Directo
Asp, Glu	-	Indirecto
Lys, Arg	+	Indirecto <sup>2</sup>
Trp, Tyr, Phe	+	Indirecto
<b>N terminal</b>	++	Directo

<sup>1</sup>Una cisteína accesible se enlaza sólo en su forma reducida. Los metales catalizan la oxidación de la cisteína.

<sup>2</sup>Se convierte en directo a pH elevados.

Como se observa en la Tabla 3.11, los aminoácidos que más contribuyen en el proceso de separación son la **histidina** y la **cisteína**, ambos mediante interacción directa con el ion metálico.

Sin embargo, aunque los azufres tiol presentes en la **cisteína** poseen gran afinidad por  $Zn^{2+}$  y otros iones metálicos intermedios, esta técnica no se emplea habitualmente para separar proteínas con cisteínas accesibles. Esto puede deberse, en primer lugar, a la escasez de este tipo de biomolécula y , en segundo lugar, a las dificultades prácticas de mantener las cisteínas accesibles en su estado reducido [17].

Las **cisteínas** superficiales se oxidan rápidamente en presencia de  $Cu^{2+}$  y forman dímeros de unión disulfuro. Además, es posible que los tioles libres retiren los iones metálicos del agente quelante IDA, con lo que se elimina toda posible contribución por parte de este aminoácido al enlace con la proteína [87].

Por otra parte, los **nitrógenos** terminales accesibles y no modificados también se pueden enlazar al ion metálico y contribuir a la retención de forma directa (Tabla 3.11).

Sin embargo, como el grupo amino que se une al metal debe estar desprotonado (cuyo  $pK_a$  está en torno a 8), esta contribución es pequeña a pH neutro.

Otras cadenas laterales aromáticas (**triptófano, fenol, y tirosina**) también contribuyen a la retención de proteínas, se cree que mediante un **efecto indirecto**, alterando las interacciones entre el metal y las histidinas superficiales.

A pH neutro, la presencia de cadenas laterales con carga puede ejercer un efecto indirecto en el  $pK_a$  del grupo histidil que depende de la distancia a la que se encuentren estos aminoácidos. Por ejemplo, mediante la protonación del nitrógeno del imidazol, éste se estabiliza y disminuye la carga negativa del grupo histidil, lo que se traduce en una menor disponibilidad para la coordinación del metal.

Por otra parte, algunos aminoácidos como la **lisina**, además del mecanismo de interacción indirecto, a  $pH > 8.5$  las **lisinas** superficiales son capaces de coordinarse con el metal inmovilizado.

Además, aunque otros compuestos aparte de la histidina contribuyen sólo de forma débil al enlace, pueden ser utilizados en separaciones de alta resolución, donde pequeñas diferencias en la afinidad se convierten en grandes diferencias por amplificación en una columna cromatográfica. En este tipo de columnas las proteínas y péptidos con el mismo número de histidinas superficiales pueden ser separadas mediante cromatografía IMAC [87].

### 3.3.7.3 Efecto de la distribución de cadenas laterales.

Por último, la distribución espacial de las histidinas en la superficie de la proteína influye en la afinidad del enlace con el metal. Por ejemplo, algunos autores sugieren que dos histidinas próximas hacen que el enlace sea más intenso [101].

Las interacciones de coordinación tienen grandes restricciones espaciales en cuanto a distancias y orientaciones relativas de los grupos del ligando de la proteína y del metal. Por tanto, sólo será posible la interacción de múltiples átomos donadores de electrones de la proteína con un único ion metálico cuando esos requisitos estéricos sean satisfechos.

En la Tabla 3.12 se resume el tipo de requisito superficial necesario para que se produzca la interacción con diferentes metales intermedios.

**Tabla 3.12. Reconocimiento del metal según la topografía superficial de la proteína [101].**

Ion metálico	Cu <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>
His-	+	-	-	-
His-(X) <sub>n</sub> -His	++	+	-	-
His-(X) <sub>n</sub> -His, n = 2 ó 3, α hélice	+++	+	+	+
His-X-His, hoja β	+++	+	+	+

Por tanto, en el caso del  $\text{Cu}^{2+}$ , la presencia de histidinas próximas entre sí hace que la interacción proteína-metal se intensifique de forma considerable. Por otra parte, para otros iones metálicos intermedios, estas disposiciones con histidinas cercanas son imprescindibles para que pueda producirse el enlace deseado.

Por ejemplo, cuando la proteína presenta dos histidinas separadas por tres aminoácidos en una  $\alpha$  hélice se muestra una gran afinidad por estos iones, como  $\text{Zn}^{2+}$ -IDA,  $\text{Co}^{2+}$ -IDA y  $\text{Cu}^{2+}$ -IDA, llegándose a alcanzar valores típicos de interacciones bioespecíficas [101].

### **3.3.8 Composición de la fase móvil.**

La selectividad que muestra una mezcla de proteínas en IMAC también depende de la composición de la fase móvil, como la fuerza iónica (I), tipo de sal empleada, pH o el uso de agentes competitivos.

#### **3.3.8.1 Fuerza iónica (I).**

Las disoluciones tampón con alta fuerza iónica suprimen las interacciones electrostáticas secundarias no deseadas y mejoran la unión de la proteína con el quelato, mientras que disminuir la fuerza iónica puede provocar una baja adsorción de proteínas [17, 65].

Por ello, es habitual la utilización de NaCl (0.1-1.0 M) en los tampones utilizados para suprimir las interacciones iónicas entre la muestra y la matriz, así como entre proteínas [13].

El efecto de los electrolitos en la retención de proteínas está relacionada con la afinidad que presentan los iones metálicos por sus moléculas de agua solvatadas. De esta forma, incrementar la fuerza iónica debilita estas fuerzas entre el metal y las moléculas de agua, lo que favorece la adsorción de proteína [13].

Además, es posible aumentar la selectividad del proceso utilizando interacciones secundarias en presencia de diferentes sales, de forma que el soporte cromatográfico



actúe combinando las interacciones con metales inmovilizados con una interacción hidrofóbica o de intercambio de iones [102, 103].

### 3.3.8.2 Tipo de sales en disolución.

Las sales se pueden clasificar según el efecto que tienen en la solubilidad y estabilidad de las proteínas, pudiendo favorecer su precipitación. Esto es consecuencia del cambio que provocan estas sales en las moléculas de agua o en la estructura del disolvente en el que se encuentran las proteínas.

Esta clasificación se denomina series liotrópicas o de Hofmeister [104] y se resume en la Figura 3.11.

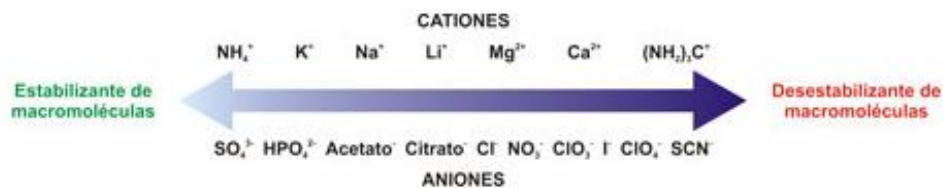


Figura 3.11. Serie de Hofmeister [104].

Esta clasificación divide las sales entre caotrópicas y anticaotrópicas:

- Las sales **caotrópicas** son sales con carácter hidrofóbico que disminuyen la estabilidad de la proteína y aumenta la solubilidad y desnaturalización de las proteínas [65].
- Las sales **anticaotrópicas** son sales que presentan gran afinidad por moléculas de agua y aumentan el carácter hidrofóbico de la proteína, provocando que la proteína salga de la estructura de la fase móvil y se desplace hacia la matriz. De esta forma, disminuyen tanto la solubilidad como la desnaturalización de la proteína [65].

En el caso de la cromatografía IMAC, cuando la fase líquida contiene sales muy hidrofílicas (anticaotrópicas), las proteínas se concentran en la matriz hidrofóbica cubierta con iones metálicos inmovilizados, favoreciendo la interacción entre ambas [65].

Por otra parte, las **sales caotrópicas** desestabilizan el enlace de las proteínas, lo que las hace apropiadas para la elución. Sin embargo, son agentes desnaturizantes potentes [65].

### 3.3.8.3 Efecto del pH.

La adsorción de proteínas se lleva a cabo a un pH tal que los grupos donantes de electrones presentes en la superficie de la proteína estén parcialmente protonados. Por ello, es frecuente utilizar un pH ligeramente ácido en presencia de tampones (generalmente fosfato y acetato) con alta fuerza iónica [13].

El efecto del pH en el proceso de adsorción y de elución es complejo ya que influye en numerosas propiedades, como por ejemplo el comportamiento nucleofílico de los componentes del tampón, las propiedades aceptor-donor de electrones de los solutos, la estabilidad del metal, etc. [13].

En general, se sabe que un intervalo de pH de 6 a 8 favorece la retención de proteínas mediante sus histidinas y cisteínas superficiales, y que cuando el valor del pH se encuentra por encima de 8 se favorece la coordinación con grupos amino, lo que disminuye la selectividad [65].

Por este motivo, **el valor de pH que suele utilizarse para el proceso de adsorción se encuentra entre 6 y 8.**

#### **3.3.8.4 Agentes competitivos.**

Los agentes competitivos son solutos que presentan mayor afinidad por el ion metálico (o por la proteína) que el compuesto con el que se está unido, y se incorporan a la disolución tampón en la etapa de elución con el fin de romper el enlace proteína-metal.

Además, es posible producir cambios de selectividad en presencia de diferentes sales (según la serie de Hofmeister), y se puede eluir tanto con gradientes de pH como de imidazol [105, 106]. Generalmente, en cromatografía IMAC se utilizan gradientes de imidazol o histidina como agentes competitivos a pH neutro, con el fin de recuperar la proteína adsorbida [65].

La última opción para eluir la proteína consiste en romper el quelato disminuyendo el pH o añadiendo un agente quelante fuerte como el EDTA, lo que hace que el metal sea eluido también de la columna cromatográfica [65]. Sin embargo, esto reduce drásticamente la eficiencia de la columna y desnaturaliza la proteína [65].

Por estos motivos, no es adecuado utilizar agentes quelantes fuertes como agentes competitivos.

#### **3.3.9 Usos de la Cromatografía IMAC**

Por todos los motivos anteriormente expuestos, la cromatografía IMAC puede ser empleada en gran cantidad de aplicaciones tanto a escala de laboratorio como industrial, tal y como se muestra en la Tabla 3.13.

**Tabla 3.13. Aplicaciones más importantes de la cromatografía IMAC.**

<b>Aplicación</b>	<b>Referencia</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Referencia</b>
Purificación de proteínas en muestras biológicas complejas	[16]	Extracción líquido-líquido de proteínas y células (dos fases acuosas)	[3, 4, 107]
Purificar proteínas recombinantes (colas de histidina)	[57]	Electroforesis	[108, 109]
Detectar histidinas en la superficie de las proteínas, y condiciones cercanas	[87, 110]	Purificación de ADN y derivados oligonucléicos con colas de histidina	[111, 112]
Inmovilización de enzimas para su uso como biorreactores	[68]	Detección de fármacos	[113, 114]
Precipitación selectiva de proteínas	[115]	Detección de biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades, junto con espectrometría de masas	[116, 117]

Resumiendo, este tipo de cromatografía de afinidad (IMAC) ofrece alta pureza de la proteína a separar, condiciones suaves de elución, alta estabilidad del ligando, alta recuperación de proteína, fácil regeneración y bajo coste [118].

A continuación se describirán las características necesarias para que un soporte pueda ser utilizado en este tipo de cromatografía.

### 3.4 Soportes utilizados en cromatografía.

Los soportes o matrices cromatográficas son, como se mencionó anteriormente, el componente estructural donde se encuentran unidos los ligandos, y son muy importantes para la cualquier cromatografía de afinidad, ya que influyen en factores tales como la caída de presión y la transferencia de materia.

Por ello, una matriz ideal debería tener las siguientes propiedades [10, 56, 57].

- Uniformidad.
- Tamaño de poro adecuado (macroporos).
- Hidrofilicidad.
- Estabilidad química y mecánica.
- Activación fácil.
- Selectividad.
- Adsorción no específica mínima o nula.
- Insolubilidad en el disolvente utilizado.
- Características de flujo apropiadas (velocidad y presión).
- Alta superficie específica disponible para la unión del ligando.
- Buena transferencia de materia.
- Bajo coste.

Las matrices cromatográficas que se emplean habitualmente en cromatografía, tanto de afinidad como IMAC, son columnas empaquetadas o de lecho fijo. Estos soportes cromatográficos están formados por partículas porosas de pequeño tamaño para aumentar la superficie disponible para la adsorción.

Los soportes cromatográficos se clasifican, según el origen del material, en matrices naturales, sintéticas e inorgánicas (Tabla 3.14) [10, 57].

**Tabla 3.14. Clasificación de matrices según su origen para cromatografía de afinidad [10, 57].**

<b>Tipo de matriz</b>	<b>Ejemplo</b>	<b>Nombre comercial</b>	<b>Referencia</b>
Matrices naturales	Agarosa	Sepharose	[119]
	Dextrano	Sephadex y Superdex	[120]
	Celulosa	Bolas de celulosa	[121]
	Quitosano	Quitosano	
Matrices sintéticas	Acrilamida	Bio-Gel	[122, 123]
	Poliestireno	Poliestireno	[124, 125]
	Derivados de metacrilato	Sepharon HEMA	[126, 127]
Matrices inorgánicas	Silicio	Silicio poroso	[128, 129]
	Vidrio	Fibra de vidrio	[130, 131]
	Dióxido de titanio	Dióxido de titanio	[132]

Los soportes de agarosa son los más frecuentes en cromatografía de afinidad preparativa, llegando a ser utilizados en el 85% de las separaciones de moléculas biológicas, y suele ser el material con el que se comparan el resto de soportes [56].

La popularidad de la agarosa se debe a sus propiedades, donde destacan las ventajas que se recogen en la Tabla 3.15:

**Tabla 3.15. Ventajas de la agarosa como soporte cromatográfico.**

Ventaja	Referencia
Bajo enlace no específico	[40, 41, 56]
Facilidad de activación para la inmovilización del ligando	[56]
Poros grandes	[56]
Relativamente barata	[56]
Estabilidad física y química	[40, 41]
Carga neutra	[40, 41]
Carácter hidrofílico	[40, 41]
Capacidad de activación: puede usarse con muchos ligandos	[40, 41]
Estructura abierta	[40, 41]
Estabilidad en un amplio rango de pH	[40, 41]

Por otra parte, la agarosa (al igual que el resto de matrices formadas por carbohidratos y polímeros orgánicos) presenta baja resistencia mecánica, lo que limita su uso en aplicaciones analíticas que utilizan la *cromatografía de afinidad de baja resolución* [56]. Sin embargo, este problema puede reducirse significativamente utilizando un agente crosslinking [41].

Además, en separaciones analíticas son necesarias algunas características entre las que destacan la rapidez de análisis y unas buenas propiedades de transferencia de materia, que generalmente son aportadas por soportes más rígidos y pequeños que los lechos de agarosa [56].

En este tipo de aplicaciones se suelen utilizar como soporte cromatográfico lechos de sílice, vidrio y algunos polímeros orgánicos (como el estireno-divinilbenceno hidroxilado). Este segundo grupo de materiales pueden ser utilizados en sistemas de

*cromatografía de afinidad de alta resolución, o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [56].*

Otros parámetros a tener en cuenta son el tamaño de poro, el área superficial disponible y la estabilidad de la matriz cromatográfica [56]. Es deseable que el soporte presente estructuras altamente porosas para facilitar la penetración rápida y fácil en el soporte de la fase móvil. Sin embargo, los soportes con poros grandes tienden a presentar baja área superficial por unidad de volumen, lo que limita la cantidad de ligando que puede unirse al soporte [56].

En el caso de cromatografía preparativa a gran escala, como en la purificación de biofármacos, el soporte, además, debe ser capaz de ser higienizado en el proceso sin sufrir ningún daño. Esto requiere resistencia al ataque de agentes limpiadores como bases altamente concentradas o disoluciones que contienen ácidos y agentes caotrópicos, siendo la resistencia al pH una característica esencial en este tipo de procesos (ver Tabla 3.16).

**Tabla 3.16. Materiales de soportes cromatográficos y condiciones de pH que resisten [56].**

<b>Matriz</b>	<b>Intervalo de pH</b>	<b>Matriz</b>	<b>Intervalo de pH</b>
Agarosa	2-14	Polihidroximetacrolatos	2-12
Celulosa	1-14	Copolímeros oxirano-acrílico	0-12
Dextrano	2-14	Copolímeros estireno-divinilbenceno	1-13
Sílice	2-8	Alcoholes polivinílicos	1-14
Vidrio	2-8	N-Aciloil-2-amino-2-hidroxi-1,2-propano	1-11
Poliacrilamidas	3-10		



Este conjunto de propiedades se consigue con materiales como agarosa, pero no con materiales inorgánicos como sílice. Por tanto, todas estas propiedades hacen que los soportes de agarosa sean los más utilizados en purificación de proteínas y otras biomoléculas a gran escala mediante cromatografía de afinidad [56].

Por otra parte, según su geometría, los soportes cromatográficos se pueden clasificar en los siguientes tipos (Figura 3.12):



**Figura 3.12. Clasificación de los soportes cromatográficos según su geometría [6].**

Debido a la necesidad de la utilización de columnas cromatográficas con alta superficie disponible para la activación, habitualmente se utilizan lechos fijos de partículas porosas.

Sin embargo, este tipo de soporte presenta varios inconvenientes importantes:

- **Pérdida de carga** generada, que aumenta los costes e impide que se puedan utilizar caudales elevados, lo que se traduce en separaciones más largas y menos eficientes a escala industrial.
- **Difusión intraparticular** de las moléculas de soluto hacia sus centros activos dentro de los poros del lecho. Esto incrementa el tiempo de procesado ya que el transporte de materia de macromoléculas por difusión es lento. Como

consecuencia, el volumen de líquido necesario para la elución también es mayor, y se obtienen concentraciones bajas de proteína recuperada.

- Formación de **canales preferentes** de flujo.
- Limitaciones de **dispersión axial y radial**.

Algunos de estos factores y el hecho de que el fenómeno de transporte es complicado hacen que el escalado de lechos porosos para su utilización a escala industrial sea un proceso complejo [22].

Para resolver este problema se desarrollaron **lechos cromatográficos continuos o monolitos**, que son un ejemplo de alternativa utilizada en cromatografía de afinidad [8] y que se describen a continuación.

### 3.5 Monolitos.

Para hacer frente a los problemas generados por los lechos porosos, en las últimas décadas se han desarrollado nuevos soportes cromatográficos que disminuyen la pérdida de carga sin disminuir drásticamente la superficie disponible para la adsorción, como monolitos y membranas.

Este tipo de soportes, además, mejoran la transferencia de materia al permitir caudales elevados.

Los monolitos o soportes continuos se definen como soportes cromatográficos de una única pieza compuesta por poros lo suficientemente grandes como para permitir el flujo de la fase móvil a través del lecho [100]. Este tipo de soportes presentan una estructura porosa con canales interconectados que facilitan el flujo de fluidos y resiste caudales elevados, lo que mejora el proceso. Además, el tamaño de poro puede ser optimizado para conseguir una mayor área superficial disponible para la adsorción y para reducir la pérdida de carga [100].

En general, los monolitos son más fáciles de preparar y más baratos que los lechos fijos, y la columna cromatográfica se empaqueta más rápido con los monolitos. Esto se debe a que pueden prepararse, a menudo, directamente en la columna cromatográfica, evitando el empaquetado del soporte, o eliminando la etapa de clasificación de tamaños y empaquetado que son necesarios en los lechos porosos particulados [7].

Además, generan una menor pérdida de carga y permiten la utilización de caudales mayores, con lo que la separación producida es más rápida y eficiente.

Por todo lo anteriormente mencionado, los monolitos han sido empleados en multitud de procesos cromatográficos diferentes [133]:

- Cromatografía de afinidad.
- Cromatografía de fase reversa.
- Cromatografía de interacciones hidrofóbicas.
- Cromatografía de intercambio iónico.
- Cromatografía IMAC.
- Cromatografía de exclusión por tamaños.
- Biorreactores monolíticos para inmovilización de enzimas.
- Separación de agregados de proteínas, células y virus.
- Etc.

Algunos de los soportes cromatográficos monolíticos comerciales disponibles se resumen en la siguiente tabla (Tabla 3.17).

**Tabla 3.17. Monolitos comerciales y sus especificaciones [134].**

<b>Nombre comercial</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Material</b>	<b>Diámetro del canal</b>
<b>CIM</b>	BIA Separations	Polimetacrilato	1500 nm
<b>UNO</b>	BIO-Rad	Poliacrilamida	1000 nm
<b>SWIFT</b>	Isco	Polimetacrilato	1500 nm
<b>Ultimate</b>	LC-Packings	Poliestireno divinilbenceno	No disponible
<b>Chromolith</b>	Merck	Sílice	Macroporos 2 $\mu\text{m}$ Microporos 13 nm

Además, los monolitos utilizados en cromatografía se dividen en dos grandes tipos, según su naturaleza: orgánicos e inorgánicos.

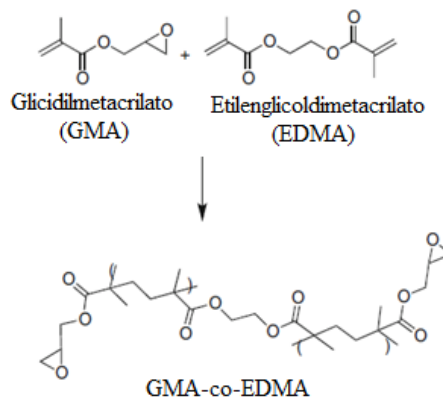
### **3.5.1 Monolitos orgánicos o poliméricos.**

Existe una gran variedad de polímeros orgánicos empleados en la fabricación de monolitos para cromatografía líquida [5]. Sin embargo, sólo una pequeña parte ha sido utilizada en cromatografía de afinidad en monolitos (cromatografía líquida que utiliza un soporte monolítico con un ligando biológico) [30].

La mayor parte de estos monolitos orgánicos utilizan copolímeros de GMA (glicidil metacrilato) y EDMA (etilenglicol dimetacrilato) [34, 38, 107, 123]. Los motivos por los que estos monolitos GMA/EDMA son ampliamente utilizados en cromatografía de afinidad en monolitos son los siguientes [30]:

- Están disponibles comercialmente [38, 107, 123].
- Los materiales son relativamente fáciles de preparar de forma hidrofílica, lo que implica un bajo enlace no específico para la mayoría de ligandos biológicos [107, 123].
- Existen diferentes formas de modificar químicamente estos compuestos, lo que hace que sean adecuados para la unión de ligandos [26].
- Pueden ser preparados con gran variedad de tamaño de poro, forma y área superficial [26].

Por todos estos motivos, los monolitos GMA/EDMA son utilizados con numerosos ligandos y separaciones [38, 107].



**Figura 3.13. Estructura de los monómeros y del copolímero GMA/EDMA [30].**

Los monolitos orgánicos o poliméricos se forman mediante una polimerización radical de una mezcla homogénea que contiene monómeros, un agente *crosslinking*, un iniciador radical y un agente porógeno, generalmente ciclohexanol o 1-dodecanol).

En este tipo de procesos, la iniciación de la polimerización se puede producir de dos formas: por iniciación fotoquímica [135] o térmica [38, 107].

### 3.5.2 Monolitos inorgánicos o de silicio.

Los monolitos formados por polímeros inorgánicos como sílice también son utilizados en cromatografía de afinidad con monolitos [38, 107] .

Estos monolitos fueron introducidos para su uso en HPLC por Minakuchi y col. [50] en 1996. Se preparan mediante un método sol-gel, y generalmente se emplea como sol inicial un tetrametoxilano (TMOS) y polióxido de etileno (PEO) en agua.

Las ventajas más importantes de este tipo de monolito son las siguientes [30, 95, 107, 126]:

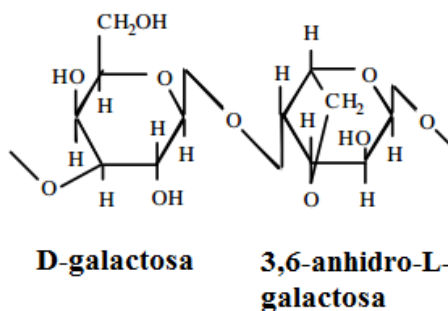
- Buena transferencia de materia.
- Baja pérdida de carga.
- Disponibilidad comercial.
- Posibilidad de modificar su estructura para enlazar ligandos.
- Posee la misma estructura química que las partículas de silicio, por lo que se pueden utilizar los mismos métodos de inmovilización que para este soporte.
- Su estructura porosa mejora la accesibilidad hacia su superficie respecto a los monolitos GMA/EDMA, lo que aumenta la cantidad de proteína inmovilizada.

Sin embargo, como principal desventaja, este tipo de soporte presenta las mismas restricciones en la utilización del pH (Tabla 3.16) [107].

Los métodos de inmovilización que se pueden aplicar en este tipo de monolito son los mismos que en las partículas de sílice [95, 107, 126].

### 3.5.3 Monolitos de agarosa.

La agarosa es un polímero lineal formado por unidades alternadas de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa, entrecruzadas para formar una red porosa e hidrofílica [86].



**Figura 3.14. Estructura de la agarosa [41].**

La estructura de la agarosa gelifica a temperaturas entre 32 y 45°C, y funde a temperaturas entre 89 y 95°C [23].

Cuando la agarosa gelifica su estructura se transforma, en una primera etapa de gelación, desde una espiral desordenada a una estructura en forma de doble hélice, y posteriormente da lugar a estructuras de doble hélice empaquetadas [136].

Este gel forma una red tridimensional de fibras (doble hélice) de agarosa [137], y consiste en una estructura macroporosa con regiones ricas en polímero (fibras) y regiones ricas en disolvente (poros que contienen agua), por lo que el proceso de gelación también puede entenderse como un proceso de separación de fases [138].

Debido a la popularidad de la agarosa como soporte cromatográfico, los monolitos de agarosa presentan grandes propiedades, que se basan fundamentalmente en las de la agarosa [40, 41]:

- Estabilidad física y química.
- Carga neutra.
- Carácter hidrofílico.
- Estructura abierta.
- Capacidad de utilizarse con muchos tipos de ligando.
- Bajo enlace no específico.
- Estabilidad en un rango amplio de pH (Tabla 3.16).
- Posibilidad de preparar estos monolitos de gran variedad de formas y tamaños.

Sin embargo, la mayor limitación de la utilización de este tipo de material como soporte en procesos cromatográficos es su baja resistencia mecánica. Sin embargo, este aspecto puede ser mejorado mediante la adición de un agente crosslinking [41].



## **Capítulo 4.**

# **Preparación y Caracterización del Monolito de Agarosa Superporosa**



Una vez establecidos los conocimientos teóricos previos, a continuación se procederá a la descripción de la preparación y caracterización del soporte cromatográfico empleado.

#### **4.1 PREPARACIÓN DEL MONOLITO.**

Como se mencionó en la introducción, este monolito de Agarosa Superporosa fue desarrollado por Larsson [39] y utilizado posteriormente por Gustavsson y Larsson [42].

Aunque ha sido empleado en diferentes aplicaciones cromatográficas como cromatografía de afinidad, gel de electroforesis o inmovilización de enzimas [42-44], hasta ahora nunca había sido empleado en cromatografía IMAC.

El método empleado en la preparación de este monolito es, en términos generales, la misma que la empleada por Gustavsson y Larsson [42]. Sin embargo, **se han modificado algunas condiciones con el fin de mejorar y optimizar las propiedades del soporte cromatográfico.**

En primer lugar, **su resistencia mecánica** ha sido mejorada por la utilización de **Agarosa D5**, un tipo de agarosa con alta fuerza de interacción de gel y una estructura altamente interconectada.

Además, se han **estudiado y optimizado las condiciones de formación del monolito**, de forma que el resultado final pueda ser utilizado en cromatografía IMAC para un caudal elevado de hasta 50 mL/min.

La producción del monolito de Agarosa Superporosa está basada en la formación de una emulsión generada al mezclar un polisacárido (la fase continua) y un agente porógeno.

Este agente porógeno está compuesto por un disolvente orgánico y un detergente, y genera la porosidad de la estructura cuando el polisacárido gelifica, es decir, cuando se alcanzan temperaturas por debajo de la temperatura de gelación.

Dicho agente porógeno es eliminado después de la gelación de la fase continua mediante el lavado con agua desionizada.

A continuación se determinarán las variables más importantes en la formación del monolito.

#### 4.1.1 Materiales utilizados.

Una vez vistas las bases teóricas en las que se basa el presente trabajo, se procedió a realizar el estudio y optimización de las condiciones de formación del monolito con el fin de mejorar sus características.

##### 4.1.1.1 Reactivos.

Los reactivos utilizados en la preparación y caracterización del monolito de Agarosa Superporosa se recogen en la Tabla 4.1:

**Tabla 4.1. Reactivos utilizados en la formación y caracterización del monolito de Agarosa Superporosa [38, 39, 42, 43].**

Compuesto	Proveedor
Agarosa D5	Laboratorios Conda (España)
Ciclohexano	Panreac (España)
n-heptano	Panreac (España)
Tween 80	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Etanol	GPR Rectapur (España)
Blue Dextrano	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Azida sódica	Panreac (España)

#### 4.1.1.2 Equipos.

Los equipos utilizados en la preparación y caracterización del monolito de Agarosa Superporosa se recogen en la Tabla 4.2:

**Tabla 4.2. Equipos utilizados en la formación y caracterización del monolito de Agarosa Superporosa.**

Equipos	Modelo	Proveedor
Baño termostatzado	Tectron Bio JP	Selecta (España)
Placa agitadora	Agimatic-N JP	Selecta (España)
Agitador de cabeza	Eurostar Power Basic	Ika (España)
Microtomo	Vibratome Microm HM 650 V	Heidelberg (Alemania)
Microscopio óptico	Leica DM 1000	Leica Microsystems (España)
Microscopio ESEM	Quanta FEG 250	FEI, Thermo Fisher Scientific (Alemania)

#### 4.1.2 Emulsiones.

Como se ha comentado anteriormente, la formación del presente monolito se realiza mediante la formación de una emulsión, donde la fase dispersa genera los poros presentes en la estructura monolítica.

Una emulsión se define como una dispersión termodinámicamente inestable de dos líquidos inmiscibles (generalmente de naturaleza apolar y polar) en la que la fase denominada **fase dispersa o interna** forma gotas de pequeño tamaño (de 0.1 a 100 micras) y se encuentra dispersa en el seno de la **fase continua o externa** [139].

En la práctica, toda emulsión debe contener un emulsionante, es decir, una sustancia anfifílica que facilite la formación de la emulsión disminuyendo la tensión interfacial entre la fase apolar (oleosa) y la polar (acuosa). Además, este emulsionante aporta cierta estabilidad física durante un tiempo dependiendo de la composición de la emulsión, características de procesado y condiciones externas durante el envejecimiento de la misma [139].

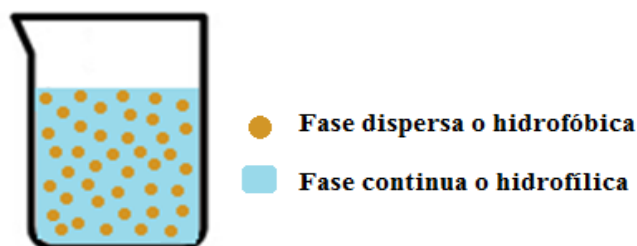
Dependiendo de la naturaleza de las fases dispersa y continua, las emulsiones se clasifican como O/W, W/O [140].

Una emulsión O/W o emulsión aceite en agua es aquella en la que la fase dispersa consiste en pequeñas gotas de un líquido de fase aceite, por tanto hidrófoba, y una fase continua dominada por un medio normalmente acuoso [139].

Además, la estabilidad física de una emulsión está condicionada por el resultado de un balance complejo de fuerzas de atracción y repulsión entre las gotas de fase dispersa, condicionado por las condiciones fisicoquímicas del medio continuo [141].

Es también importante el carácter apolar de la fase oleosa ya que influye en las propiedades interfaciales de los emulsionantes. Por ejemplo, afecta a la intensidad de los cambios conformacionales de las proteínas adsorbidas en la interfase [142, 143].

En este trabajo, la emulsión que se emplea es una emulsión O/W, es decir, aceite en agua. Por tanto, la fase continua es la fase acuosa, mientras que la fase dispersa será la fase orgánica o hidrofóbica (Figura 4.1.).



**Figura 4.1. Emulsión formada en la preparación del monolito.**

### 4.1.3 Selección del material estructural de la matriz cromatográfica (fase continua).

La primera etapa en la preparación del monolito es la selección del material de la matriz cromatográfica, que corresponde a la fase continua de la emulsión de formación del monolito.

Según Larsson [39], puede utilizarse cualquier polisacárido (agar, agarosa, alginato, dextrano, carrageno, quitosano, celulosa, almidón, y cualquiera de sus mezclas) para la preparación de un monolito superporoso.

Dentro de todos estos posibles materiales, se selecciona la agarosa con el fin de comparar las propiedades de este nuevo soporte monolítico con el monolito cerámico recubierto de agarosa empleado previamente [38].

Además, como se vio en capítulos anteriores, la agarosa presenta propiedades adecuadas para este tipo de cromatografía como estabilidad física y química, carga neutra, carácter hidrofílico, estructura abierta, capacidad de utilizarse para la fijación de diversos tipos de ligando, bajo enlace no específico y estabilidad en un rango amplio de pH [40, 41].

Sin embargo, la principal desventaja de la utilización de la agarosa como soporte cromatográfico es su baja estabilidad mecánica. Sin embargo, este problema puede reducirse de forma significativa utilizando un *crosslinking* químico [41].

*Con el fin de mejorar la estabilidad mecánica de la agarosa*, se ha seleccionado la **Agarosa D5** como material estructural. Este tipo de agarosa es una agarosa lineal con un alto peso molecular y bajo contenido en azufre, lo que proporciona una alta interacción entre cadenas. Por tanto, posee una fuerza de gel mayor que la agarosa típica, mejorando sus propiedades de resistencia mecánica, lo que hace que sea un material adecuado para su utilización en cromatografía [144].

#### 4.1.4 Selección de la fase orgánica (fase dispersa).

Una vez que se ha seleccionado el polisacárido que va a formar la fase continua, es necesario seleccionar la fase orgánica o fase dispersa en la formación de la emulsión.

En este tipo de monolitos, es posible utilizar diferentes fases orgánicas, como n-heptano, ciclohexano, tolueno y aceite de soja [39].

Para poder seleccionar la mejor fase orgánica para la aplicación en cromatografía IMAC, se utilizaron las fases orgánicas n-heptano y ciclohexano, con la misma cantidad y proporción de fase orgánica-fase continua-detergente (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3. Propiedades del monolito según la fase orgánica.**

Fase orgánica	Aspecto	Resistencia mecánica en la manipulación
n-heptano	Fibras	Baja
ciclohexano	Homogéneo	Moderada-alta *

\* Según la concentración.

Por una parte, se observó que los monolitos preparados con n-heptano como fase orgánica presentaban una apariencia fibrilar, la cual hacía que se separasen en hilos cuando era manipulado sin aplicar prácticamente ninguna fuerza.

Por otra parte, los monolitos preparados con ciclohexano presentaban una apariencia homogénea y mejor resistencia mecánica, lo que permitía su manipulación sin cambios en su morfología o estructura. Además, se podía cortar fácilmente así como empaquetar en la columna sin dificultad.

Esto se debe a que el carácter apolar de la fase dispersa influye en las propiedades interfaciales de los emulsionantes. De esta forma, al utilizar diferentes compuestos como fase oleosa el resultado obtenido varía debido a la formación de interfases con propiedades diferentes [142, 143].



Por estos motivos, la **fase orgánica** seleccionada para la preparación del monolito es el **ciclohexano**, ya que proporciona mejores resultados en cuanto a las características del monolito obtenido.

#### **4.1.5 Selección de las condiciones de formación del monolito.**

Una vez se han escogido los componentes más importante en la preparación del monolito (fase continua y fase orgánica), es necesario considerar las condiciones de operación, que van a ser determinantes en las propiedades del monolito obtenido.

En primer lugar, según bibliografía [39, 145], la **porosidad** óptima del monolito para obtener la máxima porosidad posible garantizando la continuidad de la estructura de polisacárido debe tener un valor intermedio entre **25-40%** en este tipo de aplicaciones.

Además, utilizando estos valores (25-40%) se asegura que el diámetro de poro y las distancias entre los poros convectivos o superporos tengan valores similares, mejorando las propiedades de transferencia de materia [39, 145].

Tanto el diámetro del superporo como la cantidad de superporos dentro de la estructura del monolito son función de la cantidad de detergente utilizado, de la velocidad de agitación y del tiempo que transcurre entre la formación de la emulsión y la gelificación de la Agarosa D5 [39, 145].

Por estos motivos, es necesario estudiar y optimizar estos parámetros en la formación del monolito de Agarosa Superporosa con el fin de obtener las condiciones más adecuadas para la aplicación deseada.

##### **4.1.5.1 Efecto de la concentración de Agarosa D5.**

Algunas propiedades del monolito como la resistencia mecánica y la densidad están íntimamente relacionadas con la concentración del polisacárido empleado.

Para seleccionar la concentración óptima de fase continua se prepararon varios monolitos con diferentes concentraciones de Agarosa D5, las cuáles se resumen en la Tabla 4.4.

**Tabla 4.4. Concentraciones de Agarosa D5 y sus propiedades en el monolito.**

6.0 % w/v Agarosa D5 en agua	Estructura muy densa, no deja pasar fácilmente agua a través de él Resistente a la manipulación
3.0 % w/v Agarosa D5 en agua	Deja pasar agua fácilmente a través de él Resistente a la manipulación
1.5 % w/v Agarosa D5 en agua	Deja pasar agua fácilmente a través de él Frágil en la manipulación

En primer lugar, se utilizó la concentración de fase continua empleada habitualmente en la producción de monolitos con fines cromatográficos (6.0 % w/v Agarosa D5 en agua) [42, 43].

Sin embargo, la Agarosa D5, por su mayor densidad de entrecruzamiento, presenta una estructura muy compacta que no permite que el agua circule fácilmente a través de ella por gravedad.

Para mejorar el flujo a través del soporte monolítico, se decidió reducir la concentración de fase continua, hasta un valor de 1.5 % w/v Agarosa D5 en agua.

Con esta nueva concentración, el monolito presentaba una resistencia mecánica baja, ya que se fracturaba fácilmente en las etapas que requerían su manipulación (lavado, corte y empaquetado de la columna).

Como consecuencia, se utilizó una concentración intermedia de 3.0 w/v Agarosa D5 en agua, con lo que se consigue que las propiedades mecánicas se vean mejoradas: en primer lugar, el monolito no se fractura durante la manipulación y, además, permite que circule agua fácilmente a través de él por gravedad.

Como conclusión, se estimó que la **concentración** más adecuada de Agarosa D5 para la preparación del monolito de Agarosa Superporosa fuera del **3.0 % w/v Agarosa D5** en agua ya que presenta buenas propiedades de resistencia mecánica y permite el flujo de agua por gravedad sin fracturarse durante su manipulación.

#### **4.1.5.2 Efecto de la adición de detergente [39].**

La presencia de detergentes o emulsionantes en la preparación del monolito es fundamental ya que consigue que tanto la fase continua como la fase orgánica se mezclen y formen una emulsión.

Un detergente o emulsionante es una molécula anfifílica que tiende a migrar y adsorberse rápidamente en la interfase aceite-agua, lo que favorece la formación de gotas con un menor consumo de energía. Como consecuencia, reduce la tensión superficial, lo que hace que se propicie la formación de la emulsión [139].

En fase acuosa, los emulsionantes de bajo peso molecular pueden formar diversas estructuras de asociación, que pueden ser de naturaleza micelar e incluso líquido-cristalina [146]. Además, existen relaciones entre los diagramas de fase de tensioactivos y la estabilidad de las correspondientes emulsiones [147].

En la interfase, este tipo de compuestos forman capas monomoleculares, aunque en ciertas condiciones pueden formar multicapas de naturaleza líquido-cristalina, que aumenta la viscoelasticidad de la interfase, favoreciendo el procesado y estabilidad de las emulsiones.

Un concepto importante para la selección de un emulsionante o una mezcla óptima de emulsionantes, al menos para los de baja masa molecular, es el balance hidrófilo-lipófilo, HLB (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*). Los emulsionantes son de naturaleza anfifílica, pero pueden tener una mayor o menor tendencia a solubilizarse en medio oleoso o acuoso, dependiendo de la importancia relativa de sus grupos hidrófilos (cabezas polares o grupos etoxilados) e hidrófobos (cadenas largas hidrocarbonadas,  $C \geq 12$ ).

Si el emulsionante tiende a ser soluble en agua será útil para formar emulsiones O/W. Por el contrario, si su parte apolar es dominante se disolverá preferentemente en un medio oleoso y, como consecuencia, será más útil para la formación de emulsiones W/O.

Desde un punto de vista cuantitativo, existen tres conceptos con denominaciones similares pero definiciones diferentes: **HLB**, número **HLB** y la temperatura **HLB**, o **PIT** (temperatura de inversión de fases) [148].

- El **HLB** indica la tendencia dominante, hidrófila o lipófila, de un emulsionante en una formulación y condiciones externas concretas. Es decir, es sensible al tipo de la fase oleosa de la emulsión, a los tipos y concentraciones de aditivos presentes tanto en la fase acuosa como en la oleosa y también a la temperatura.
- El **número HLB** se asocia a la estructura química de cada emulsionante, independientemente de las condiciones específicas de su aplicación. Es uno de los criterios principales para la selección de los tensioactivos a emplear en emulsiones. La Tabla 4.5 presenta una selección de tensioactivos y sus correspondientes **HLB**.
- La **temperatura HLB** (o **PIT**), temperatura de inversión de fases es una propiedad de la emulsión en sí y no del emulsionante. Es la temperatura a la que las propiedades hidrófilas y lipófilas de un tensioactivo no iónico se equilibran. En el caso de los tensioactivos iónicos, el **HLB** no varía significativamente con la temperatura pero si es sensible a la presencia de cotensioactivos.

Tabla 4.5. Números HLB de tensioactivos comerciales utilizados como emulsionantes [139].

Tipo de tensioactivo comercial	Compuesto	Número HLB	Distribuidor
Span 85	Trioleato de sorbitano	1.8	Uniqema Inc (ICI)
Monestriol GE	Monoestearato de glicerina	3.8	Union Deriva, S.A.
Span 80	Monooleato de sorbitano	4.3	Uniqema Inc (ICI)
Span 60	Monoestearato de sorbitano	4.7	Uniqema Inc (ICI)
Brij 52	Hexadecil eter dietoxilado	5.3	Uniqema Inc (ICI)
Span 40	Monopalmitato de sorbitano	6.7	Uniqema Inc (ICI)
Span 20	Monolaurato de sorbitano	8.6	Uniqema Inc (ICI)
Brij 30	Lauril eter polietoxilado	9.7	Uniqema Inc (ICI)
Brij 97	Oleil eter polietoxilado	12.4	Uniqema Inc (ICI)
Triton X-100	Octilfenol polietoxilado	13.5	Dow Chemical Company
Tween 60	Monoestearato de sorbitano polietoxilado	14.9	Uniqema Inc (ICI)
Tween 80	Monooleato de sorbitano polietoxilado	15.0	Uniqema Inc (ICI)
Tween 20	Monolaurato de sorbitano polietoxilado	16.7	Uniqema Inc (ICI)

Los emulsionantes con número HLB comprendido entre 8 y 18 se recomiendan para formar emulsiones O/W [139]. En el caso de las emulsiones W/O, los intervalos varían ligeramente según la fuente: entre 4 y 6 [149] o entre 3 y 6 [150].

En la presente aplicación, el detergente empleado debe ser del tipo estabilizante de sistemas aceite en agua (O/W), ya que debe estabilizar la interfase entre el disolvente orgánico y la fase continua, que se encuentra en mayor proporción. Por tanto, el estabilizante o detergente empleado debe tener un número HLB comprendido entre 8 y 18 [139].

Además, si la cantidad de detergente es baja, no se forman los superporos ya que no hay cantidad de detergente suficiente para estabilizar ambas fases y formar la emulsión. Por el contrario, si la cantidad empleada es alta, se produce un fenómeno de coalescencia de la fase dispersa [151], obteniéndose unos superporos menores en número pero presentan un diámetro mayor, lo que no es interesante en términos de transferencia de materia.

Por tanto, la cantidad de detergente óptima presente en la emulsión debería ser la adecuada para poder obtener gran cantidad de poros convectivos con un diámetro que no sea demasiado pequeño.

En la preparación de este monolito se escogió un volumen de **4 ml de Tween 80** (Monooleato de sorbitano polietoxilado, con un número de HLB de 15.0) en un volumen total de emulsión de 150 ml, y se vio que los resultados, como se muestran en la siguiente sección (4.2.) fueron satisfactorios.

#### **4.1.5.3 Efecto de la cantidad de fase orgánica [39].**

La fase orgánica (ciclohexano) es un componente imprescindible en la emulsión ya que proporciona la porosidad al monolito. Asimismo, pueden utilizarse diferentes concentraciones de disolvente orgánico con el fin de obtener diferente porosidad.

Como se ha mencionado anteriormente, la porosidad óptima corresponde al valor de entre el 25-40%, por tanto, la cantidad de fase orgánica debe utilizarse en esa proporción [39, 145].

Se ha escogido un valor de **46 ml de ciclohexano** en un volumen total de emulsión de 150 ml con el fin de asegurar que la porosidad sea la deseada [39, 145].

#### **4.1.5.4 Efecto de la velocidad de agitación y del tiempo transcurrido entre la formación de la emulsión y la gelificación del polisacárido [39].**

Como es lógico, la velocidad de agitación es un factor importante en el proceso de formación de los poros convectivos o superporos.

Debido a la diferencia de composición entre las fases orgánica y continua, existen diferencias significativas de densidad entre ellas, lo que tiende a producir una separación de fases, que en la práctica supone la rotura de la emulsión. Para evitar esto, se compensa la inestabilidad termodinámica de estos sistemas mediante lo que se puede denominar *estabilidad cinética* [139].

Es decir, la estabilidad de la emulsión está relacionada con el mantenimiento de algunos parámetros importantes constantes a lo largo del tiempo, como el tamaño medio de gota, la distribución espacial de las mismas y sus propiedades funcionales para la aplicación prevista de la emulsión [139].

En este caso, lo que nos interesa no es conseguir gran número de poros de diámetro pequeño, sino un menor número de poros convectivos altamente interconectados para favorecer el flujo de la fase continua a través del monolito y mejorar así la transferencia de materia y la eficiencia del proceso.

Además, es conveniente la existencia de poros de menor tamaño para aumentar el área superficial con el fin de disponer de mayor superficie de adsorción.

Cuanto mayor sea la velocidad de agitación, más pequeñas serán las gotas de disolvente orgánico en la emulsión lo que hace que, al tener mayor superficie entre fases, sea necesario más detergente para poder estabilizar la superficie ambas fases.

Por tanto, una emulsión producida a baja velocidad de agitación (por ejemplo, unos 500 rpm) produce un producto superporoso altamente interconectado, mientras que a velocidades mayores no se produciría la formación de superporos sino de una mayor cantidad de pequeños poros distribuidos de forma homogénea.

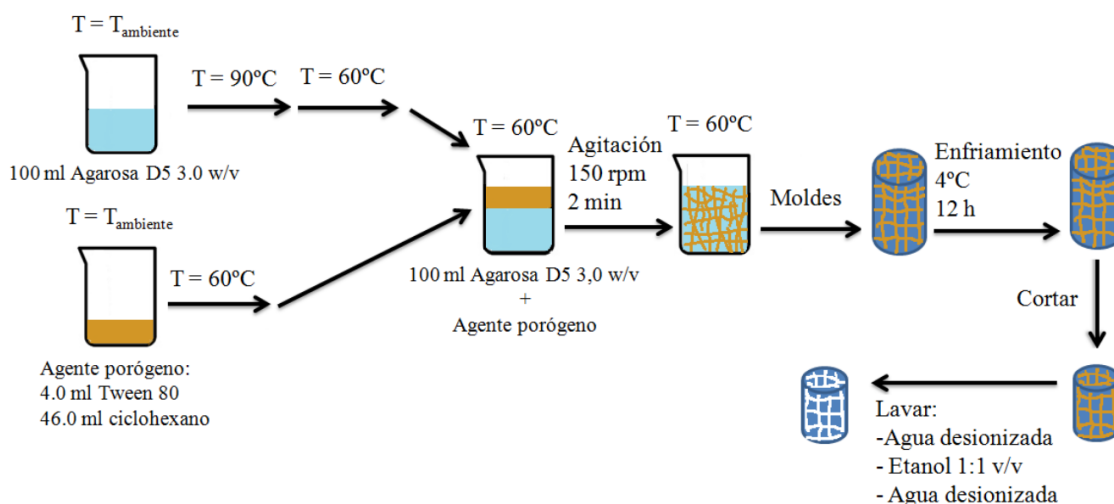
Por otra parte, el tiempo que transcurre entre la formación de la emulsión y la gelación del polisacárido afecta en el número de poros y el tamaño de éstos ya que, al cesar la agitación, la emulsión comienza a degradarse poco a poco, lo que significa que cada vez se forman menos poros con mayor diámetro [145].

Por tanto, la agitación escogida fue de **500 rpm** para asegurar la formación de superporos altamente interconectados y el **tiempo que tarda la emulsión en gelificar** deberá ser **lo más baja posible** con el fin de obtener la distribución de poros deseada.

#### **4.1.6 Método propuesto para la preparación del monolito de Agarosa Superporosa.**

Como se mencionó anteriormente, el método utilizado en la preparación del monolito se basa en el empleado por Larsson [39] y Gustavsson y Larsson [42], ligeramente modificado (Figura 4.2).





**Figura 4.2. Esquema de la formación del monolito de Agarosa Superporosa.**

Para ello, en primer lugar, se calienta una suspensión acuosa de Agarosa D5 (3.0% w/v) en un agitador magnético hasta que alcance una temperatura superior a la temperatura de fusión (unos  $90^{\circ}\text{C}$ ), utilizando una agitación vigorosa constante para asegurar un calentamiento homogéneo.

Tras alcanzar esta temperatura, la Agarosa D5 se deja enfriar hasta los  $60^{\circ}\text{C}$  agitando vigorosamente para que el enfriamiento sea lo más homogéneo posible.

Por otra parte, el agente porógeno (4.0 ml Tween 80 y 46.0 ml de ciclohexano) se calienta en un baño termostatzado hasta alcanzar los  $60^{\circ}\text{C}$ .

Cuando ambas disoluciones (fase continua y agente porógeno) alcanzan la temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$ , se mezclan y se agitan durante 2 min en un agitador de cabeza a 500 rpm.

La emulsión generada se introduce rápidamente en los moldes cilíndricos y se llevan al frigorífico, donde se mantienen durante 12 h a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ .

Una vez se ha formado la estructura sólida, los monolitos se cortan con la longitud deseada (2 cm) y se lavan con abundante agua desionizada en primer lugar, después con etanol (1:1 v/v) para retirar los restos orgánicos que pudiesen quedar, y finalmente con agua desionizada.

## 4.2 CARACTERIZACIÓN DEL MONOLITO DE AGAROSA SUPERPOROSA.

Tras la preparación de los monolitos, es necesaria su caracterización.

Para ello, algunas de sus propiedades más importantes como porosidad y área superficial serán evaluadas mediante dos aproximaciones diferentes: en primer lugar, se utilizará un **método de procesamiento de imágenes** utilizando el software *ImageJ*. Por otra parte, se utilizará otros **métodos tradicionales** basados en bibliografía para comparar y validar estos resultados.

### 4.2.1 Método de procesamiento de imagen.

*ImageJ* es un software libre de procesamiento de imagen desarrollado por Wayne Rasband en el Instituto Nacional para la Salud (National Institutes for Health, NIH) [152, 153].

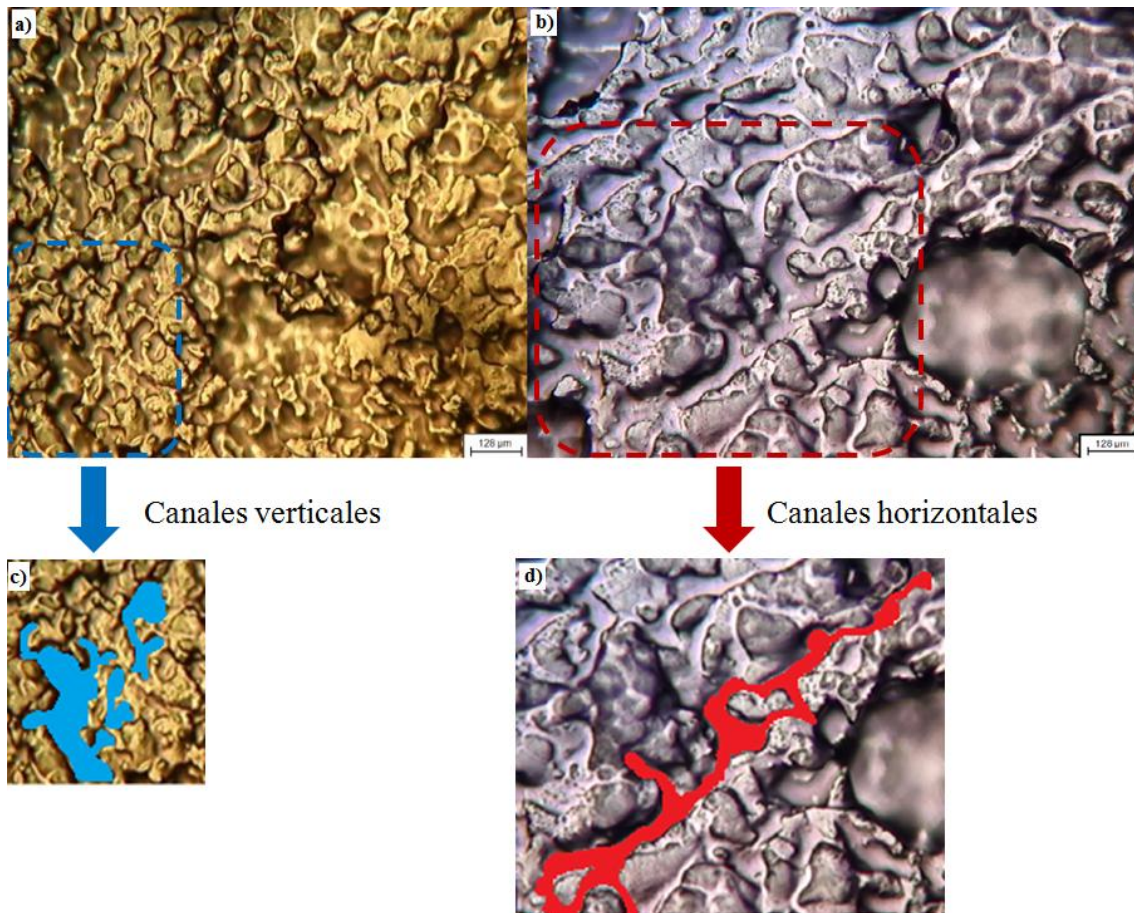
Se creó para su utilización en el procesamiento de imágenes médicas en el sistema operativo Mac, pero en la actualidad es utilizado en campos tan diversos como la biología molecular, la astrofísica o el procesamiento de partículas gracias a sus múltiples *plugins*. Además, puede ser utilizado en diferentes plataformas como Windows, Mac, Linux, etc [153, 154].

A partir de las imágenes, el software modifica la imagen y es capaz de identificar diferentes regiones, a partir de las cuales calcula distancias y ángulos y, por tanto, puede calcular áreas, perímetros, diámetros, etc. [153].

En este trabajo, se utilizó dicho *software* para determinar, a partir de las imágenes ESEM obtenidas, algunas de las propiedades más importantes de los canales del monolito.

Para ello, se cortaron diferentes monolitos de forma homogénea en láminas de 200-300  $\mu\text{m}$  utilizando un microtomo, y fueron evaluadas de forma individual bajo el microscopio óptico y ESEM.

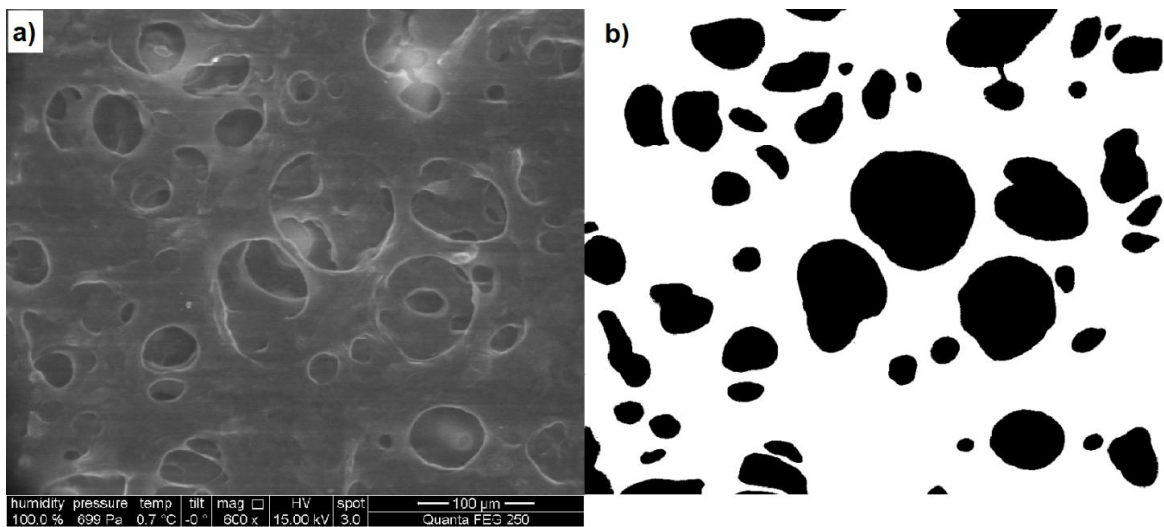
En las imágenes obtenidas mediante el microscopio óptico (Figura 4.3) se observa la porosidad de monolito y la presencia de macrocanales convectivos. Además, éstas son adecuadas para la determinación de la porosidad.



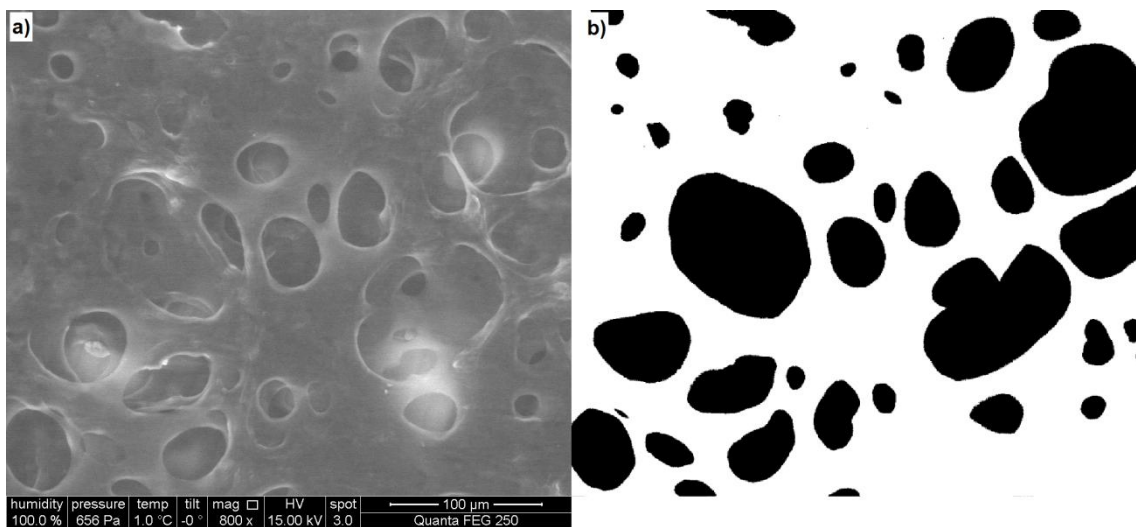
**Figura 4.3. Imágenes del monolito utilizando un microscopio óptico, donde se observan los macroporos y los canales convectivos, tanto verticales (a y c) como horizontales (b y d).**

En las Figura 4.3a) y Figura 4.3b) se puede observar la estructura monolítica formada por macrocanales o canales convectivos, que permiten el flujo a una velocidad elevada sin presentar pérdida de carga importante.

Por otra parte, las imágenes obtenidas mediante ESEM (Figura 4.4a) y Figura 4.4a) son útiles para la determinación de la distribución del diámetro Feret y, a partir de él es posible determinar el diámetro de Sauter.



**Figura 4.4. Procesado de la imagen obtenida: a) Imagen del monolito obtenida con el microscopio ESEM, b) Imagen a) procesada mediante *Image J*.**



**Figura 4.5. Procesado de la imagen obtenida: a) Imagen del monolito obtenida con el microscopio ESEM, b) Imagen a) procesada mediante *Image J*.**

En las Figura 4.4a) y Figura 4.5a) se muestran las imágenes obtenidas por ESEM, donde los huecos que se observan corresponden a los macroporos.

Estas imágenes (Figura 4.4a) y Figura 4.5a) fueron procesadas mediante *ImageJ* y se obtuvieron las Figura 4.4b) y Figura 4.5b), a partir de las cuales es posible determinar

las propiedades más importantes como el número de poros, perímetro, área total y tamaño medio de poro así como las distribuciones de diámetro mínimo Feret mediante el software *ImageJ*.

Los resultados obtenidos se mostrarán en las siguientes secciones (4.2.1.1. - 4.2.1.4).

#### 4.2.1.1 Distribución del diámetro Feret.

El diámetro de poro es un factor decisivo en las propiedades de flujo y área superficial del monolito.

Además, es un factor esencial a la hora de definir su aplicación específica.

A partir de las fotos obtenidas mediante ESEM, el software identifica los poros y los convierte en sombras, como se puede observar en las Figura 4.4b) y Figura 4.5b). Estas sombras son tratadas como si fuesen partículas, y a partir de ellas el programa genera los datos de porosidad, perímetro y diámetro de Feret de cada poro.

Por tanto, el tamaño de poro es caracterizado mediante el diámetro de Feret, que se define como la distancia entre dos tangentes paralelas en lados opuestos de la imagen de una partícula orientada de forma aleatoria. Así, se van obteniendo distancias entre tangentes en diferentes orientaciones, siendo la media de todas ellas la que determina el diámetro de Feret.

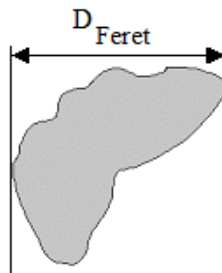


Figura 4.6. Diámetro de Feret para la orientación del eje x.

Además, mediante *ImageJ* también se puede obtener el diámetro mínimo Feret, que se utiliza para describir la anchura de la proyección de una partícula, cuando ésta se encuentra en su posición más estable [16].

Las distribuciones de diámetros Feret obtenidas de las imágenes ESEM mostradas en la Figura 4.4b) y Figura 4.5b) se describen en las Figura 4.7 y Figura 4.8.

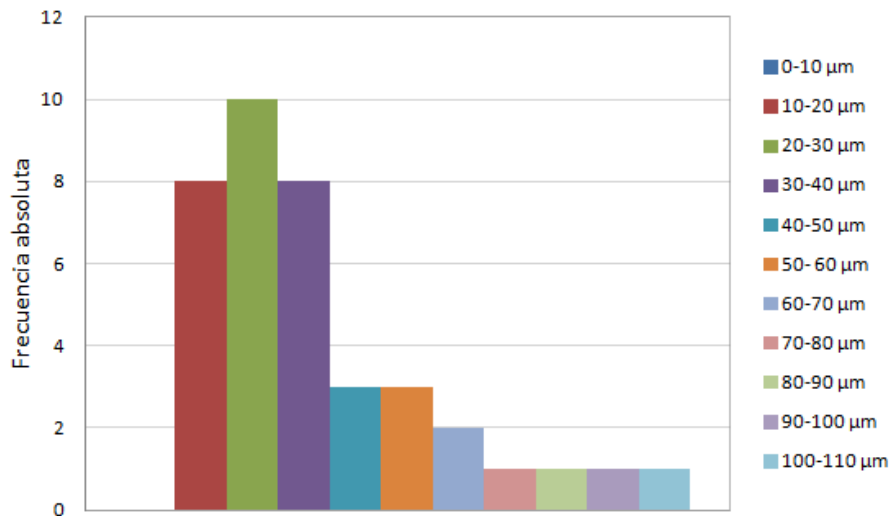


Figura 4.7. Distribución del Diámetro de los canales de la Figura 4.4b).

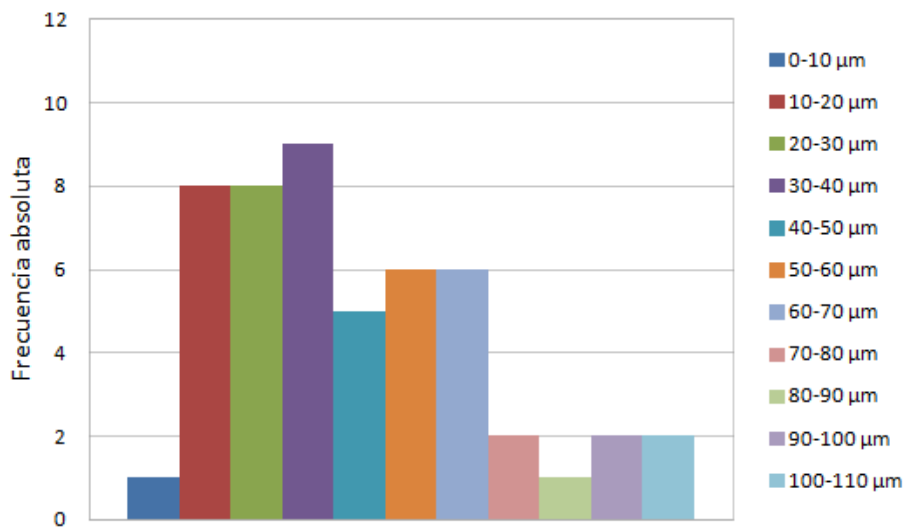
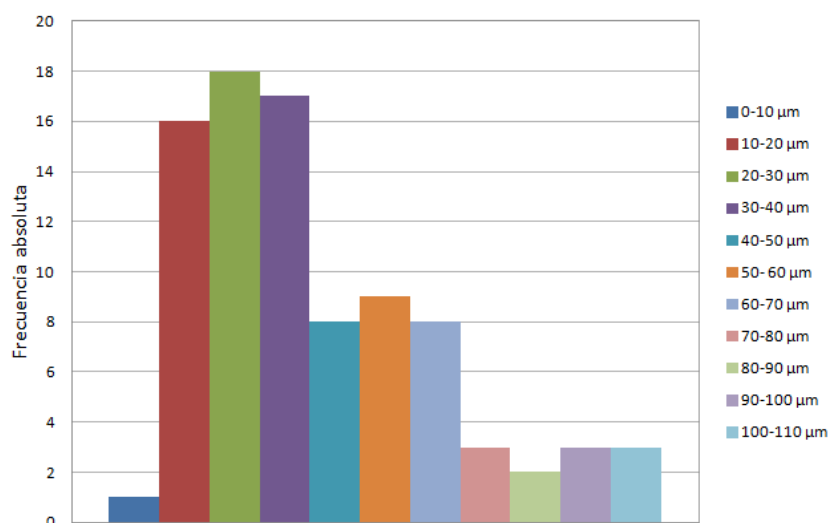


Figura 4.8. Distribución del diámetro de los canales de la Figura 4.5b).

En ellas, se observa que la distribución de macroporo es, en ambas, similar.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, y que las imágenes utilizadas son del mismo monolito, es posible adicionar los resultados obtenidos en ambas imágenes y obtener así la distribución de diámetro del monolito, que se muestra en la Figura 4.9.



**Figura 4.9. Distribución del diámetro de los canales en las imágenes anteriores (Figura 4.7 y Figura 4.8).**

En la Figura 4.9, se observa que las partículas presentan, en general, un diámetro Feret menor a 40 µm.

A partir de estos datos obtenidos mediante el tratamiento de las imágenes con el software, se determinó el diámetro de Sauter o  $d_{3,2}$  que se define como el diámetro de una esfera que tiene la misma relación volumen / área superficial que la partícula de interés, que dio como resultado un valor de **68.63 µm**.

Utilizando la distribución de diámetro obtenida y teniendo en cuenta las imágenes de las cuales se obtienen estos datos se podrían considerar, estadísticamente, los poros mayores de 70 µm (8 datos) como errores experimentales, ya que el tamaño muestral total es de 88 poros. Además, en las imágenes Figura 4.4a) y Figura 4.5a) se observa que, en general, en el interior de los poros con un tamaño mayor a 70 µm existen otros

poros más pequeños, los cuales sí son determinantes en el flujo del fluido a través de ellos.

Por ello, existen poros mayores a 70  $\mu\text{m}$ , que facilitan el movimiento convectivo del fluido y permiten que el monolito tenga una pérdida de carga baja. Sin embargo, estadísticamente no son significativos y pueden tratarse como una desviación de la tendencia central.

Estos resultados muestran un compromiso entre un monolito con baja pérdida de carga y alta área específica, que es lo deseable para procesos cromatográficos.

#### 4.2.1.2 Porosidad.

Como se ha mencionado previamente, la porosidad es esencial para permitir un flujo adecuado a través del monolito, pero un alto valor de porosidad suele implicar una baja resistencia mecánica.

Los resultados de porosidad obtenidos mediante *ImageJ* se resumen en la Tabla 4.6.

**Tabla 4.6. Valores de porosidad obtenidos mediante *ImageJ*.**

	Porosidad (%)
Figura 4.3 (imágenes del microscopio óptico)	37.70
Figura 4.4b) (imagen ESEM)	29.65
Figura 4.5b) (imagen ESEM)	34.01

Por tanto, la porosidad media tiene un valor de  $33.79 \pm 4.03\%$ , que está en concordancia con la porosidad estimada por medios bibliográficos calculada como la cantidad de fase orgánica presente en la emulsión [145], con el que se obtiene un valor de 33.33%.



Estos dos valores de porosidad están dentro de los márgenes de error aceptables, lo que demuestra que la estimación del valor de la porosidad mediante *ImageJ* es válida.

Además, como se mencionó previamente, el valor de la porosidad debe estar en un rango determinado (entre 25-40%) para asegurar la continuidad de la estructura de polisacárido [39, 145]. Por tanto, la porosidad obtenida es adecuada para este tipo de aplicación.

#### 4.2.1.3 Volumen total del superporo.

El volumen aparente total de superporo se obtiene teniendo en cuenta el valor de porosidad y considerando el monolito como homogéneo (ver Tabla 4.7).

**Tabla 4.7. Volumen total del superporo obtenido mediante *ImageJ*.**

	Volumen total del superporo (cm <sup>3</sup> )
Figura 4.3 (imágenes del microscopio óptico)	1.52
Figura 4.4b (imagen ESEM)	1.19
Figura 4.5b (imagen ESEM)	1.36

El valor obtenido del volumen total de superporo medio es  $1.35 \pm 0.17$  cm<sup>3</sup> que, teniendo en cuenta el volumen total de emulsión, corresponde a un valor de porosidad de 33.85%. Por tanto, este valor está en concordancia con los resultados previos obtenidos, tanto mediante el procesado de imágenes, como por la estimación mediante el volumen empleado de fase orgánica.

Para validar este resultado, se determinó el valor del volumen total del superporo medio utilizando un método de cromatografía de exclusión inversa [43], donde tanto el

volumen total de superporo como el volumen de poros total se determinó utilizando azida sódica y Blue Dextrano.

El **Blue Dextrano** se utiliza por su alto peso molecular (2000 kDa), lo que hace que no pueda acceder a los poros más pequeños. Por tanto, se utiliza para medir el *volumen total de superporos o macroporos*.

Por otra parte, la **azida sódica** (65 Da) se utiliza para medir el *volumen de poros no convectivos o difusionales* ya que pueden acceder al interior de éstos dado al bajo peso molecular de la azida. De esta forma, se calcula el volumen de meso- y microporos.

Las propiedades de ambas especies se recogen en la Tabla 4.8:

**Tabla 4.8. Propiedades de los compuestos utilizados.**

	<b>Blue Dextrano</b>	<b>Azida sódica</b>
<b>Peso molecular</b>	2 000 000 Da	65 Da
$\lambda_{\max}$	618 nm	236 nm
<b>Concentración en PBS</b>	0.1 mg/ml	0.6 mg/ml
<b>Volumen utilizado</b>	1.50 ml	2.15 ml

Los resultados recogidos en la Tabla 4.8 muestran que el volumen de azida sódica necesario para ocupar todos los poros presentes en el monolito es 2.15 ml, mientras que el volumen de Blue Dextrano necesario para ocupar los poros convectivos es 1.50 ml.

Por tanto, el volumen total de poros convectivos (macroporos) se puede considerar 1.5 ml mientras que el volumen total de poros no convectivos o difusionales (meso y microporos) de es de 0.65 ml.

Estos resultados están en concordancia con los valores obtenidos mediante *ImageJ*, lo que demuestra que *este software* es un método válido de caracterización.

#### 4.2.1.4 Área superficial.

Otro de los parámetros importantes en soportes de cromatografía de afinidad es el área superficial ya que determina la capacidad de separación.

Es deseable que el soporte cromatográfico tenga una área superficial alta para retener la mayor cantidad posible de biomoléculas, debido a que las separaciones cromatográficas se producen mediante fenómenos superficiales.

Es posible determinar el área superficial utilizando *ImageJ*, ya que proporciona datos del perímetro de cada poro. Para ello, se suman todos los perímetros de poros obtenidos en cada imagen, y se considera que todo el monolito es homogéneo. De esta forma es posible determinar el área superficial disponible para la adsorción (Tabla 4.9).

Se considera que los datos obtenidos con el *ImageJ* son representativos de todo el monolito, por lo que se suman los parámetros de todos los poros obtenidos en cada imagen (que es una parte del monolito). A continuación se extrapola a todo el monolito el perímetro de todos los poros existentes en una sección del monolito, se multiplica por la altura y se obtiene el área superficial referida al monolito total.

**Tabla 4.9. Área superficial del monolito obtenido mediante estimaciones obtenidas mediante *ImageJ*.**

	Área superficial (cm <sup>2</sup> )
Figura 4.4b)	745.94
Figura 4.5b)	813.12

El valor obtenido del área superficial es de 779.53 cm<sup>2</sup>.

Teniendo en cuenta las propiedades del monolito y su masa seca (siguiente sección), esta área superficial equivale a 0.4884 m<sup>2</sup>/g de monolito seco.

Si se comparan estos datos con los del área superficial del monolito cerámico recubierto con Agarosa D5 empleado previamente en nuestro grupo de investigación [38], el cual presenta un valor de área superficial de  $209 \text{ cm}^2/\text{monolito}$  (de 7 cm de longitud), es decir,  $29.86 \text{ cm}^2/\text{cm monolito}$  es posible concluir que el área superficial de este nuevo monolito **por unidad de longitud** es considerablemente (unas 13 veces) mayor.

#### **4.2.2 Densidades real y aparente, y capacidad de *swelling*.**

Para poder calcular la densidad, tanto real como aparente, y la capacidad de hinchamiento o *swelling* del monolito, se han medido los valores de las variables de las que dependen.

A partir de la masa, tanto en seco como en húmedo, y el volumen en húmedo de cuatro monolitos se han obtenido los resultados de la Tabla 4.10.

**Tabla 4.10 Datos de masas húmedas y secas y volúmenes de cuatro monolitos evaluados.**

Monolito 1		Monolito 2	
$M_{húmedo}$	3.0564±0.0001 g	$M_{húmedo}$	2.7893±0.0001g
$M_{seco}$	0.1517±0.0001 g	$M_{seco}$	0.1469±0.0001g
$V_{húmedo}$	4.00±0.05 cm <sup>3</sup>	$V_{húmedo}$	4.00±0.05 cm <sup>3</sup>
Monolito 3		Monolito 4	
$M_{húmedo}$	2.7 893±0.0001g	$M_{húmedo}$	3.5865±0.0001g
$M_{seco}$	0.1469±0.0001 g	$M_{seco}$	0.1929±0.0001g
$V_{húmedo}$	4.00±0.05 cm <sup>3</sup>	$V_{húmedo}$	4.00±0.05 cm <sup>3</sup>

$$Swelling = \frac{M_{agua}}{M_{total}} = \frac{M_{húmedo} - M_{seco}}{M_{húmedo}} \quad (4.1)$$

$$\rho_{real} = \frac{M_{húmedo}}{V_{húmedo}} \quad (4.2)$$

$$\rho_{aparente} = \frac{M_{seco}}{V_{húmedo}} \quad (4.3)$$

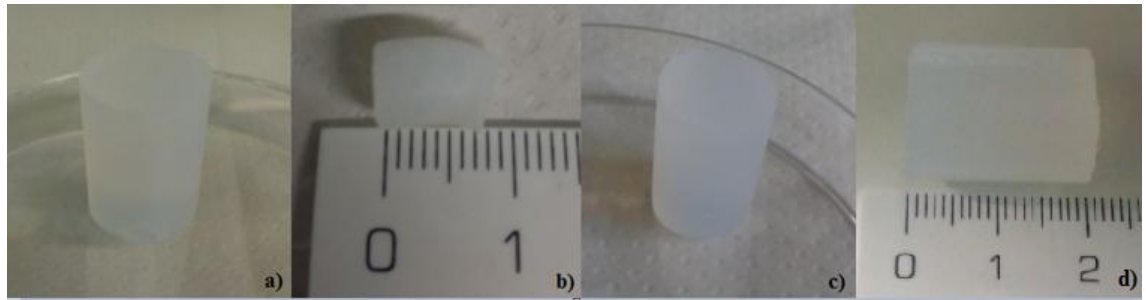
Los resultados de las dos densidades y de la capacidad de *swelling* se resumen en la Tabla 4.11.

**Tabla 4.11. Propiedades de densidad y *swelling* del monolito.**

$\rho_{real}$	$0.80 \pm 0.02 \text{ g cm}^{-3}$
$\rho_{aparente}$	$0.04 \pm 0.03 \text{ g cm}^{-3}$
<i>Swelling</i>	$94.8 \pm 2.3 \%$

Los valores obtenidos para la densidad tanto real como aparente y la alta capacidad de *swelling* obtenida ponen de manifiesto la gran capacidad de aceptación de agua que presenta la estructura del monolito. Por tanto, podría pensarse que este hecho puede facilitar el flujo de líquido a través del monolito.

Por otra parte, es posible recuperar el tamaño, apariencia y propiedades tras secarse el monolito durante dos días.



**Figura 4.10. Imágenes del monolito a) Monolito tras la preparación, b) mismo monolito tras un secado en condiciones ambientales durante 24h y c) mismo monolito tras 72h de rehidratación d) dimensiones del monolito rehidratado durante 72h.**

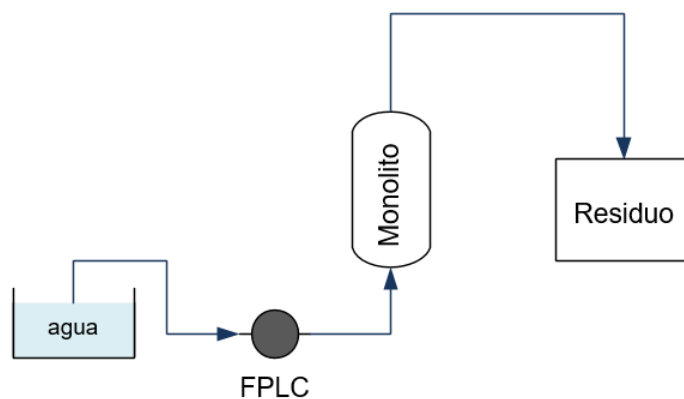
Por tanto, cuando el monolito no se seca del todo, no hay histéresis estructural.

### 4.2.3 Pérdida de carga a través del monolito.

Como se ha indicado anteriormente, una de las mayores ventajas del uso de soportes monolíticos en cromatografía es la baja pérdida de carga producida. Se evaluó esta propiedad con el fin de determinar la posibilidad de utilización de este tipo de monolitos a escala industrial.

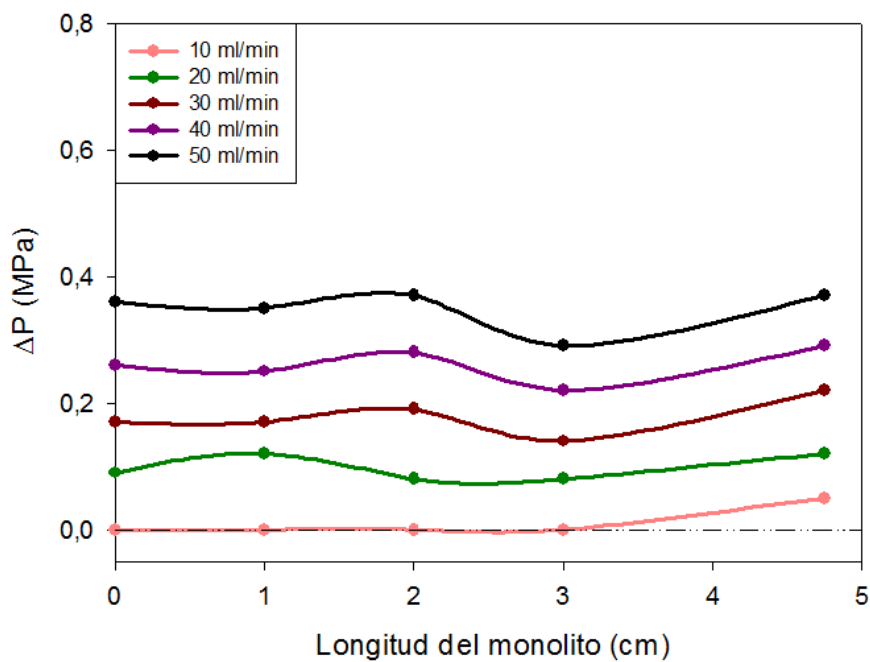
Para ello, se midió la pérdida de carga de monolitos de diferente longitud, usando diferentes flujos volumétricos utilizando un FPLC Akta Purifier 10.

El esquema de la instalación utilizada se muestra en la Figura 4.11.



**Figura 4.11. Esquema de la instalación utilizada en la pérdida de carga.**

La pérdida de carga generada en los monolitos de diferente longitud a diferentes flujos volumétricos se resume en la Figura 4.12.



**Figura 4.12. Pérdida de carga para diferentes longitudes de monolito y diferentes caudales.**

Como se observa Figura 4.12, la pérdida de carga generada es prácticamente constante y su valor es muy bajo en comparación con otros soportes cromatográficos, como se muestra en la Tabla 4.12.



Tabla 4.12. Pérdida de carga en diferentes soportes cromatográficos.

Matriz cromatográfica	Dimensiones de la columna	Caudal máximo evaluado (mL min <sup>-1</sup> )	Pérdida de presión (MPa)	Ref.
POROS HS 20 (23 µm lecho particulado)	0.5 cm diámetro de columna 0.5 cm longitud 1 mL	4	< 0.6	[29]
POROS HS 50 (52 µm lecho particulado)	0.5 cm diámetro de columna 0.5 cm longitud 1 mL	4.5	0.22	[29]
CIM S03-1 Monolito radial	0.67 cm diámetro interno 1.86 cm diámetro externo 0.42 cm longitud 1 mL	5	0.28	[29]
Matriz de membrana mezclada (Etilenvinilalcohol, EVAL+20-40 µm partículas con grupos epoxi)	23 mm diámetro interno	3	0.4	[31]

**Tabla 4.12. Pérdida de carga en diferentes soportes cromatográficos (Continuación).**

<b>Matriz cromatográfica</b>	<b>Dimensiones de la columna</b>	<b>Caudal máximo evaluado (mL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Pérdida de presión (MPa)</b>	<b>Ref.</b>
Xerogel de sílice (polimerización de silicato de potasio)	0.32 mm diámetro interno 13 cm longitud 0.011 mL	10 µl/min	4.35	[139]
Monolito de glicidimetacrilato y etilendimetacrilato	4.6 mm diámetro interno 5 cm longitud 0.83 mL	0.5	0.41	[15]
Monolito de Agarosa Superporosa	16 mm diámetro 0.5-4.75 cm longitud 4 mL	50	<0.4	Este estudio

Aunque algunos valores parecen ser menores que el obtenido para la pérdida de carga de este monolito, es importante recalcar que, en general, los soportes con los que se están comparando estos valores son de menor tamaño (0.011 – 1 mL) que el monolito propuesto (4 mL), y que este monolito fue evaluado hasta un valor de 50 mL/min, valor muy superior al evaluado en otros soportes cromatográficos con los que se están comparando.

Por tanto, el monolito de Agarosa Superporosa **presenta una menor pérdida de carga que los soportes utilizados de forma convencional** en cromatografía, y puede utilizarse en condiciones de flujo volumétrico hasta 50 mL/min sin presentar valores de pérdida de carga elevados, lo que demuestra la ventaja de la utilización de este tipo de soporte a escala industrial.

### 4.3 CONCLUSIONES.

A partir de los experimentos realizados y de los resultados obtenidos se puede concluir:

- Se ha **preparado y caracterizado** un monolito de Agarosa Superporosa.
- Se han **evaluado y optimizado las variables principales de su preparación** con el fin de mejorar sus propiedades para su utilización en cromatografía: mejorar su resistencia mecánica sin aumentar su pérdida de carga:
  - Se utiliza **Agarosa D5** con una concentración del 3.0% w/v (100 mL) como **material estructural** para mejorar la estabilidad mecánica del soporte y permitir el flujo de agua fácilmente.
  - Se selecciona **ciclohexano** (46 mL) como **fase orgánica** ya que proporciona mejores resultados de homogeneidad y resistencia mecánica.
  - Se utiliza **Tween 80** (4 mL) como agente emulsionante.
  - Se utiliza una agitación de **500 rpm** para asegurar la formación de macroporos altamente interconectados.
  - El **tiempo** que transcurre desde que se forma la emulsión hasta que gelifica es **el menor posible** para evitar la modificación de la estructura porosa a lo largo del tiempo.
- La **caracterización** se realizó mediante métodos de procesado de imagen utilizando *ImageJ*. Estos resultados se compararon con los obtenidos aplicando otros métodos utilizados en bibliografía, manifestando que **el método de procesado de imagen es válido para la determinación de estos parámetros**.

- Este monolito de Agarosa Superporosa presenta buenas propiedades como un **diámetro de Sauter de 68.63  $\mu\text{m}$**  que facilita el flujo convectivo, un área superficial moderadamente alta (**779.53  $\text{cm}^2$  ó 0.4884  $\text{m}^2 / \text{g}$  de monolito seco**), un valor de **porosidad del 33.79 $\pm$ 4.03%** que está en concordancia con la porosidad deseada (entre 25-40%), una **capacidad de swelling del 94.8  $\pm$  2.3 %**, una **densidad real de 0.80  $\pm$  0.02  $\text{g cm}^{-3}$** , una **densidad aparente de 0.04  $\pm$  0.03  $\text{g cm}^{-3}$** , un **volumen de superporo de 1.50 mL** y un **volumen de poro no convectivo de 0.65 mL**.
- La **pérdida de carga** generada presenta valores muy bajos (<0.4MPa para un caudal de 50 mL/min) teniendo en cuenta las dimensiones del soporte cromatográfico y el flujo volumétrico empleado.

Por todas estas razones, **este monolito es adecuado para su utilización en procesos cromatográficos.**

En el próximo capítulo se explicará la activación del soporte cromatográfico para su utilización en cromatografía IMAC y se realizará una serie de estudios preliminares de interacción para determinar si la proteína BSA y la enzima Catalasa pueden ser utilizados en este tipo de técnica cromatográfica.

## **Capítulo 5.**

# **Activación y estudios preliminares en un monolito para Cromatografía IMAC**



Una vez finalizada la preparación y caracterización del monolito de Agarosa Superporosa es necesario modificar su estructura química con el fin de inmovilizar en su superficie un ligando metálico, requisito indispensable para su utilización en Cromatografía IMAC.

Además, se estudiará la estructura de las biomoléculas implicadas (BSA y Catalasa) y, posteriormente, se realizará un estudio bioinformático para determinar el tipo de enlace que se producirá entre la proteína y el ligando, y que permitirá tener una idea previa del comportamiento que van a presentar estas biomoléculas en la adsorción y elución de las mismas en el proceso cromatográfico.

Por lo tanto, este capítulo se centra en la modificación química de los grupos hidroxilo presentes en la superficie del monolito con el fin de hacerlo apto para un proceso cromatográfico por IMAC, y estudiar el tipo de interacción que se producirá en el caso de ser utilizado para purificar BSA o Catalasa mediante esta técnica.

## **5.1 ACTIVACIÓN DEL MONOLITO DE AGAROSA POROSA Y ENLACE DEL LIGANDO NECESARIO PARA SU UTILIZACIÓN EN CROMATOGRAFÍA IMAC.**

En primer lugar, se activará el monolito con el fin de transformar su estructura química de forma que permita la fijación del brazo espaciador y el agente quelante.

A continuación, se quelará el metal iónico,  $\text{Cu}^{2+}$ , que actuará como ligando y será capaz de adsorber la proteína mediante la formación de un enlace covalente coordinado o dativo con algunos aminoácidos superficiales como Histidina o Triptófano, como se comentó anteriormente en el Capítulo 3.

## 5.1.1 Materiales y métodos.

### 5.1.1.1 Reactivos.

**Tabla 5.1. Reactivos utilizados y empresa comercializadora.**

Reactivos	Empresa
Fosfato potásico monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Panreac (Barcelona, España)
Borohidruro sódico (NaBH <sub>4</sub> ) 1,4-butanodioldiglicidiléter Ácido iminodiacético (IDA)	Aldrich (St. Louis, MO, USA).
Hidroximetilaminometano (TRIS)	Sigma (St. Louis, MO, USA).
Hidróxido sódico (NaOH) Carbonato sódico (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Scharlau (Barcelona, España)
Acetona grado síntesis	GPR Rectapur
Cloruro de cobre (II) (CuCl <sub>2</sub> )	Riedel-de Haën (Seelze, Alemania).

### 5.1.1.2 Equipos utilizados.

La activación del monolito y unión del brazo espaciador se realizó utilizando el equipamiento siguiente: un agitador orbital Heidolph Unimax 2010 a 120 rpm (Schwabach, Alemania).

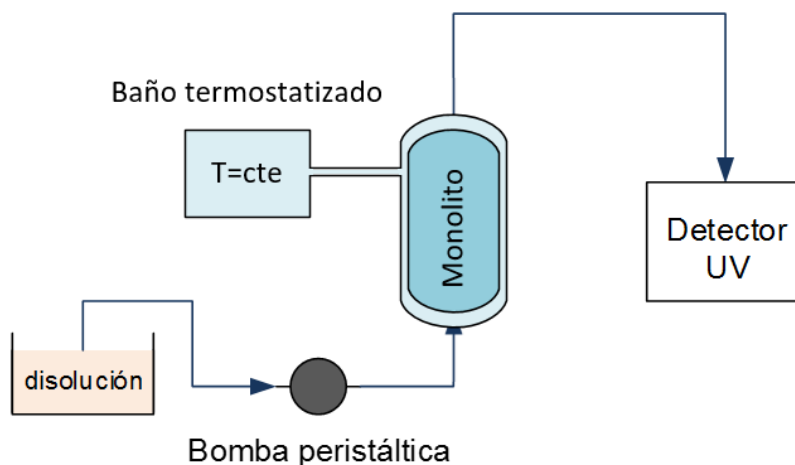
La quelación del ion metálico, Cu<sup>2+</sup>, se realizó en una columna cromatográfica con camisa refrigerante Pharmacia Biotech XK 16/20 16 mm de diámetro interno de columna, 200 mm altura de tubo (Barcelona, España) que se mantuvo a 23°C con un Frigitem JP Selecta (Barcelona, España).



Se utilizó una bomba peristáltica multicanal Pumpdrive 5201 con un cassette medio (0.3-25 mL/min) fabricado por Heidolph Instruments (Schwabach, Alemania).

Las medidas de absorbancia a 812 nm se obtuvieron mediante un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Madrid, España).

La quelación del ion metálico se llevó a cabo utilizando una instalación en discontinuo compuesta por el vaso de precipitados que contiene la disolución, la bomba peristáltica, la columna monolítica y el espectrofotómetro, tal como se observa en la Figura 5.1.



**Figura 5.1.** Instalación en discontinuo, compuesta por la columna cromatográfica monolítica, la bomba peristáltica, la disolución de  $\text{Cu}^{2+}$  y el espectrofotómetro.

### 5.1.2 Activación del soporte y fijación del agente quelante.

Como se mencionó en capítulos anteriores, para que un soporte pueda ser utilizado en cromatografía IMAC, debe poder fijar en su superficie un ion metálico de forma estable, para lo que se inmoviliza un agente quelante de forma irreversible.

Además, se suele introducir previamente un brazo espaciador para disminuir el impedimento estérico y facilitar la interacción entre la proteína y el metal.

### 5.1.2.1 Activación del soporte de Agarosa Superporosa.

La activación del monolito o soporte consiste en la modificación química de los grupos hidroxilo de su estructura, de forma que pueda enlazarse un agente quelante de forma irreversible [7, 23].

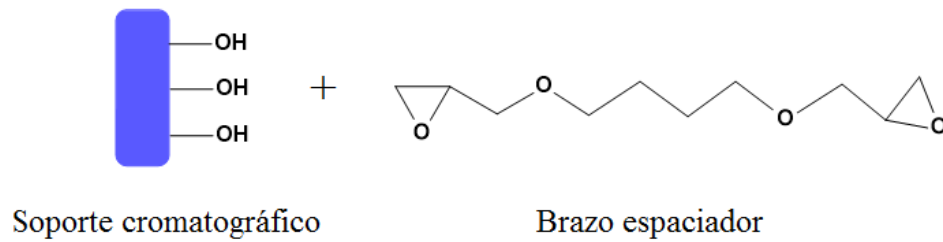
Existen diferentes compuestos que se utilizan para activar una matriz cromatográfica, como por ejemplo [7, 23].

- Bromuro de cianógeno.
- Glutaraldehído.
- Carbonilimidazol.
- Cloruro de tosilo.

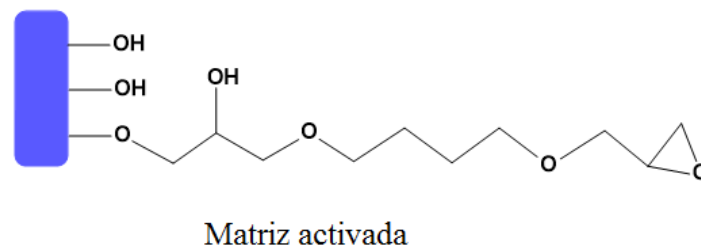
Sin embargo, cuando la matriz cromatográfica presenta grupos hidroxilo en su superficie y se desea añadir un brazo espaciador, se suelen utilizar los siguientes reactivos bifuncionales [7]:

- Epihalohidrina: aporta un brazo espaciador con una longitud de tres átomos de carbono. Si se necesita una longitud mayor, es más conveniente la utilización de bisoxiranos.
- Diglicidilésteres o bisoxiranos.

En este caso, los grupos hidroxilo presentes en la superficie de la Agarosa D5 son activados mediante la adición de un bisoxirano que actúa como brazo espaciador (1,4-butanodioldiglicidiléter), como se muestra en la Figura 5.2, dando lugar a la matriz activada y con un brazo espaciador acoplado (Figura 5.3).



**Figura 5.2. Activación del soporte cromatográfico mediante la adición de un brazo espaciador.**



**Figura 5.3. Estructura de la matriz activada.**

Para ello, se ha empleado el siguiente método (Figura 5.4) [38]:

- El monolito de Agarosa D5 se sumerge en 50 ml de una disolución 0.4M NaOH que contiene NaBH<sub>4</sub> (0.565g), acetona (19 mL) y 1,4-butanodioldiglicidiléter (9.5 mL). La reacción tiene lugar con una agitación de 120 rpm a 23°C durante 6 horas.
- A las 2 y 4 horas de reacción se añaden 9.5 mL de 1,4-butanodioldiglicidiléter.
- Tras 6 h de reacción el monolito se lava con 1 L de agua desionizada.

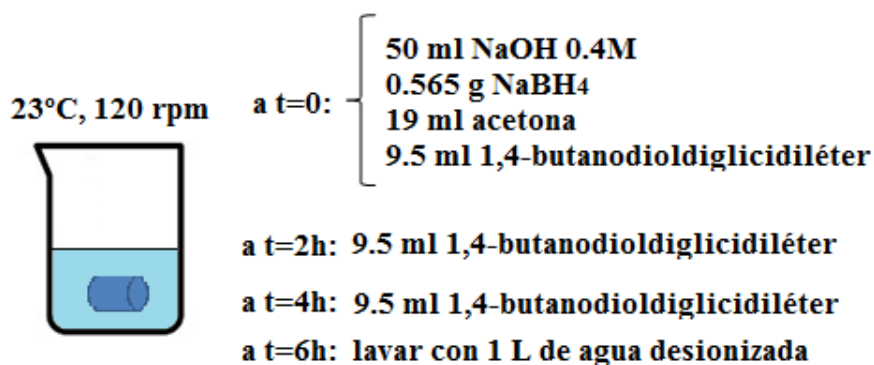


Figura 5.4. Esquema del proceso de activación [38].

Por tanto, mediante este proceso se consigue la activación de los grupos hidroxilo presentes en la superficie del soporte mediante la fijación de un brazo espaciador.

### 5.1.2.2 Fijación del agente quelante.

Fijado el brazo espaciador se enlaza el agente quelante, ácido iminodiacético (IDA), proceso que se muestra en las Figura 5.5 y Figura 5.6 .

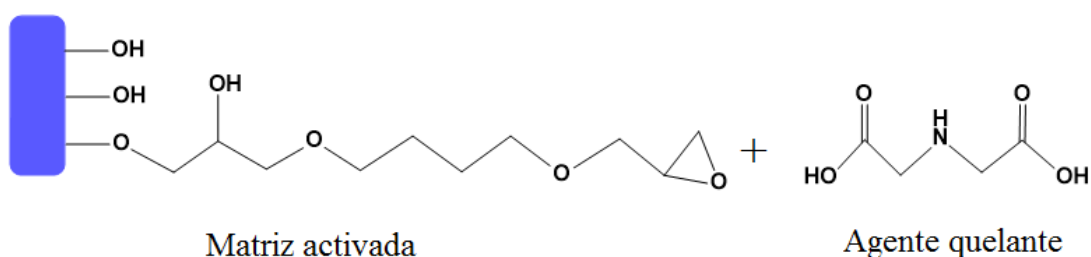


Figura 5.5. Estructuras de la matriz activada y el agente quelante.

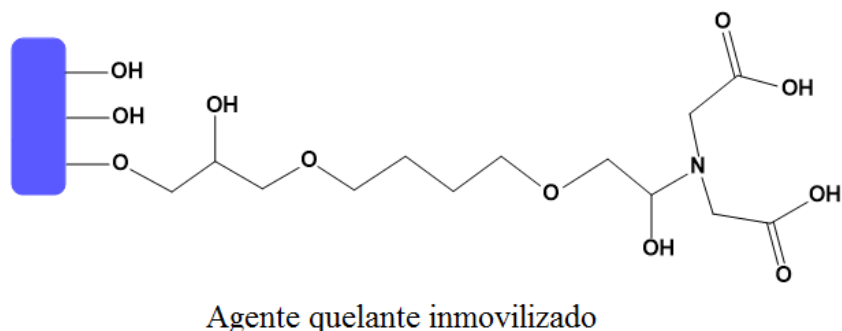


Figura 5.6. Estructura del agente quelante inmovilizado en el soporte cromatográfico.

El procedimiento seguido se basa en el método de Vega y col. [38]:

- El monolito se sumerge en 50 ml de tampón  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1M que contiene 4.5 g de IDA durante 12 h con una velocidad de agitación de 120 rpm a  $23^\circ\text{C}$ .
- Finalmente, el monolito se lava con 1 L de agua desionizada.

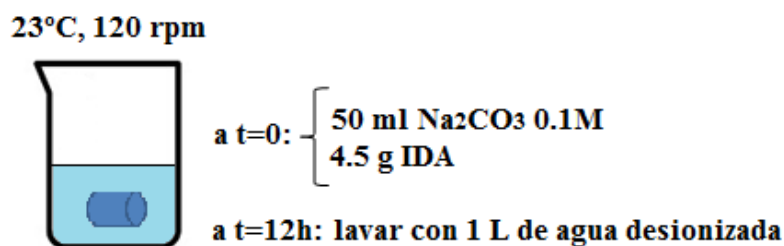
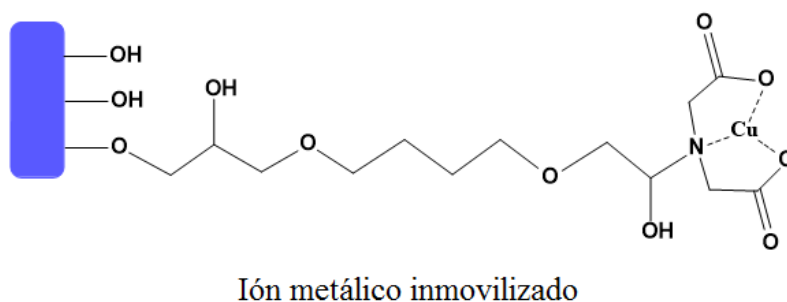


Figura 5.7. Esquema del proceso de la fijación del agente quelante [38].

### 5.1.3 Quelación del metal.

Una vez que el monolito ha sido activado y contiene el agente quelante se añade el ion metálico,  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 5.8).

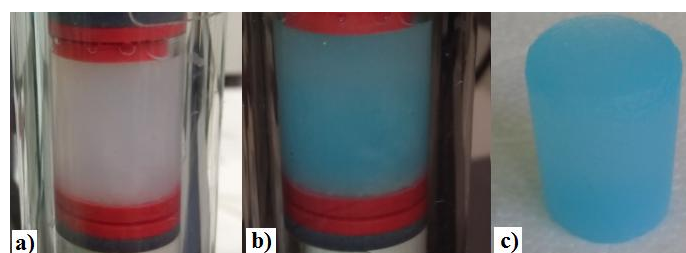


**Figura 5.8. Ion metálico inmovilizado mediante la formación de un quelato.**

De esta forma, el agente quelante y el ion metálico forman un quelato que debe presentar centros de coordinación libres para poder retener a la proteína, como se indicó en los capítulos anteriores.

El procedimiento seguido para el proceso de quelación se muestra a continuación (Vega y col. [38]):

- El monolito se empaqueta en el interior de la columna cromatográfica.
- Se lava con agua desionizada utilizando un caudal de 1.5 mL/min durante 30 min, en discontinuo.
- Se recircula una disolución de ligando (100 ml 5 mg/mL  $\text{CuCl}_2$ ) a través del monolito, hasta que se alcanza el equilibrio entre el cobre en disolución y el cobre quelado (1h). El monolito se vuelve azul en este proceso (Figura 5.9).



**Figura 5.9. Monolitos a) en columna antes de cargar con cobre, b) en columna después de cargar con cobre y c) después de cargar con cobre.**

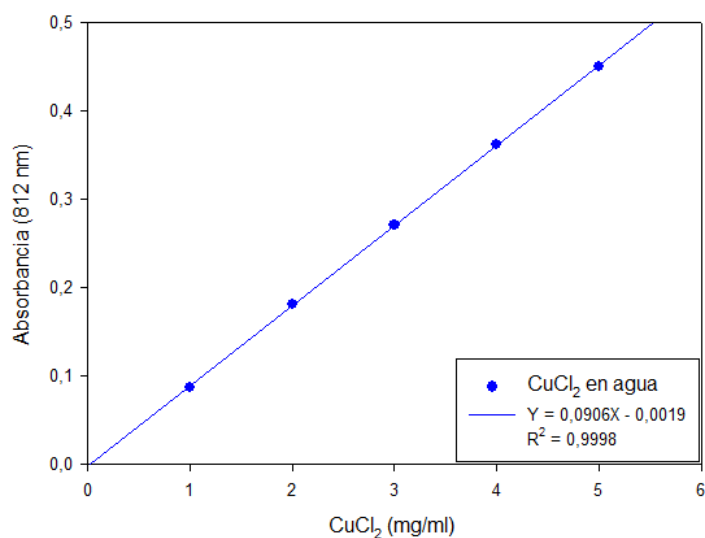
- Se recircula agua desionizada durante 30 min con un caudal de 1.5 mL/min con el fin de retirar del monolito la disolución de cobre que se encuentra en el interior del mismo.
- Se hace recircular una disolución de fosfato potásico monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 50 mM pH 4.5 a un flujo volumétrico de 1.5 mL/min con el fin de retirar el metal enlazado de forma no específica.
- Se lava el monolito con una disolución de TRIS-buffer pH 10 durante 2h utilizando un caudal de 1.5 mL/min para reequilibrar la columna antes de su utilización.

La cantidad de  $\text{Cu}^{2+}$  quelado en la columna fue determinada por diferencia entre el  $\text{Cu}^{2+}$  inicial y el final, mediante el método que se describe a continuación.

#### **5.1.4 Método de análisis del $\text{Cu}^{2+}$ .**

El método utilizado para cuantificar la cantidad de  $\text{Cu}^{2+}$  presente en cada etapa del proceso cromatográfico es el método espectrofotométrico y se explica de forma completa en el siguiente capítulo (Capítulo 6).

La recta de calibrado del  $\text{Cu}^{2+}$  en agua a la longitud máxima (812 nm) se muestra en la Figura 5.10.



**Figura 5.10. Recta de calibrado del CuCl<sub>2</sub> en agua (812 nm).**

Por tanto, con esta relación entre la concentración de CuCl<sub>2</sub> y su absorbancia a 812 nm es posible determinar la cantidad de Cu<sup>2+</sup> presente en una muestra, en el intervalo de trabajo.

La cantidad de este metal inmovilizado es de 42,36 mg CuCl<sub>2</sub> de media, que equivalen a  $3.1 \cdot 10^{-4}$  moles de Cu<sup>2+</sup>.

## 5.2 ESTRUCTURAS DE LA BSA Y LA CATALASA.

Antes de realizar el estudio de los aminoácidos en la superficie de ambas biomoléculas es necesario conocer sus características más importantes.

A continuación, se describen las estructuras de la BSA y la Catalasa utilizadas en el presente trabajo.

### 5.2.1 Estructura de la BSA.

La Albúmina de Suero (*Serum Albumin*, SA) es la proteína más abundante del plasma sanguíneo de los mamíferos. Es sintetizada en el hígado y exportada como una



proteína no glicosilada al plasma sanguíneo, donde alcanza su concentración máxima (0.6 mM aproximadamente) [155].

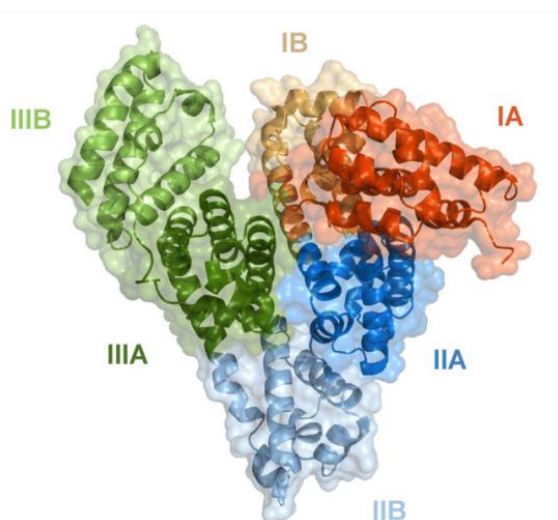
Es una proteína multifuncional con una capacidad extraordinaria para enlazarse con diferentes ligandos, cuya función fisiológica más importante es la de mantener la presión osmótica y el pH de la sangre [156]. Además, actúa como transportador de diferentes tipos de ácidos grasos, metabolitos, fármacos, nutrientes y otro tipo de moléculas como metales [155, 157].

Debido a estas características, este tipo de proteínas ha sido ampliamente estudiada para su aplicación en biomedicina, aplicaciones industriales e investigación [158].

Las Albúminas de Suero son proteínas relativamente grandes (con un peso molecular de unos 66 kDa y un pI de 4.7), cargadas negativamente, con estructura cuaternaria en forma de corazón, y están compuestas por tres dominios helicoidales, divididos a su vez en dos subdominios [155].

La Albúmina de Suero Bovino (*Bovine Serum Albumin, BSA*) cristaliza en forma de cristal monoclinico, en el espacio del grupo C2, con dos cadenas presentes en la unidad asimétrica [155].

Su estructura cuaternaria se muestra en la Figura 5.11.



**Figura 5.11. Dominios y estructura de la BSA (código PDB 3V03) [155].**

### 5.2.2 Estructura de la Catalasa de hígado bovino (EC 1.11.1.6).

La Catalasa es una metaloenzima muy importante a nivel bioquímico ya que cataliza gran número de reacciones [159, 160], entre la que destaca degradación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), produciendo oxígeno ( $O_2$ ) y agua ( $H_2O$ ), tal como se muestra en la Reacción (5.1) [159, 161-163].



Esta enzima es ampliamente utilizada en diferentes campos como en blanqueamiento de tejidos, corrosión y micromotores, medicina (tratamiento de gripe), biosensores, biocatálisis, antioxidante en la industria alimentaria, etc. [164]

Las Catalasas se clasifican en diferentes familias [164]:

- Catalasas que contienen un grupo Hemo (Tipo I): Son Catalasas que poseen como cofactor un grupo de hierro-porfirina, y presentan estructuras con cuatro subunidades.
- “*Pseudocatalasas*” (Tipo II): Son catalasas que poseen como cofactor un centro activo con dos núcleos que contienen Manganeso. Este tipo de Catalasas presentan menor actividad específica.

Una de las Catalasas más empleadas en investigación es la Catalasa de hígado bovino ( $pI = 5.4$ ). Su estructura cuaternaria está formada por cuatro subunidades idénticas con un peso molecular de 60 kDa, unidas mediante un grupo Hemo [164].

A continuación, se muestran las estructuras cuaternarias de la Catalasa de hígado bovino (Figura 5.12) y la estructura de los aminoácidos accesibles cercanos al grupo Hemo de esta Catalasa (Figura 5.13).

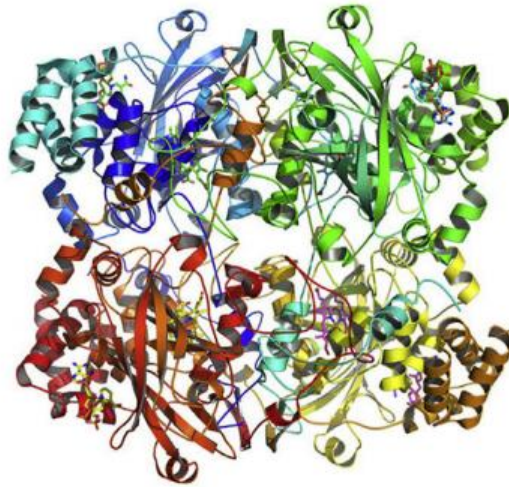


Figura 5.12. Estructura cuaternaria de la Catalasa de hígado bovino (código PDB 3J7B)[164].

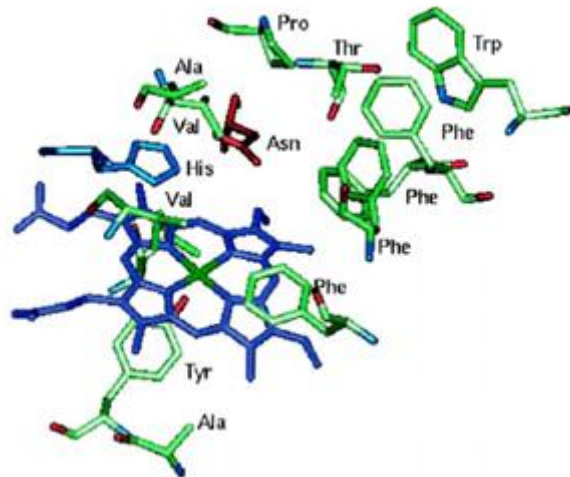


Figura 5.13. Aminoácidos superficiales cercanos al grupo Hemo de la Catalasa de hígado bovino, con las Histidinas distales se encuentran coloreadas en azul y las Asparraginas distales, en rojo [165].

### **5.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS SUPERFICIALES DE LA BSA Y LA CATALASA.**

Como se ha mencionado anteriormente, la cromatografía IMAC aprovecha la afinidad que presentan algunos aminoácidos superficiales como la Histidina (His) y el Triptófano (Trp) por metales de transición iónicos [94].

Por este motivo, es necesario conocer previamente si estos aminoácidos se encuentran en la superficie de la biomolécula que se quiere separar en el trabajo presente: BSA y Catalasa.

Tanto la BSA como la Catalasa pueden utilizarse cromatografía IMAC ya se enlazan al ion  $\text{Cu}^{2+}$  por interacción con las Histidinas situadas en su superficie [79, 166].

Por lo tanto, es necesario conocer el número de Histidinas accesibles y su distribución espacial fundamentalmente por dos motivos: en primer lugar, para asegurar que este enlace es posible y, en segundo lugar, para comprender su influencia en el comportamiento de la adsorción y de la elución de cada una estas dos biomoléculas.

Para ello, la primera etapa consiste en determinar la estructura primaria de la proteína.

Una vez conocida la secuencia de aminoácidos que forma su estructura, se identifica la existencia de Histidinas en la superficie de la misma, utilizando para ello el análisis de *Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini* en las estructuras primarias de la BSA y la Catalasa [167].

### **5.3.1 Determinación de aminoácidos superficiales: Histidina y Triptófano en la BSA.**

En esta sección se determinan los aminoácidos presentes en la superficie de la proteína a través de los cuáles se enlaza la BSA con el ion metálico inmovilizado,  $\text{Cu}^{2+}$ .

De esta forma se comprueba, en primer lugar, que es posible purificar BSA mediante cromatografía IMAC y se caracterizará el enlace formado.

Las características de este enlace explicarán los comportamientos tanto de adsorción como de elución de la BSA, que se estudiarán en el Capítulo 6.

Para ello, en primer lugar, se obtuvo la estructura primaria de la BSA en la página del *Centro Nacional de Información Biotecnológica* o *NCBI (National Center for Biotechnology Information)*.

Seguidamente se estudió la accesibilidad de los aminoácidos que se encuentran expuestos en la superficie de la proteína, y por tanto son accesibles. Para ello, se utilizó la herramienta de *Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini (Emini Surface Accessibility Prediction)*.

Por último, se identificaron aquellos aminoácidos presentes en la superficie de la BSA que son capaces de enlazarse con el metal iónico inmovilizado.

#### **5.3.1.1 Estructura primaria de la BSA.**

Como ya se ha comentado anteriormente, para determinar los aminoácidos accesibles de la BSA es necesario, en primer lugar, conocer su estructura primaria.

La proteína utilizada, BSA (*Bos Taurus*, Bovine), se identifica mediante el número Swiss-Prot P02769 y PDB 3V03.

Según el *Centro Nacional de Información Biotecnológica* o *NCBI (National Center for Biotechnology Information)*, la secuencia de aminoácidos que conforman la BSA se muestra en la Figura 5.14:

```

1  MKWVTFISLL LLFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA FSQYLQQCPF
61  DEHVKLVNEL TEFKATCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK VASLRETYGD MADCCEKQEP
121 ERNECFLSHK DDSPDLPKLK PDPNTLCDEF KADEKKFWGK YLYEIARRHP YFYAPELLEY
181 ANKYNGVFQE CCQAEDKGAC LLPKIETMRE KVLTSARQR LRCASIQKFG ERALKAWSVA
241 RLSQKFPKAE FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLCADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE
301 CCDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCN NYQEAKDAFL GSFLYEYSRR
361 HPEYAVSVLL RLAKEYEATL EECCAADDPH ACYSTVFDKL KHLVDEPQNL IKQNCQFEK
421 LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL
481 NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP
541 DTEKQIKKQT ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV
601 STQTALA

```

**Figura 5.14. Estructura primaria de la BSA (*Bos Taurus*, Bovine) [168].**

Por tanto, como se puede observar en la Figura 5.14, la BSA está formada por 607 aminoácidos, de los cuales 17 son Histidinas.

Además, en la página de Uniprot se muestra la estructura secundaria de la BSA (Figura 5.15).



**Figura 5.15. Estructura secundaria de la BSA (*Bos Taurus*, Bovine) [169].**

En ella, se observa la disposición de  $\alpha$  hélices, hojas  $\beta$  y *loops* en la estructura de la BSA, y se puede comprobar que la mayor parte de la estructura tiene forma de  $\alpha$  hélices.

Una vez se conocen las estructuras primarias de la proteína, se realizará un análisis *Emini* con el fin de identificar los aminoácidos presentes en la superficie.

### 5.3.1.2 Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini de la BSA (Emini Surface Accessibility Prediction).

Para poder conocer los aminoácidos presentes en la superficie de la BSA, se realizó el análisis de la *Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini*.

Para ello, se utilizó la herramienta disponible en la página de *IEDB Analysis Resource* [170], que determina los aminoácidos superficiales utilizando la escala de Emini de Accesibilidad Superficial [167, 171], cuyas características se resumen en la Figura 5.16.

**Emini surface accessibility scale**

- **Reference:** Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol*. 1985 Sep;55(3):836-9.
- **Description:** The calculation was based on surface accessibility scale on a product instead of an addition within the window. The accessibility profile was obtained using the formulae 
$$S_n = \left( \prod_{i=1}^6 \delta_{n+4+i} \right) (0.37)^{-6}$$
 where  $S_n$  is the surface probability,  $\delta_n$  is the fractional surface probability value, and  $i$  vary from 1 to 6. A hexapeptide sequence with  $S_n$  greater than 1.0 indicates an increased probability for being found on the surface.

**Figura 5.16.** Características de la *Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini* [172].

Como resultado de la *Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini* se obtiene, en primer lugar, la estructura primaria de la proteína (Figura 5.17).

## Emini Surface Accessibility Prediction

Sequence: P02769

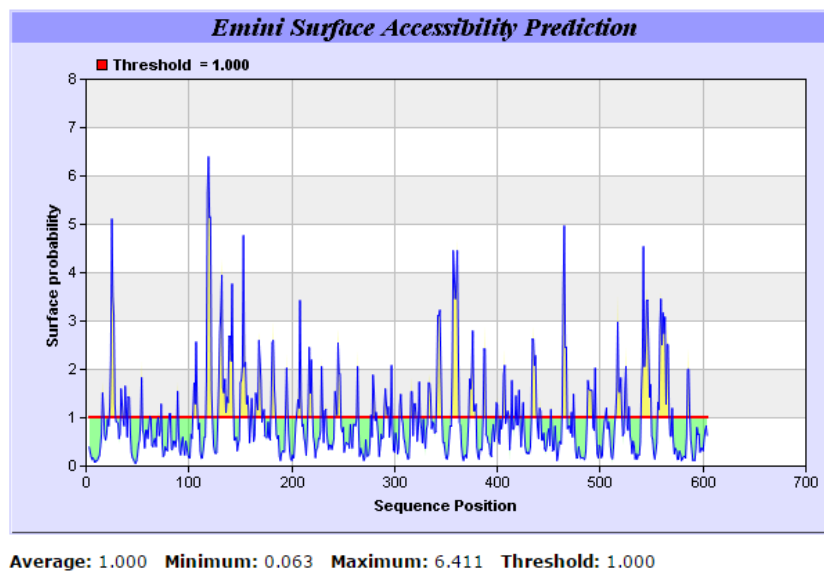
```

1 MKWTFISLL LFFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA FSQYLQQCPF
61 DEHVKLVNEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK VASLRETYGD MADCCEKQEP
121 ERNECFLSHK DDSPDLPKLK PDPNTLCDEF KADEKKFWGK YLYEIAARRHP YFYAPPELLYY
181 ANKYNGVFQE CCQAEDKGAC LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERAKAWNSVA
241 RLSQKFPKAE FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLCADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE
301 CCDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAKDAFL GSFLYEYSRR
361 HPEYAVSVLL RLAKYEATL EECCAADDPH ACYSTVFDKL KHLVDEPQNL IKQNCQDFEK
421 LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL
481 NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP
541 DTEKQIKKQT ALVELLKHKP KATEEQKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV
601 STQTALA
    
```

Center position: 3 Window size: 6

**Figura 5.17. Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini de la BSA (*Bos Taurus*, Bovine): estructura primaria.**

Además, se obtiene la *Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini*, cuyos resultados se muestran tanto en gráfico (Figura 5.18) como resumido en una tabla (Figura 5.19).



**Figura 5.18. Probabilidad de que una secuencia de aminoácidos se encuentre en la superficie de la BSA (*Bos Taurus*, Bovine) según la *Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini* [167].**



En la Figura 5.18 se muestra la probabilidad de que una secuencia de aminoácidos se encuentre en la superficie. Según este gráfico, las secuencias cuya probabilidad de encontrarse en la superficie sea mayor a uno, se considera que estarán accesibles para enlazarse con un compuesto externo [167].

Estas secuencias con alta probabilidad de encontrarse expuestas en la superficie de la BSA se recogen en la Figura 5.19.

**Predicted peptides:**

No.	Start Position	End Position	Peptide	Peptide Length
1	23	28	RRDTHK	6
2	117	122	KQEPER	6
3	129	143	HKDDSPDLPKLKPD	15
4	150	158	FKADEKKFW	9
5	165	170	IARRHP	6
6	242	247	LSQKFP	6
7	341	346	NYQEAK	6
8	356	362	EYSRRHP	7
9	373	379	AKEYEAT	7
10	515	521	TPDETYV	7
11	540	549	PDTEKQIKKQ	10
12	556	567	LKHKPKATEEQL	12

**Figura 5.19. Secuencias de aminoácidos con alta probabilidad de encontrarse en la superficie de la BSA (*Bos Taurus*, Bovine) según la *Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini*.**

Teniendo en cuenta estos resultados (Figura 5.19), es posible identificar, entre ellos, los aminoácidos capaces de enlazarse al  $\text{Cu}^{2+}$  inmovilizado, así como su posición dentro de la estructura primaria de la BSA (Tabla 5.2).

**Tabla 5.2. Histidinas y Triptófanos con alta probabilidad de encontrarse en la superficie de la BSA (*Bos Taurus*, Bovine).**

<b>Aminoácidos accesibles</b>
H27
H129
W158
H169
H361
H558

Por tanto, en la superficie de la BSA se encuentran 5 Histidinas y un Triptófano que podrían reaccionar con el  $\text{Cu}^{2+}$  inmovilizado en la matriz cromatográfica.

Teniendo en cuenta la cantidad total de aminoácidos externos accesibles en la BSA (97) y los aminoácidos que pueden enlazar al  $\text{Cu}^{2+}$  (6), la probabilidad de enlace es de:

$$\text{Probabilidad de enlace} = \frac{6}{97} = 0.062 = 6.2\% \quad (5.2)$$

Lo que significa que la probabilidad de que un ion de  $\text{Cu}^{2+}$  inmovilizado en la columna cromatográfica interaccione con un aminoácido con el que presente afinidad es de 6.2%.

### **5.3.2 Determinación de aminoácidos superficiales: Histidina y Triptófano en la Catalasa.**

Al igual que en el caso de la BSA, se evaluaron los aminoácidos superficiales de la Catalasa con el fin de determinar las Histidinas accesibles para su enlace con el  $\text{Cu}^{2+}$  inmovilizado.

### 5.3.2.1 Estructura primaria de la Catalasa.

En primer lugar, se determinó la estructura primaria de la Catalasa. Para ello, es necesario tener en cuenta que esta enzima está formada por cuatro subunidades idénticas unidas mediante un grupo Hemo.

Cada subunidad es identificada como Swiss-Prot ID P00432 y PDB 3J7B, y su estructura primaria es (Figura 5.20):

1	MADNRDPASD	QMKHWKEQRA	AQKPDVLTG	GGNPVGDKLN	SLTVGPRGPL	LVQDVVFTDE
61	MAHFDREIRP	ERVVHAKGAG	AFGYFEVTHD	ITRYSKAKVF	EHIGKRTPIA	VRFSTVAGES
121	GSADTVRDP	GFAVKFYTED	GNWDLVGNNT	PIFFIRDALL	FPSFIHSQKR	NPQTHLKDPD
181	MVWDFWSLRP	ESLHQVSFLF	SDRGIPDGHR	HMNGYGSHTF	KLVNANGEAV	YCKFHYKTDQ
241	GIKNLSVEDA	ARLAHEDPDY	GLRDLFNAIA	TGNYPSTWLY	IQVMTFSEAE	IFPFNPFDLT
301	KVWPHGDYPL	IPVGKLVNLR	NPVNYFAEVE	QLAFDPSNMP	PGIEPSDKM	LQGRLFAYPD
361	THRHRGPNY	LQIPVNCPIR	ARVANYQRDG	PMCMMDNQGG	APNYYPNSFS	APEHQPSALE
421	HRTHFSGDVQ	RFNSANDDNV	TQVRTFYLVK	LNEEQRKRLC	ENIAGHLKDA	QLFIQKKAVK
481	NFSDVHPEYG	SRIQALLDKY	NEEKPKNAVH	TYVQHGSLS	AREKANL	

**Figura 5.20. Estructura primaria de una subunidad de Catalasa (Bos Taurus, Bovine)[173].**

Por tanto, como se observa en la Figura 5.20, cada subunidad de la Catalasa está formada por 527 aminoácidos, lo que hace que la enzima completa tenga un total de 2108 aminoácidos.

### 5.3.2.2 Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini de la Catalasa (Emini Surface Accessibility Prediction).

Al igual que con la BSA, se realizó el análisis de la *Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini*.

Los resultados de la estructura primaria se recogen en la Figura 5.21.

#### Emini Surface Accessibility Prediction

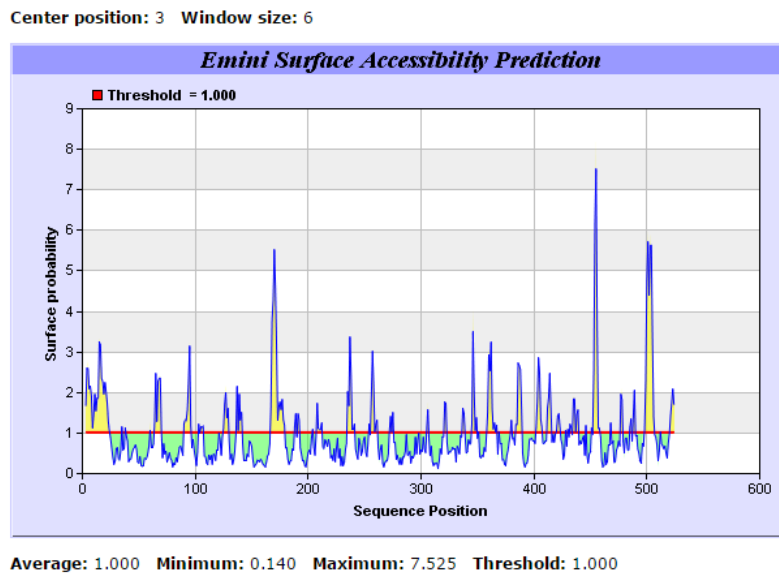
Sequence: P00432

```

1  MADNRDPASD QMKHWKEQRA AQKPDVLTG GGNPVGDKLN SLTVGPRGPL LVQDVVFTDE
61  MAHFDREERIP ERVVHAKGAG AFGYFEVTHD ITRYSKAKVF EHIGKRTPIA VRFSTVAGES
121 GSADTVRDPR GFAVKFYTED GNWDLVGNNT PIFFIRDALL FPSFIHSQKR NPQTHLKDPD
181 MVWDFWLRP ESLHQVSFLF SDRGIPDQHR HMGYGSHTF KLVNANGEAV YCKFHYKTDQ
241 GIKNLSVEDA ARLAHEDPDY GLRDLFNAIA TGNYPSTLY IQVMTFSEAE IFPFNPFDLT
301 KVNPHGDYPL IPVGKLVNLR NPVNYFAEVE QLAFDPSNMP PGIEPSPDKM LQGRLFAYPD
361 THRHRLGPNY LQIPVNCYPY ARVANYQRDG PMCMMDNQGG APNYYPNSFS APEHQPSALE
421 HRTHFSGDVQ RFNSANDDNV TQVRTFYLVK LNEEQQRKRLC ENIAGHLKDA QLFIQKKAVK
481 NFDVHPEYV SRIQALLDKY NEEKPKNAVH TYVQHGSLS AREKANL
    
```

**Figura 5.21. Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini de una subunidad de Catalasa (*Bos Taurus*, Bovine): estructura primaria.**

Además, se obtiene la *Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini*, cuyos resultados se muestran tanto en gráfico (Figura 5.22) como resumido en una tabla (Figura 5.23).



**Figura 5.22.** Probabilidad de que una secuencia de aminoácidos se encuentre en la superficie de una subunidad de Catalasa (*Bos Taurus*, Bovine) según la *Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini*.

En la Figura 5.22 se muestra la probabilidad de que una secuencia de aminoácidos se encuentre en la superficie. Como se comentó previamente, las secuencias cuya probabilidad de encontrarse en la superficie sea mayor a uno, se considera que estarán accesibles para enlazarse con un compuesto externo [167].

Estas secuencias con alta probabilidad de encontrarse expuestas en la superficie de la Catalasa se recogen en la Figura 5.23.

**Predicted peptides:**

No.	Start Position	End Position	Peptide	Peptide Length
1	3	24	DNRDPASDQMKHWKEQRAAQKP	22
2	64	70	FDRERIP	7
3	90	96	DITRYSK	7
4	167	179	SQKRNPQTHLKDP	13
5	235	241	HYKTDQG	7
6	256	261	EDPDYG	6
7	359	367	PDTHRHLRG	9
8	384	389	ANYQRD	6
9	402	407	PNYYPN	6
10	453	458	EEQRKR	6
11	498	506	DKYNEEKPK	9

**Figura 5.23. Secuencias de aminoácidos con alta probabilidad de encontrarse en la superficie de una subunidad de Catalasa (*Bos Taurus*, Bovine) según la *Predicción de la Accesibilidad Superficial Emini*.**

Teniendo en cuenta estos resultados (Figura 5.23), es posible identificar, entre ellos, los aminoácidos capaces de enlazar al  $\text{Cu}^{2+}$  inmovilizado, así como su posición dentro de la estructura primaria de la Catalasa (Tabla 5.3).

**Tabla 5.3. Histidinas y Triptófanos con alta probabilidad de encontrarse en la superficie de una subunidad de Catalasa (*Bos Taurus*, Bovine).**

Aminoácidos accesibles	
H14	Doble enlace
W15	
H175	Enlazada con el grupo Hemo
H235	Enlace sencillo
H362	Doble enlace
H364	

Por tanto, en la superficie de cada subunidad de la Catalasa se encuentran 5 Histidinas y un Triptófano. De ellas, una Histidina (His175) se sabe que está enlazada con el grupo Hemo [169, 174], por lo que se espera que no reaccione. Además, según la cercanía de las Histidinas y Triptófanos, es probable que se formen dobles enlaces con el  $\text{Cu}^{2+}$  inmovilizado en la matriz cromatográfica.

Teniendo en cuenta la cantidad total de aminoácidos externos accesibles en la Catalasa ( $98 \times 4 = 392$ ) y los enlaces que se pueden formar con el  $\text{Cu}^{2+}$  ( $3 \times 4 = 12$ ), la probabilidad de enlace es de:

$$\text{Probabilidad de enlace} = \frac{12}{392} = 0.031 = 3.1\% \quad (5.3)$$

Lo que significa que la probabilidad de que un ion de  $\text{Cu}^{2+}$  inmovilizado en la columna cromatográfica interaccione con un aminoácido con el que presente afinidad es de 3.1%.

## 5.4 COMPARACIÓN ENTRE LOS ENLACES DE LA BSA Y LA CATALASA SEGÚN SUS HISTIDINAS Y TRIPTÓFANOS ACCESIBLES.

Los datos de número de Histidinas y Triptófanos residuales para la BSA y Catalasa, así como la probabilidad de enlace con  $\text{Cu}^{2+}$  inmovilizado en la columna cromatográfica se resumen en la Tabla 5.4.

**Tabla 5.4. Resumen de las propiedades de enlace de la BSA y la Catalasa.**

	<b>Aminoácidos accesibles</b>	<b>Histidinas y Triptófanos accesibles</b>	<b>Probabilidad de enlace</b>
<b>BSA</b>	97	6	6.2%
<b>Catalasa</b>	392	2 dobles enlaces 1 enlace sencillo	3.1%

Por tanto, según la Tabla 5.4, cabría esperar que la BSA se adsorbiese más rápido y en mayor cantidad que la Catalasa debido a que presenta una mayor probabilidad de enlace.

Además, el hecho de que la BSA tenga un tamaño inferior al de la Catalasa (66 kDa BSA, 240 kDa Catalasa) hace que ocupe menos espacio y, por tanto, que tenga una menor huella.

Además, la capacidad de elución de la BSA sería mayor debido a dos motivos:

En primer lugar, debido a la **diferencia de tamaño entre la BSA y la Catalasa**. Esto hace que el agente competitivo acceda con más facilidad hacia el  $\text{Cu}^{2+}$  por tener **menor impedimento estérico**, lo que facilita la ruptura del enlace que éste ha formado con la Histidina o Triptófano accesible.



Por otra parte, como la **Catalasa** es capaz de enlazarse mediante **dobles enlaces**, el **proceso de elución es más difícil** como consecuencia de una constante de enlace mayor ( $149.000,84 \text{ M}^{-1}$  BSA <  $214.000 \text{ M}^{-1}$  Catalasa) a 304K [53].

## **5.5 CONCLUSIONES.**

De los resultados obtenidos en el presente capítulo se concluye:

- La purificación de biomoléculas mediante cromatografía IMAC puede emplearse para BSA y Catalasa debido a los aminoácidos accesibles que presentan en su superficie.
- En la superficie de la BSA se encuentran 5 Histidinas y un Triptófano, obteniéndose una probabilidad de enlace 6.2 %.
- En la superficie de cada subunidad de la Catalasa se encuentran 5 Histidinas y un Triptófano. De ellas, se espera que se puedan producir dos dobles enlaces o un enlace sencillo, obteniéndose una probabilidad de enlace 3.1 %.
- La BSA tiene menor tamaño que la Catalasa, y su probabilidad de enlace es el doble, lo que hace esperar que el rendimiento de adsorción sea mayor para el caso de la BSA.
- La Catalasa presenta mayor impedimento estérico que la BSA y la posibilidad de interaccionar mediante dobles enlaces, lo que hace pensar que el tiempo necesario de elución sea mayor para la catalasa, y su rendimiento de elución menor.



## **Capítulo 6.**

### **Validación del monolito de Agarosa Superporosa para cromatografía IMAC:**

### **Experimentos de adsorción y elución**



Una vez finalizados los estudios preliminares de interacción, se procede a validar el monolito como soporte cromatográfico para la adsorción y posterior elución de dos biomoléculas mediante cromatografía IMAC. De esta forma, se pretende demostrar que este tipo de soporte macroporoso puede ser empleado de forma satisfactoria como fase estacionaria en este tipo de proceso.

La finalidad del presente capítulo es doble:

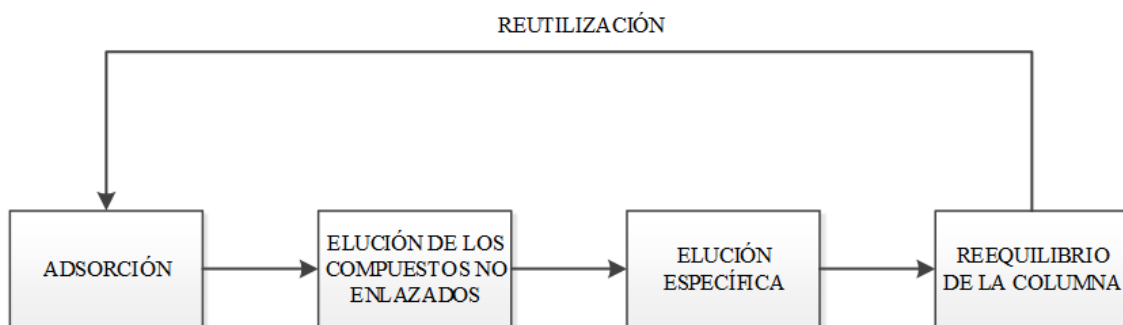
- Comparar el comportamiento de adsorción y elución de **dos biomoléculas** tipo (BSA y Catalasa) con las mismas condiciones experimentales, utilizando el **monolito de Agarosa Superporosa** descrito en el Capítulo 4 como soporte cromatográfico.
- Estudiar la influencia de la estructura macroporosa del monolito en el comportamiento de adsorción y elución de estas biomoléculas (BSA y Catalasa), realizando una comparación con estudios previos utilizando un **monolito Cerámico recubierto con Agarosa D5** como soporte cromatográfico [38, 53].

## **6.1 SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN.**

Como se ha mencionado previamente, la finalidad del presente capítulo es la comparación de las propiedades de adsorción-elución de dos biomoléculas (BSA y Catalasa), y la comparación con los resultados obtenidos utilizando otro soporte, un monolito cerámico recubierto de Agarosa D5 [38, 53].

Por ello, se procederá a describir la selección de las condiciones de operación empleadas en cada etapa.

De forma general, las etapas que forman el proceso cromatográfico se resumen en la Figura 6.1, y se detallarán a continuación junto con las condiciones en las que se realizará cada una de ellas, en el presente estudio.



**Figura 6.1.** Esquema de las etapas en la reutilización del monolito [38, 175].

## 6.1.1 Materiales y métodos.

### 6.1.1.1 Reactivos:

Los reactivos utilizados en el presente capítulo se resumen en la Tabla 6.1.

**Tabla 6.1.** Reactivos utilizados y empresa comercializadora.

Reactivos	Empresa
Cloruro sódico (NaCl), Fosfato monobásico sódico (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) Tampón fosfato salino pH 7.4 (PBS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Imidazol	Aldrich (St. Louis, MO, USA).
Hidroximetilaminometano (TRIS) Fosfato sódico dibásico anhidro (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) Reactivo de Bradford (Brilliant Blue G) Albúmina de suero Bovino, polvo liofilizado ≤96% (BSA) Catalasa de hígado bovino (EC 1.11.1.6)	Sigma (St. Louis, MO, USA).
Peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30% w/v	Panreac (Barcelona, España)

### **6.1.1.2 Equipos utilizados:**

Los experimentos se realizaron en una columna cromatográfica con camisa refrigerante Pharmacia Biotech XK 16/20 16 mm de diámetro interno y 200 mm altura de tubo (Barcelona, España) que se mantuvo a 23°C con un baño termostático Frigiterm 10 JP Selecta (Barcelona, España).

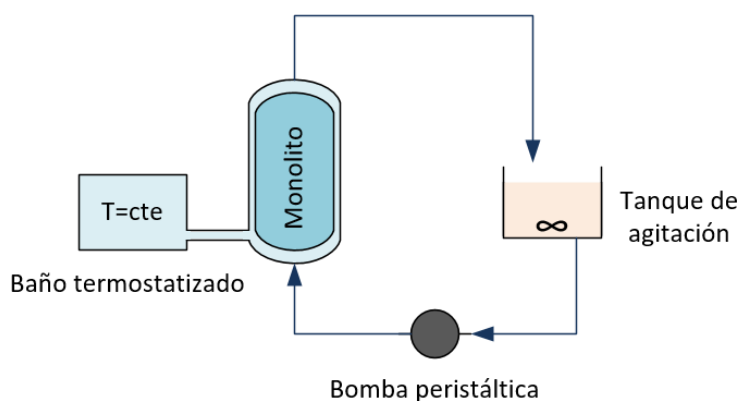
Se utilizó una bomba peristáltica multicanal Pumpdrive 5201 con un cassette medio (0,3-25 mL/min) fabricado por Heidolph Instruments (Schwabach, Alemania).

Las medidas de absorbancia a 280, 595 y 812 nm se obtuvieron mediante un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Madrid, España).

### **6.1.2 Adsorción.**

En primer lugar, se realiza la adsorción de la biomolécula en la columna cromatográfica.

Para ello, se hace circular de forma continua una disolución de 50 mL de biomolécula (BSA o Catalasa), con una concentración y caudal conocido, a través de una columna cromatográfica encamisada Pharmacia Biotech XK 16/20 que contiene el monolito de Agarosa Superporosa y lo mantiene a temperatura constante (Figura 6.2).



**Figura 6.2. Instalación para el proceso de adsorción, compuesta por la columna cromatográfica monolítica, el baño termostatzado, la bomba peristáltica, y un tanque de agitación.**

La adsorción de la biomolécula en el interior de la columna es cuantificada evaluando la absorbancia de la muestra que contiene el tanque agitado (considerado de mezcla perfecta) a lo largo del tiempo, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 a una longitud de onda de 280 nm, hasta que se alcanza el equilibrio de adsorción y, por tanto, la concentración de biomolécula alcanza un valor constante.

Las condiciones escogidas para el proceso de adsorción deben ser las mismas para ambas biomoléculas y lo más semejantes posibles a las utilizadas por Vega [53], con el fin de que se puedan realizar las comparaciones deseadas BSA-Catalasa y entre los diferentes monolitos.

Por tanto, las condiciones de trabajo son las siguientes:

La **disolución tampón** escogida para esta etapa es el **PBS 50 mM pH 7.4**, ya que es el tampón en el que la Catalasa presenta mejor solubilidad y evita la formación de micelas o su desnaturalización al cabo de algunas horas [53].

Esta misma disolución tampón se utiliza con la BSA para poder comparar los resultados con los de la Catalasa. Además, en el trabajo de Vega [53] se concluyó que, aunque en un primer momento parecía que el pH óptimo de trabajo para la BSA era 4.5 debido a su pI (punto isoelectrico), se obtuvo un mejor rendimiento de adsorción con un



pH superior a este pI debido a que la proteína está cargada negativamente y, por lo tanto, se podrían favorecer las interacciones con el ion metálico [53].

Además, algunos autores sugieren que la adsorción de proteínas óptima se encuentra en el rango de pH 6-8 cuando se utilizan metales como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  que se enlazan mediante histidinas superficiales [176].

Teniendo en cuenta la **fuerza iónica** de la disolución escogida (la del tampón PBS 50 mM pH 7.4), su valor es superior al utilizado previamente en la adsorción de BSA por Vega [53]. Sin embargo, la utilización de un disolvente con mayor fuerza iónica podría beneficiar la interacción entre el  $\text{Cu}^{2+}$  y los residuos de histidina de la proteína debido al plegamiento de las hélices, haciendo que dichos residuos sean más accesibles [53].

Por otra parte, la **concentración de biomolécula** utilizada para ambos compuestos es la misma que la utilizada por Vega [53], (**0.7 mg/mL**) con el fin de poder comparar los resultados obtenidos con los del monolito cerámico recubierto con Agarosa D5.

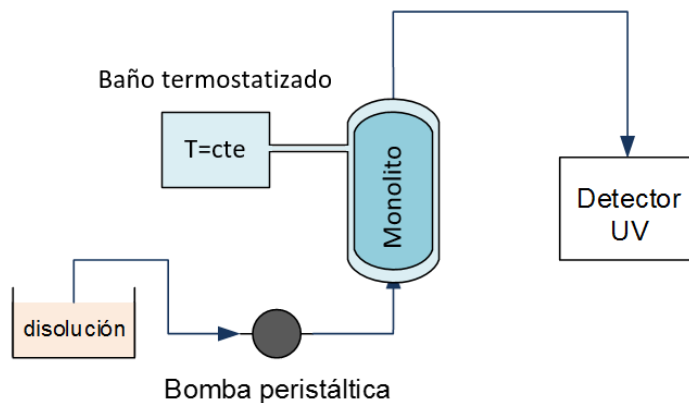
Finalmente, el **caudal** empleado para esta etapa de adsorción con ambos compuestos es de **1.5 mL/min** ya que es el caudal máximo al que la Catalasa puede recircularse en estas condiciones sin que se formen agregados o micelas [53].

Además, como se mencionó previamente en los capítulos anteriores, los monolitos presentan un mecanismo de transferencia predominantemente convectivo, lo que hace que su capacidad de adsorción sea generalmente independiente de su caudal [14].

### **6.1.3 Elución no específica o lavado.**

Una vez alcanzado el equilibrio de adsorción, se hace circular a través del monolito una disolución para retirar la cantidad de proteína que no se encuentre adsorbida de forma específica.

El proceso de elución se realizó utilizando una instalación en discontinuo (Figura 6.3).



**Figura 6.3. Instalación de elución, compuesta por la columna cromatográfica monolítica, el baño termostático, la bomba peristáltica, la disolución y el espectrofotómetro.**

Para ello, se analiza la corriente de salida tomando datos cada minuto y se mide su absorbancia a 280 nm hasta que la concentración de biomolécula sea despreciable, lo que indica que no es posible eluir más proteína.

En este caso, la disolución empleada es la misma que en el proceso de adsorción para no cambiar las condiciones dentro de la columna cromatográfica, es decir, **PBS 50 mM pH 7.4**.

El caudal utilizado varía según el experimento realizado ya que se estudia la influencia del caudal en el rendimiento de elución.

#### **6.1.4 Elución específica.**

Para retirar la cantidad de biomolécula enlazada de forma específica, es decir, mediante enlaces entre algún aminoácido superficial (His o Trp) y el ion de  $\text{Cu}^{2+}$  inmovilizado se realiza el mismo proceso que en el caso de la elución no específica (Figura 6.3).

Sin embargo, en este caso se emplea una disolución de **Imidazol 0.2 M con NaCl 1 M en tampón fosfato pH 8.1** para ambas biomoléculas, utilizándose diferentes caudales para ello.

Esta disolución ha sido utilizada previamente para eluir Catalasa [166] y presenta la concentración de Imidazol óptima determinada para la elución de BSA con criogeles [175] y con el monolito cerámico [38, 175]. Además, se ha utilizado una cantidad elevada de NaCl ya que al aumentar la fuerza iónica se desestabilizan las interacciones secundarias y, como consecuencia, se mejora el proceso de elución [13]. El pH de la disolución es el obtenido con esas concentraciones de soluto.

En esta etapa cabe destacar que se realizaron pruebas de elución de la Catalasa con la disolución utilizada con el monolito cerámico, NaSCN 0.2 M en PBS pH 7.4 [175]. Sin embargo, en este monolito se observa que el rendimiento de elución no supera el 68%, y que la Catalasa obtenida pierde su actividad, seguramente porque la presencia del ion tiocianato envenena la enzima [177-179], lo que hace que esta disolución no sea adecuada para esta aplicación.

### **6.1.5 Reequilibrio de la columna.**

Una vez se ha eluido la proteína o enzima adsorbida de forma específica y no específica, se procede a reequilibrar la columna para devolverle las condiciones necesarias para una nueva utilización.

Para ello, se hace circular una disolución de **TRIS 50 mM pH 10** con el fin de retirar el imidazol que se encuentra en el interior de la columna, enlazada con el  $\text{Cu}^{2+}$  inmovilizado, ya que el TRIS presenta gran afinidad por este ion metálico [180].

De esta forma, este compuesto desplazaría las moléculas de imidazol unidas a los iones de  $\text{Cu}^{2+}$ , lo que haría que la columna no pierda centros activos disponibles para un posterior ciclo de adsorción.

La disolución de TRIS utilizada posee un pH superior al  $pK_2$  del IDA ( $pK_1=2,98$ ;  $pK_2=9,89$ ) con el fin de minimizar la pérdida de metal por desestabilización del agente quelante (como se explicó en el capítulo 3), ya que es la desventaja más importante de la purificación de proteínas mediante cromatografía IMAC.

Este proceso se realiza, al igual que los procesos anteriores de elución, en discontinuo (Figura 6.3) y con un caudal de **1.5 mL/min** y se sigue espectrofotométricamente la salida del Imidazol midiendo la absorbancia a 280 nm durante unas 2 h, hasta que el valor de la absorbancia es cero.

### **6.1.6 Métodos de análisis.**

A continuación se describen los métodos de análisis utilizados para llevar a cabo la cuantificación de las propiedades relacionadas con la BSA y la Catalasa.

#### **6.1.6.1 Calibrado de la concentración de BSA.**

La BSA, al igual que el resto de proteínas, presenta un máximo de absorbancia a 280 nm por la presencia de triptófano y tirosina [181]. Por tanto, es posible obtener mediante espectrofotometría la concentración de proteína presente en cada disolución, determinando la recta de calibrado correspondiente.

Para ello, se prepararon una disoluciones patrón de BSA en PBS 50 mM pH 7.4, con unas concentraciones de proteína delimitadas por las condiciones de trabajo, entre 1.0-0.1 mg/mL. Dichas disoluciones patrón se evaluaron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm.

Como se mencionó en la sección 6.1, se han escogido estas condiciones experimentales con el fin de poder comparar los resultados experimentales con resultados previos en los que se utilizó un monolito cerámico recubierto con Agarosa D5 [53].

Una vez obtenidos los valores de absorbancia para cada concentración, se calculó la dependencia entre ambas variables, que se resumen en la Tabla 6.2 y Figura 6.4:

Tabla 6.2. Valores de absorbancia para BSA en PBS 50 mM pH 7.4, a 280 nm.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia ( $\lambda=280$ nm)
0.1	0.0684
0.3	0.1742
0.5	0.2894
0.7	0.4010
0.9	0.5161
1.0	0.5752

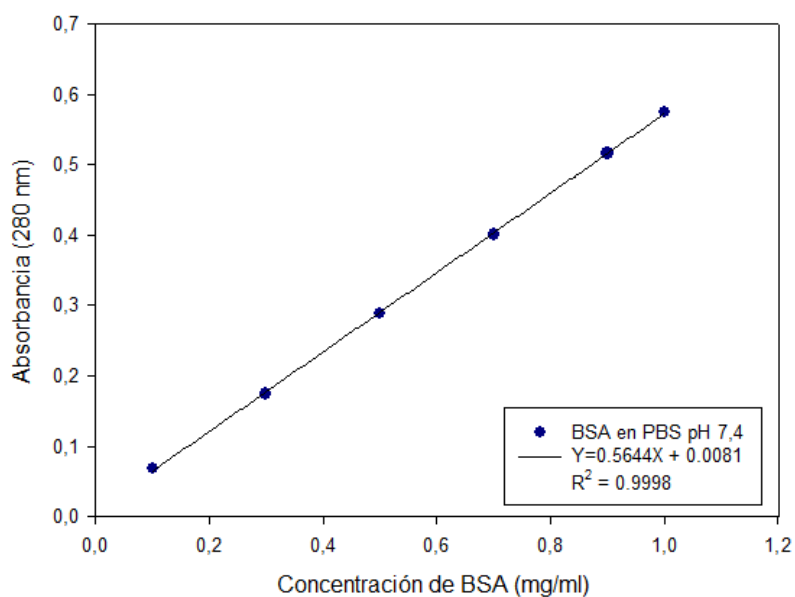


Figura 6.4. Recta de calibrado de BSA en PBS pH 7.4.

Con estos datos es posible relacionar la absorbancia a 280 nm con la concentración de la disolución de BSA.

Con el fin de verificar que el valor de la absorbancia a 280 nm es una medida directa de la cantidad de proteína, y no hay interferencia con otras especies que absorben a esa longitud de onda como el  $\text{Cu}^{2+}$ , el imidazol o el TRIS, se realizarán ensayos de Bradford.

### 6.1.6.2 Curva de calibrado del Método de Bradford.

Como se ha mencionado previamente, se utiliza el método de Bradford en los experimentos de elución para verificar que las medidas realizadas a 280 nm corresponden a la presencia de proteína y no hay interferencia con otros compuestos que pueden absorber radiación a esa longitud de onda como el  $\text{Cu}^{2+}$ , el imidazol o el TRIS base.

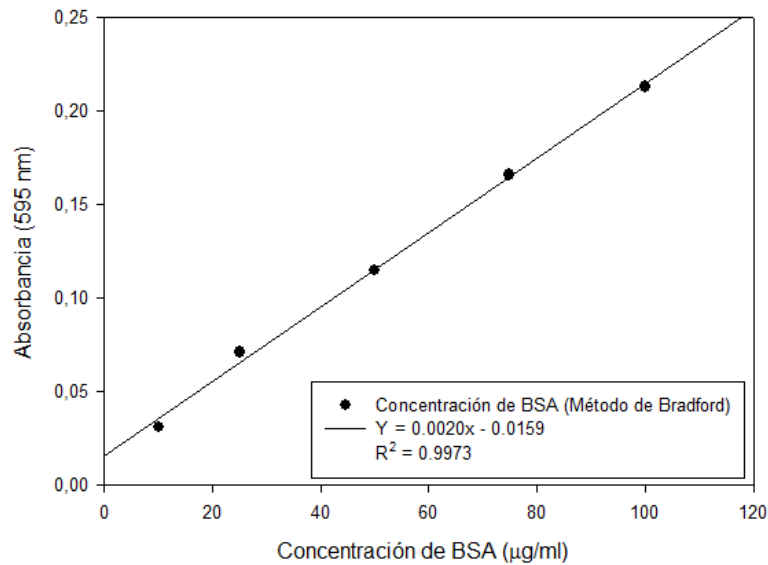
Para ello, se realizó el siguiente procedimiento:

- Se mezcló 1 ml de reactivo Bradford (Brilliant Blue G) con 100 $\mu\text{L}$  de muestra.
- Tras 20 min se midió la absorbancia a 595 nm.

Los resultados de la curva de calibrado se muestran en la Tabla 6.3 y Figura 6.5.

**Tabla 6.3. Valores de absorbancia para el Método de Bradford a 595 nm.**

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia (595 nm)
10	0.031
25	0.071
50	0.115
75	0.166
100	0.213



**Figura 6.5. Recta de calibrado del Método de Bradford.**

La recta de calibrado se realizó para diferentes disoluciones (tampón de adsorción, tampón de elución específica, tampón de reequilibrio) y proteínas (BSA y Catalasa), y puede concluirse que se ajusta a todos los resultados de forma adecuada (con un  $R^2$  de 0.9889-0.9987).

Esta recta de calibrado se utilizará en cada etapa donde se realiza el análisis Bradford.

### 6.1.6.3 Calibrado de la concentración de Catalasa.

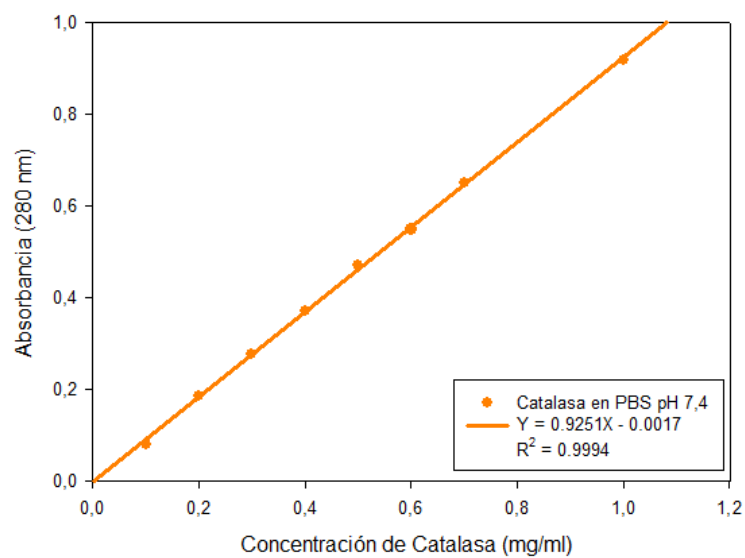
La Catalasa, al igual que la BSA, presenta un máximo de absorbancia a 280 nm [181]. Por tanto, es posible aplicar el mismo método de cuantificación para ambas biomoléculas.

Para ello, se prepararon unas disoluciones patrón de Catalasa en PBS 50 mM pH 7.4, con unas concentraciones de proteína delimitadas por las condiciones de trabajo, entre 1.0-0.1 mg/mL. Dichas disoluciones patrón se evaluaron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm.

Los valores de absorbancia obtenidos se resumen en la Tabla 6.4 y Figura 6.6.

**Tabla 6.4. Valores de absorbancia para Catalasa en PBS 50 mM pH 7.4, a 280 nm.**

Concentración (mg/ml)	Absorbancia ( $\lambda=280$ nm)
0.1	0.081
0.2	0.185
0.3	0.278
0.4	0.370
0.5	0.472
0.6	0.549
0.7	0.650
1.0	0.917



**Figura 6.6. Recta de calibrado de Catalasa en PBS 50 mM pH 7.4.**



Al igual que para el caso de la BSA, se realizarán ensayos de Bradford (sección 6.1.6.2) con el fin de verificar que el valor de la absorbancia a 280 nm es una medida directa de la cantidad de enzima, y no hay interferencia con otras especies que absorben a esa longitud de onda como el  $\text{Cu}^{2+}$ , el imidazol o el TRIS.

#### **6.1.6.4 Calibrado de la actividad de la Catalasa.**

Una unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por minuto a  $25^\circ\text{C}$ , es un factor importante ya que va a determinar si el método empleado es adecuado para purificar este tipo de compuestos más complejos.

Como se mencionó previamente, la Catalasa es una enzima común en el organismo de los seres vivos que cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, tal como se muestra en la Reacción (6.1) [159, 161-163].



El método más habitual para determinar la actividad de la Catalasa es siguiendo el consumo de sustrato, ya que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se detecta a 240 nm [162, 163].

Para ello, es necesario determinar la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en función de la medida de absorbancia a 240 nm (Tabla 6.5 y Figura 6.7).

Tabla 6.5. Valores de absorbancia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS pH 7.4 a 240 nm.

Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	Absorbancia ( $\lambda=240$ nm)
0.5	0.0127
2.5	0.1006
5.0	0.1943
10	0.3786
15	0.5806
20	0.7740
25	0.9722

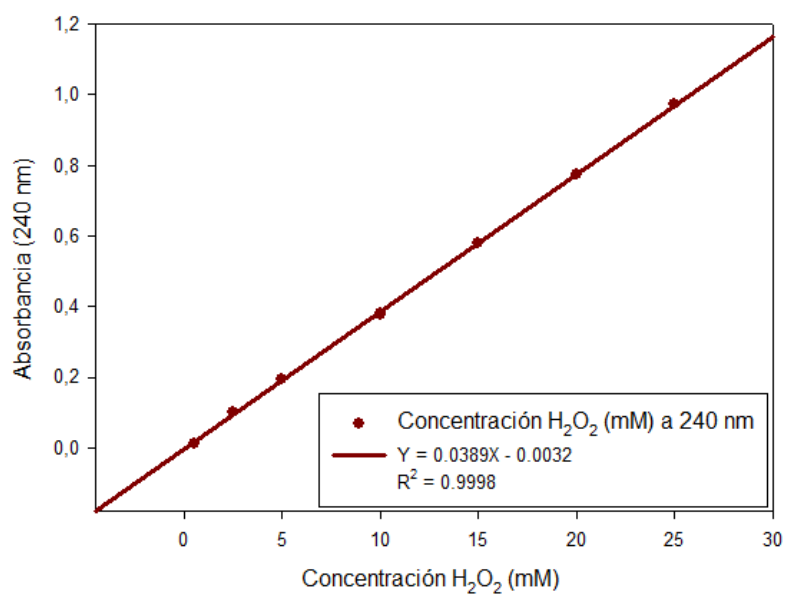


Figura 6.7. Recta de calibrado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm.

A partir de esta recta de calibrado es posible determinar la actividad de la Catalasa. El método empleado es el de Beers y Siziers [182] modificado por Li y Schellhorn [183].

El método propuesto es el siguiente:

- Se mezclan 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en PBS con 250  $\mu\text{L}$  de disolución con Catalasa con una concentración adecuada.
- Se mide la concentración de sustrato en los valores iniciales para calcular la velocidad inicial enzimática.

Una vez se conocen los valores iniciales se puede calcular la actividad de la catalasa, y determinar la pérdida de actividad de la misma.

## **6.2 ESTUDIOS PREVIOS AL PROCESO CROMATOGRÁFICO.**

Con el fin de optimizar el proceso de adsorción-desorción y tener un mayor conocimiento de los diferentes factores que puedan afectar a dicho proceso, se realizaron una serie de estudios previos que se describen a continuación.

### **6.2.1 Estudio de la formación de enlaces no específicos entre la proteína y la matriz cromatográfica.**

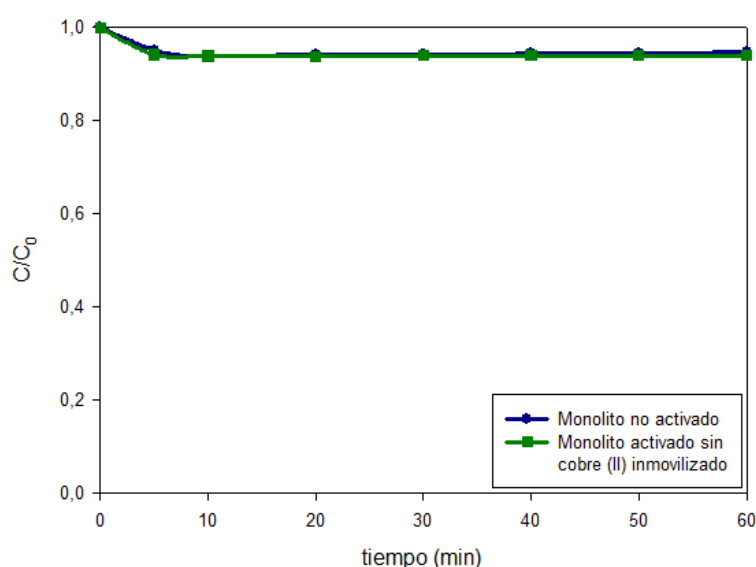
Uno de los factores que es necesario tener en cuenta para evaluar la selectividad de un proceso de separación por cromatografía es la adsorción no específica producida por una interacción no deseada entre el compuesto y la matriz cromatográfica.

Por ello, es necesario evaluar la existencia de interacciones no específicas entre la biomolécula y el soporte monolítico con el fin de garantizar que la interacción va a ser reversible y, por tanto, es posible la recuperación de la proteína enlazada específicamente.

El estudio de la capacidad de adsorción no específica se realizó utilizando dos tipos diferentes de monolito:

- Monolito de Agarosa Superporosa sin activar.
- Monolito de Agarosa Superporosa activado sin  $\text{Cu}^{2+}$  inmovilizado.

Se realizaron experimentos de adsorción de BSA 0.7 mg/mL en PBS 50 mM pH 7.4 a un caudal de 1.5 mL/min, y los resultados obtenidos se resumen en la Figura 6.8.



**Figura 6.8. Adsorción no específica de la BSA en la superficie de un monolito no activado (línea azul) y en un monolito activado sin  $\text{Cu}^{2+}$  inmovilizado (línea verde).**

Como se observa en la Figura 6.8, ambos monolitos muestran comportamientos similares. En ellos se produce una ligera disminución de la concentración de proteína al iniciar el experimento.

Sin embargo, este comportamiento se puede explicar por un efecto de dilución, ya que el monolito es un 95% agua. Por tanto, al hacer circular a través de él una disolución de proteína, ésta difundirá en el interior del monolito. Como consecuencia, la concentración de biomolécula a la salida del monolito es menor, lo que hace que la concentración en el tanque agitado disminuya ligeramente.

Es decir, los 50 ml iniciales de disolución 0.7 mg/mL ahora son unos 53 mL, por lo que la concentración de la disolución es de unos 0.66 mg/mL, y la relación con la concentración inicial es 0.94 aproximadamente, que es lo que se observa en la Figura 6.8.

Además, estos resultados se corroboraron repitiendo el experimento con una disolución de Catalasa 0.7 mg/mL en PBS 50 mM pH 7.4 a un caudal de 1.5 mL/min, donde se obtuvo prácticamente el mismo resultado.

Por tanto, se concluye que **este monolito no presenta interacciones no específicas entre la proteína y la estructura monolítica (activada o sin activar) cuando no hay presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ .**

### **6.2.2 Evaluación de la presencia de $\text{Cu}^{2+}$ en cada etapa cromatográfica: Estabilidad del ligando.**

Como se mencionó previamente, la pérdida de la eficiencia en la columna en este tipo de proceso suele estar generada por un ensuciamiento, la pérdida del ion metálico quelado, o la presencia de proteína no eluida o agentes competitivos que bloquean centros activos [38, 53].

De todos estos factores posibles, es importante conocer si se produce una pérdida del metal inmovilizado durante el proceso de purificación de biomoléculas para su uso terapéutico, debido a los problemas que presentan la presencia de metales en el organismo [184, 185]. Por ello, es necesario evaluar la cantidad de  $\text{Cu}^{2+}$  que contiene las muestras de biomolécula recuperadas.

Por este motivo, es necesaria la evaluación de la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  en cada disolución y etapa del proceso cromatográfico. Para ello, se ha identificado y cuantificado la presencia de este ion en cada disolución utilizada en el presente capítulo.

### 6.2.3 Método de análisis del $\text{CuCl}_2$ .

El método utilizado para cuantificar la cantidad de  $\text{Cu}^{2+}$  presente en cada etapa del proceso cromatográfico es el método espectrofotométrico.

Para ello, se realizó el espectro de absorción del  $\text{CuCl}_2$  5 mg/mL en agua (Figura 6.9) a fin de determinar la longitud de onda a la que este compuesto presenta un máximo de absorción.

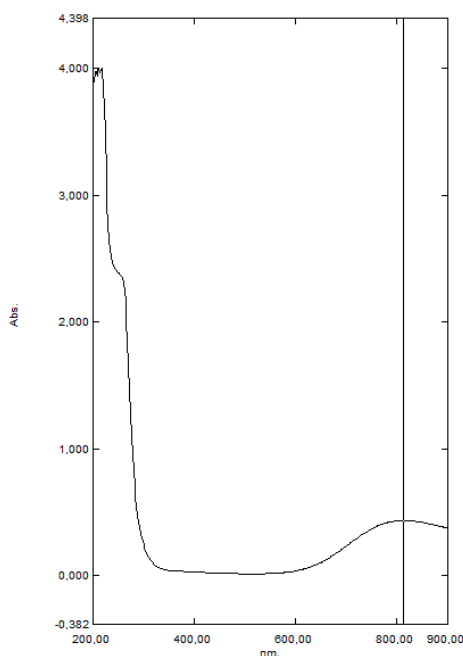


Figura 6.9. Espectro de absorción del  $\text{CuCl}_2$  5 mg/mL en disolución acuosa.

No.	P/V	Wavelength nm.	Abs.
1	↑	812,00	0,436
2	↓	520,00	0,016

Figura 6.10. Máximos y mínimos relativos obtenidos en el espectro de absorción del  $\text{CuCl}_2$  5 mg/mL en disolución acuosa.

Por tanto, como se observa en las (Figura 6.9 y Figura 6.10), la longitud de onda a la que el  $\text{CuCl}_2$  5 mg/mL presenta una absorción máxima es de 812 nm, por lo que se utilizará esta longitud de onda para evaluar la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  presente en cada disolución.

Además, es importante destacar que este compuesto presenta valores de absorbancia a  $\lambda=280$  nm muy elevados (mayor a 2) lo que hace que, en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , las disoluciones presenten un valor de absorbancia elevado a esa longitud de onda.

La recta de calibrado del  $\text{Cu}^{2+}$  en agua a la longitud máxima (812 nm) se muestra en la Figura 6.11.

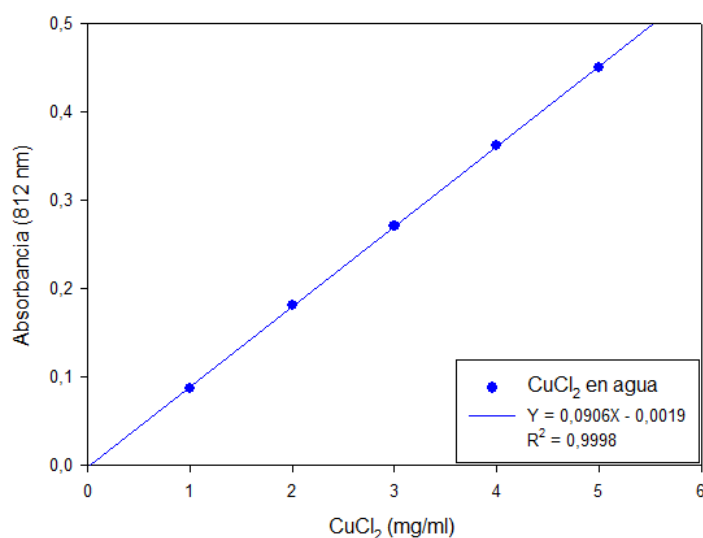


Figura 6.11. Recta de calibrado del  $\text{CuCl}_2$  en agua (812 nm).

Por tanto, con esta relación entre la concentración de  $\text{CuCl}_2$  y su absorbancia a 812 nm es posible determinar la cantidad de  $\text{Cu}^{2+}$  presente en una muestra, en el intervalo de trabajo.

#### **6.2.4 Evaluación de la pérdida de $\text{Cu}^{2+}$ en el proceso de adsorción: PBS 50 mM pH 7.4.**

La presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  en la etapa de adsorción (o de elución no específica) no puede ser determinada o cuantificada mediante la recta de calibrado a 812 nm, ya que a ese pH el  $\text{Cu}^{2+}$  forma el quelato  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , obteniéndose un precipitado de color azul claro [186] que no puede ser determinado por espectrofotometría.

Como consecuencia, la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  a ese pH se determina mediante la observación directa, o mediante medidas de turbidez o valores de absorbancia a 280 nm elevados que evidencian la presencia del metal, que en este caso forma precipitados y aumenta aún más la absorbancia por dispersión de la radiación.

Por tanto, cuando el  $\text{Cu}^{2+}$  no está bien quelado y sale de la columna en el proceso de adsorción, la absorbancia de la disolución de biomolécula a 280 nm presenta valores superiores a los esperados y la disolución se enturbia.

Por último, cuando esto sucede no se produce la adsorción de la proteína en el monolito.

Por todo ello, **es posible asegurar que no se produce pérdida del ligando metálico en el proceso de adsorción (ni elución no específica).**

#### **6.2.5 Evaluación de la pérdida de $\text{Cu}^{2+}$ en el proceso de elución específica: Imidazol 0.2M en tampón fosfato 50 mM, 1M NaCl pH 8.1.**

Como se ha descrito previamente, después de la etapa de adsorción y elución no específica se realiza la elución específica utilizando Imidazol 0.2M en tampón fosfato 50 mM, 1M NaCl pH 8.1.

Al igual que en el caso anterior, la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  en esta disolución se detecta mediante observación visual, medida de la turbidez y la obtención de un valor de absorbancia a 280 nm excesivamente alto.



Además, se utiliza el **método de Bradford** para corroborar que el valor de la absorbancia a 280 nm es, en todo momento, una cuantificación directa y exclusiva de la cantidad de biomolécula presente en la muestra. Esto es necesario puesto que el  $\text{Cu}^{2+}$ , así como otras especies como imidazol, absorben radiación a esa longitud de onda y podrían enmascarar la medida, provocando un falso positivo de biomolécula.

Como no se cumple ninguno de estos requisitos, **es posible asegurar que no se produce pérdida del ligando metálico en el proceso de elución específica.**

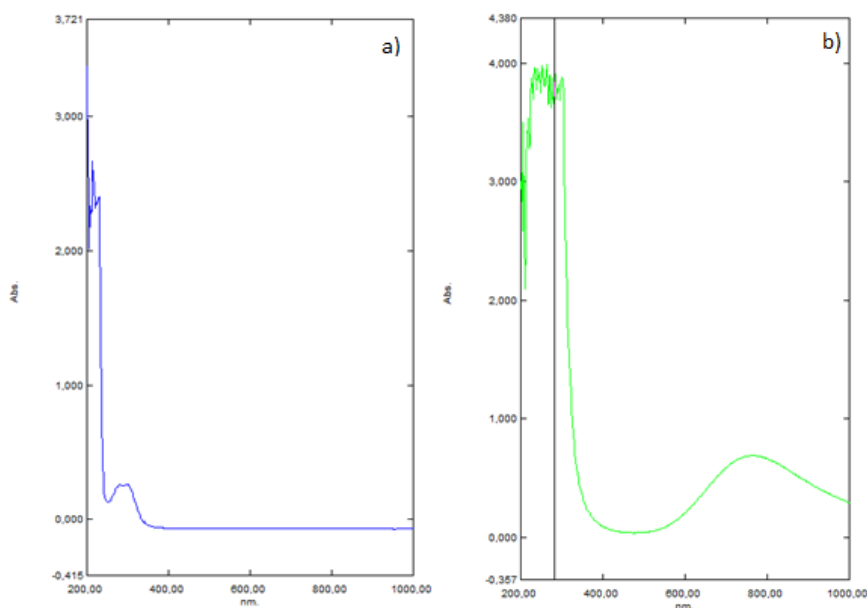
### **6.2.6 Evaluación de la pérdida de $\text{Cu}^{2+}$ en el proceso de regeneración: TRIS 50 mM pH 10.**

Después del proceso de adsorción y elución de la proteína, se lava la columna con una disolución de TRIS 50 mM pH 10 para devolver a la matriz las condiciones óptimas de utilización en un nuevo ciclo.

Como se mencionó previamente en la sección 6.1.5, con este lavado se pretende retirar todo el imidazol unido al  $\text{Cu}^{2+}$  fijado en la columna, y se sigue el proceso midiendo la absorbancia a 280 nm. Sin embargo, es necesario conocer qué especies están siendo eluidas de la columna en esta etapa.

Lo ideal sería que sólo se eliminase el imidazol utilizado como agente competitivo en la etapa de elución específica, y que la columna mantenga el quelato con el  $\text{Cu}^{2+}$ .

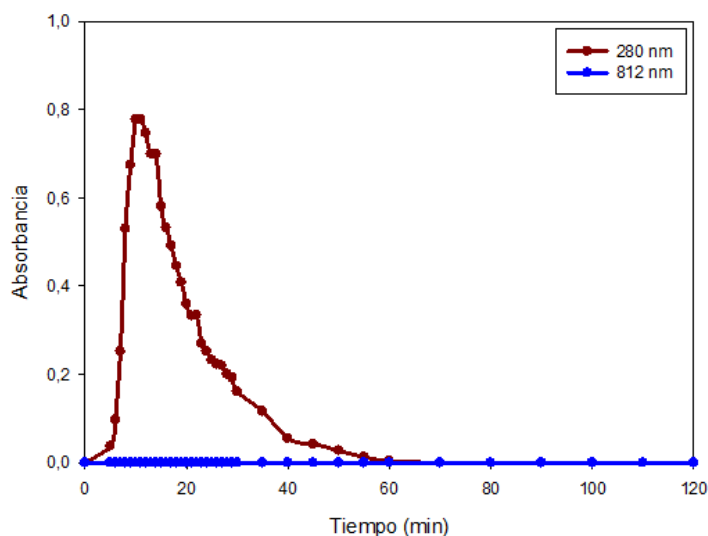
Para comprobar qué ocurre en el proceso, en primer lugar se determinan los espectros de absorción del imidazol y de la disolución de  $\text{CuCl}_2$  utilizando la disolución de reequilibrio como blanco, a fin de comprobar si existen interferencias a 280 o 812 nm (Figura 6.12a) y Figura 6.12b)).



**Figura 6.12. Espectros de absorción utilizando a disolución de lavado (Trizma 50 mM pH 10) como blanco, a) disolución de elución específica: Imidazol 0.2M en tampón fosfato 1M NaCl pH 8.1, b) disolución de ion metálico:  $\text{CuCl}_2$  5 mg/mL en agua.**

En las Figura 6.12a) y Figura 6.12b) se observa que no existe interferencia entre las especies imidazol y  $\text{Cu}^{2+}$  a 812 nm. Por tanto, se puede determinar la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  midiendo la absorbancia a 812 nm.

Para comprobar si hay presencia  $\text{Cu}^{2+}$  en la disolución de salida de la columna en la etapa de reequilibrio (TRIS 50 mM pH 10), se midió su absorbancia a 280 y 812 nm (Figura 6.13).



**Figura 6.13. Absorbancias de corriente de salida de la columna en la etapa de reequilibrio a 280 y 812 nm.**

Como puede observarse en la Figura 6.13, en la disolución de salida se detecta absorbancia a 280 nm, pero no hay señal a 812 nm, lo que indica la presencia de una especie que absorbe radiación a 280 nm pero no lo hace a 812 nm.

Para determinar si la especie que absorbe radiación a 812 nm es imidazol o biomolécula (BSA en este caso) se realizó un ensayo de Bradford. Se midió la presencia de BSA en cuatro muestras, por triplicado, y se pudo concluir que no hay presencia de BSA en la corriente de salida en la etapa de reequilibrio.

Por tanto, se puede concluir que **no se observan evidencias de la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  en la disolución** de salida en la etapa de reequilibrio, siendo el **imidazol** el único compuesto que sale de la columna en esta etapa.

## **6.3 VALIDACIÓN DEL MONOLITO EN CROMATOGRAFÍA IMAC UTILIZANDO UNA PROTEÍNA TIPO: BSA.**

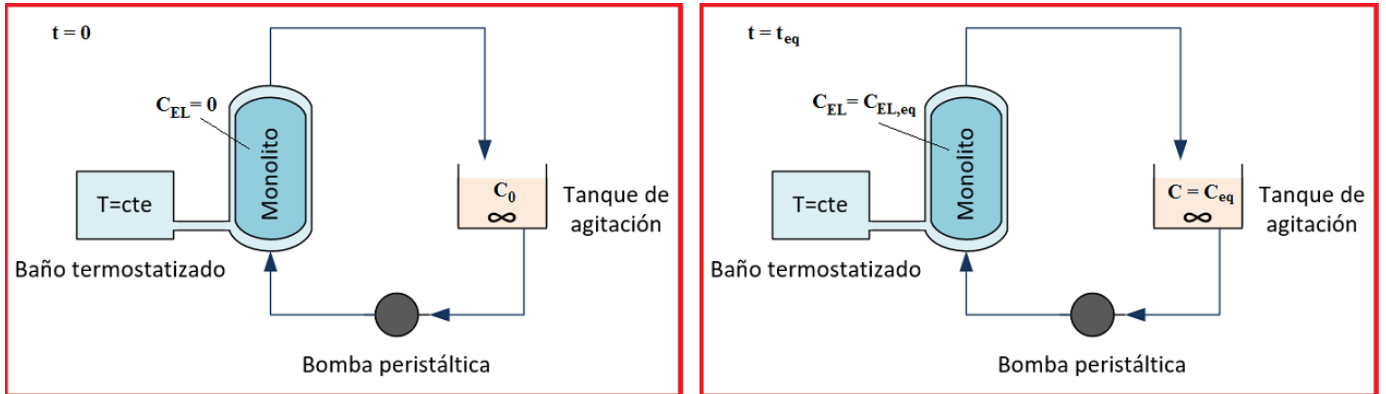
La BSA (*Albúmina de Suero Bovino* o *Bovine Serum Albumin*) se utilizó como proteína tipo para demostrar que este monolito de Agarosa Superporosa puede ser utilizado en cromatografía IMAC de forma ventajosa.

A continuación, se muestran los estudios de adsorción y elución realizados para la validación de este monolito.

### **6.3.1 Estudios de adsorción de la proteína BSA.**

Con el fin de determinar la capacidad de adsorción del monolito, se recirculó una disolución de BSA 0.7 mg/mL en PBS 50 mM pH 7.4 a través de la columna cromatográfica (que contiene el monolito y lo mantiene a temperatura constante) con un caudal de 1.5 mL/min utilizando para ello una bomba peristáltica hasta alcanzar el equilibrio, tal como muestra la Figura 6.14.

Las condiciones del proceso de adsorción se han seleccionado previamente en la sección 6.1, de forma que se puedan comparar posteriormente con otra biomolécula (Catalasa) y con otro adsorbente utilizado previamente.



**Figura 6.14. Instalación para el proceso de adsorción a tiempo inicial y cuando se alcanza el equilibrio, compuesta por la columna cromatográfica monolítica en la que se mantiene la temperatura utilizando un baño termostático, la bomba peristáltica, y un tanque de agitación que se considera de mezcla perfecta.**

Con el fin de conocer la cantidad de BSA adsorbida a lo largo del tiempo, se cuantifica la cantidad de proteína no adsorbida presente en el tanque de agitación, hasta que se alcance el equilibrio de adsorción.

La cantidad total de BSA adsorbida se calcula por diferencia entre la cantidad inicial y final en disolución, midiendo su concentración a 280 nm, y utilizando el método de Bradford (595 nm).

Teniendo en cuenta el equilibrio entre la concentración de proteína libre (P) y la enlazada a la matriz (PL), simplificado (Reacción (6.2)):



Realizando un balance de materia a la proteína (Ecuación (6.3)) :

$$m_P|_0 = m_P|_{eq} + m_{PL}|_{eq} \quad (6.3)$$

De esta forma, es posible determinar la cantidad de proteína enlazada por diferencia entre la cantidad inicial y la cantidad no enlazada cuando el sistema alcanza el equilibrio.

### 6.3.2 Estudios de elución de la proteína BSA.

Una vez la proteína ha sido adsorbida en el soporte monolítico, es necesaria la elución para la recuperación de la misma.

En la elución de la proteína pueden distinguirse diferentes tipos de enlaces o estados de las proteínas, que se distinguen mediante las siguientes etapas:

$$m_{PL} = m_{no\ esp} + m_{esp} + m_{ocl} \quad (6.4)$$

- La **proteína** que se encuentra en el interior del monolito pero que **no está enlazada de forma específica** al  $Cu^{2+}$ ,  $m_{no\ esp}$ , se recupera mediante el lavado con el tampón utilizado en la adsorción (elución no específica). Para recuperar este tipo de proteína se bombea a través del monolito una corriente de disolución de adsorción (PBS 50 mM pH 7.4) con un caudal constante entre 0.5 y 4 mL/min.
- La **proteína** que se encuentra **enlazada de forma específica** al  $Cu^{2+}$  quelado en el monolito,  $m_{esp}$ , se recupera mediante una elución específica, utilizando para ello una disolución con un agente competitivo (Imidazol 0.2M en tampón fosfato 50 mM NaCl 1M pH 8.1) con un caudal constante entre 0.5 y 4 mL/min.
- La **proteína** que está **ocluida** ( $m_{ocl}$ ), es decir, que se encuentra en el interior de la estructura del monolito o forma enlaces no específicos con el monolito y no se puede recuperar debido a problemas difusionales o de formación de canales preferentes. El monolito está formado por canales, en los cuáles se encuentra en  $Cu^{2+}$  fijado. Al recircular la BSA a través de él, gran parte de la proteína se enlaza

al metal. Esto hace que al aumentar la cantidad de proteína retenida, el diámetro del canal pueda verse reducido, lo que podría provocar que la resistencia al flujo aumente y el fluido comience a circular con mayor preferencia por otro canal con menos resistencia. De esta forma, en la etapa de elución, si no hay un buen flujo homogéneo por todos los canales, es posible que parte de la proteína no pueda ser eluida.

La cantidad de proteína recuperada se determinó mediante espectrofotometría (280 nm) y utilizando el método de Bradford (595 nm), utilizando una instalación en discontinuo como la de la (Figura 6.3).

### **6.3.3 Reequilibrio y reutilización de la columna cromatográfica.**

Después de la elución de la proteína, se lava la columna con el fin de retirar el Imidazol que ha quedado en su interior, enlazado al  $\text{Cu}^{2+}$ , y devolverle las condiciones necesarias para una nueva utilización.

La disolución empleada en esta etapa es la misma que la utilizada antes de la primera adsorción, TRIS 50 mM pH 10.

La disolución de TRIS utilizada posee un pH superior al  $\text{pK}_2$  del IDA ( $\text{pK}_1=2,98$ ;  $\text{pK}_2=9,89$ ) con el fin de minimizar la pérdida de metal por desestabilización del agente quelante (como se explicó en el capítulo 3), ya que es la desventaja más importante de la purificación de proteínas mediante cromatografía IMAC.

Esta etapa se realiza bombeando esta disolución en discontinuo (Figura 6.3) con un caudal de 1.5 mL/min durante el tiempo necesario para retirar de la columna el imidazol que se encuentra enlazado al  $\text{Cu}^{2+}$  [38].

Para ello, se sigue la absorbancia a 280 nm hasta que la misma alcanza un valor próximo a cero. En este momento, se considera que ya no hay prácticamente imidazol en el interior de la columna ocupando centros activos.

Una vez ha finalizado el reequilibrio de la columna, el monolito está listo para un nuevo ciclo de adsorción de proteína.

### 6.3.4 Resultados obtenidos con la proteína BSA.

Con el fin de comprobar la eficacia y estabilidad del soporte monolítico se decidió reutilizar dicho soporte durante 20 ciclos.

En este proceso se estudia la influencia del rendimiento de adsorción y elución con el número de reutilización, y la influencia del caudal en la etapa de elución.

Como se ha mencionado previamente, el proceso completo utilizado se resume en la Figura 6.15.

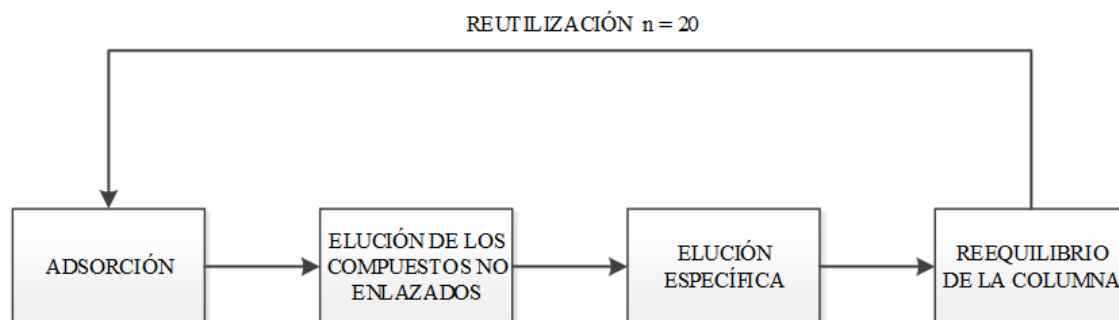


Figura 6.15. Esquema de las etapas en la reutilización del monolito [38].

Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

#### 6.3.4.1 Ciclos de adsorción de BSA.

En la Figura 6.16 se muestran las curvas de equilibrio para algunas adsorciones, siendo n el número de reutilización.



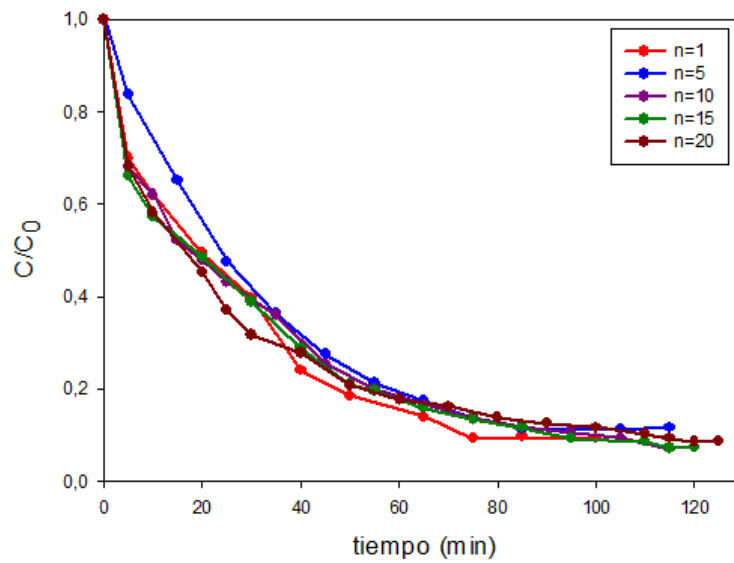


Figura 6.16. Curva de equilibrio de adsorción de la BSA para diferentes reutilizaciones (n).

De la Figura 6.16 se observa que:

- Es posible utilizar el monolito hasta, al menos, **20 ciclos** sin necesidad de regenerar el soporte.
- **El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de adsorción está en torno a 75 min** para un caudal de 1.5 mL/min y se mantiene prácticamente **constante para todos los ciclos**.

A continuación se muestran los resultados obtenidos, que se recogen en las Figura 6.17, Figura 6.18 y Figura 6.19.

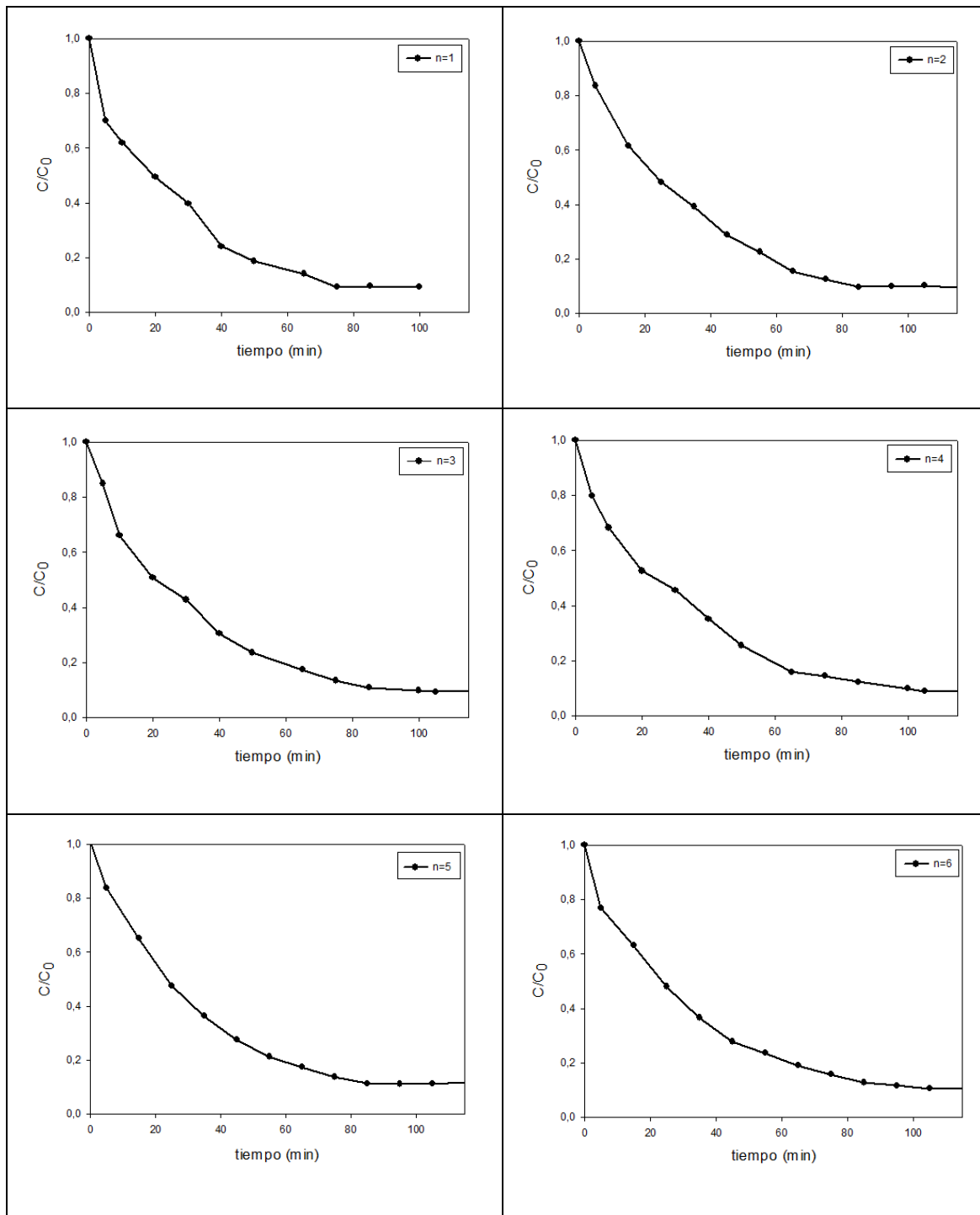


Figura 6.17. Curvas de equilibrio de adsorción de la BSA (ciclos 1-6).

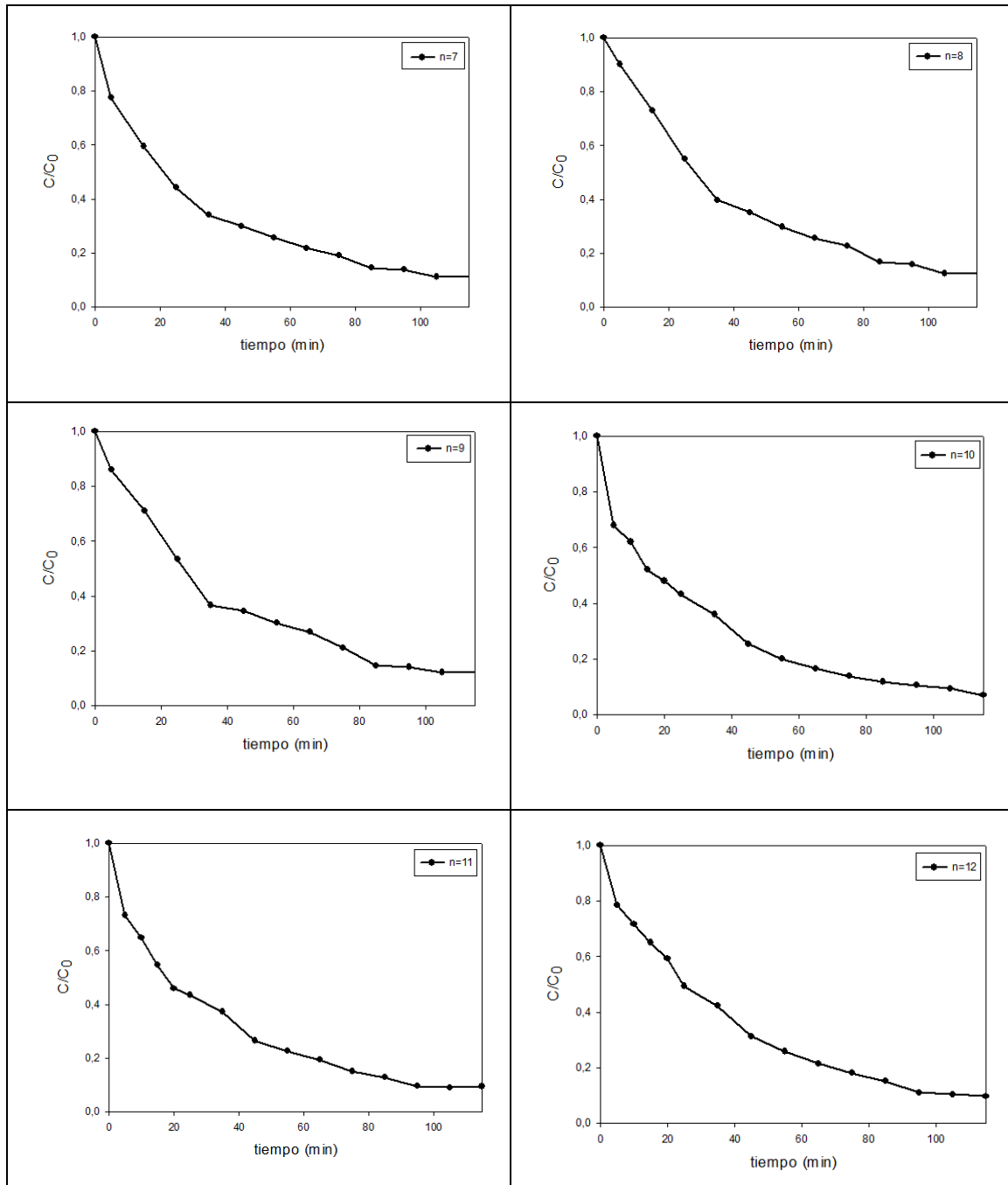


Figura 6.18. Curvas de equilibrio de adsorción de la BSA (ciclos 7-12).

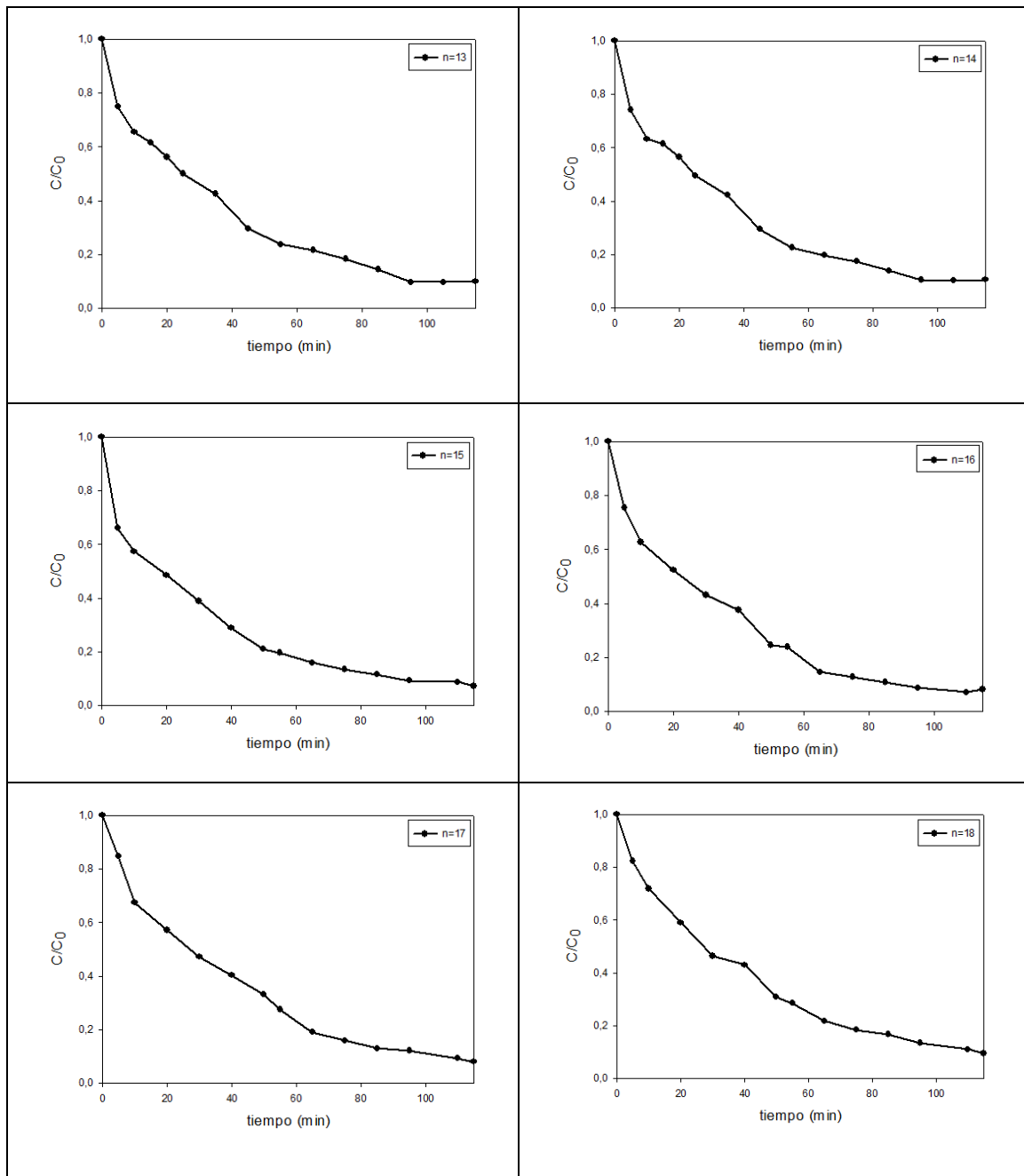
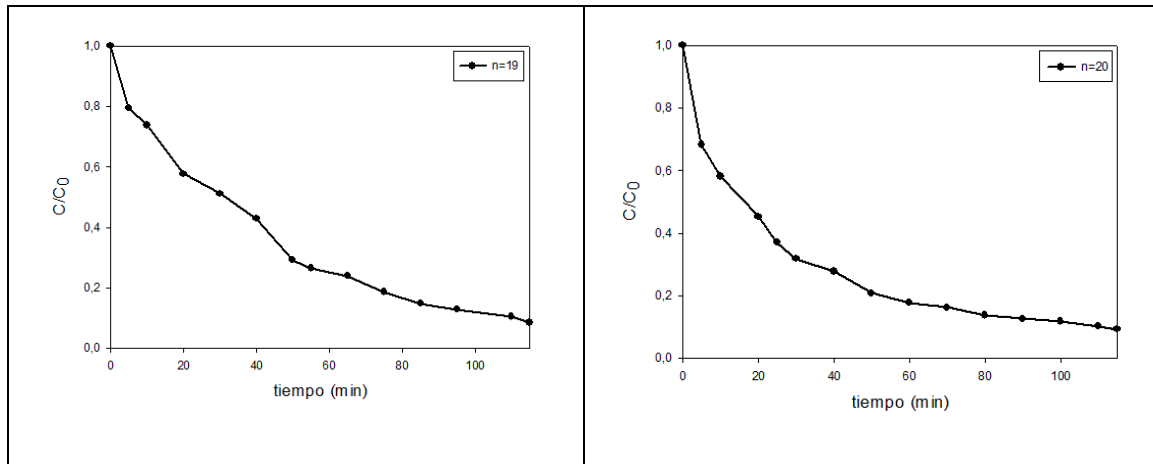


Figura 6.19. Curvas de equilibrio de adsorción de la BSA (ciclos 13-18).



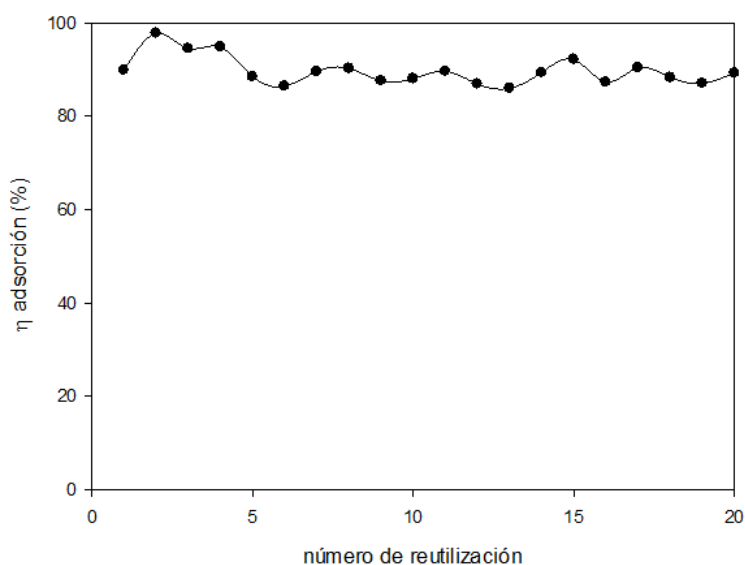
**Figura 6.20. Curvas de equilibrio de adsorción de la BSA (ciclos 19 y 20).**

Los diferentes datos obtenidos en el proceso de adsorción (Figura 6.17, Figura 6.18, Figura 6.19 y Figura 6.20) se recogen en la Tabla 6.6 y Figura 6.21.

Tabla 6.6. Datos de adsorción de la BSA.

Ciclo	Concentración inicial (mg/mL)	Cantidad inicial (mg)	Cantidad adsorbida (mg)	Rendimiento de adsorción (%)
1	0.679	33.95	30.49	89.82
2	0.701	35.05	34.25	97.73
3	0.708	35.40	33.45	94.48
4	0.693	34.65	32.87	94.85
5	0.684	34.20	30.25	88.44
6	0.691	34.55	29.85	86.40
7	0.712	35.60	31.87	89.52
8	0.669	33.45	30.18	90.21
9	0.707	35.35	30.95	87.56
10	0.665	33.25	29.27	88.02
11	0.688	34.40	30.81	89.56
12	0.681	34.05	29.58	86.88
13	0.712	35.60	30.61	85.97
14	0.688	34.40	30.73	89.32
15	0.694	34.70	31.97	92.14
16	0.679	33.95	29.62	87.25
17	0.711	35.55	32.12	90.36
18	0.700	35.00	30.89	88.25
19	0.695	34.75	30.24	87.02
20	0.684	34.20	30.51	89.21
			<b>Media</b>	<b>89.65</b>

Los datos de eficacia de adsorción recogidos en la Tabla 6.6 se representan en la Figura 6.21.



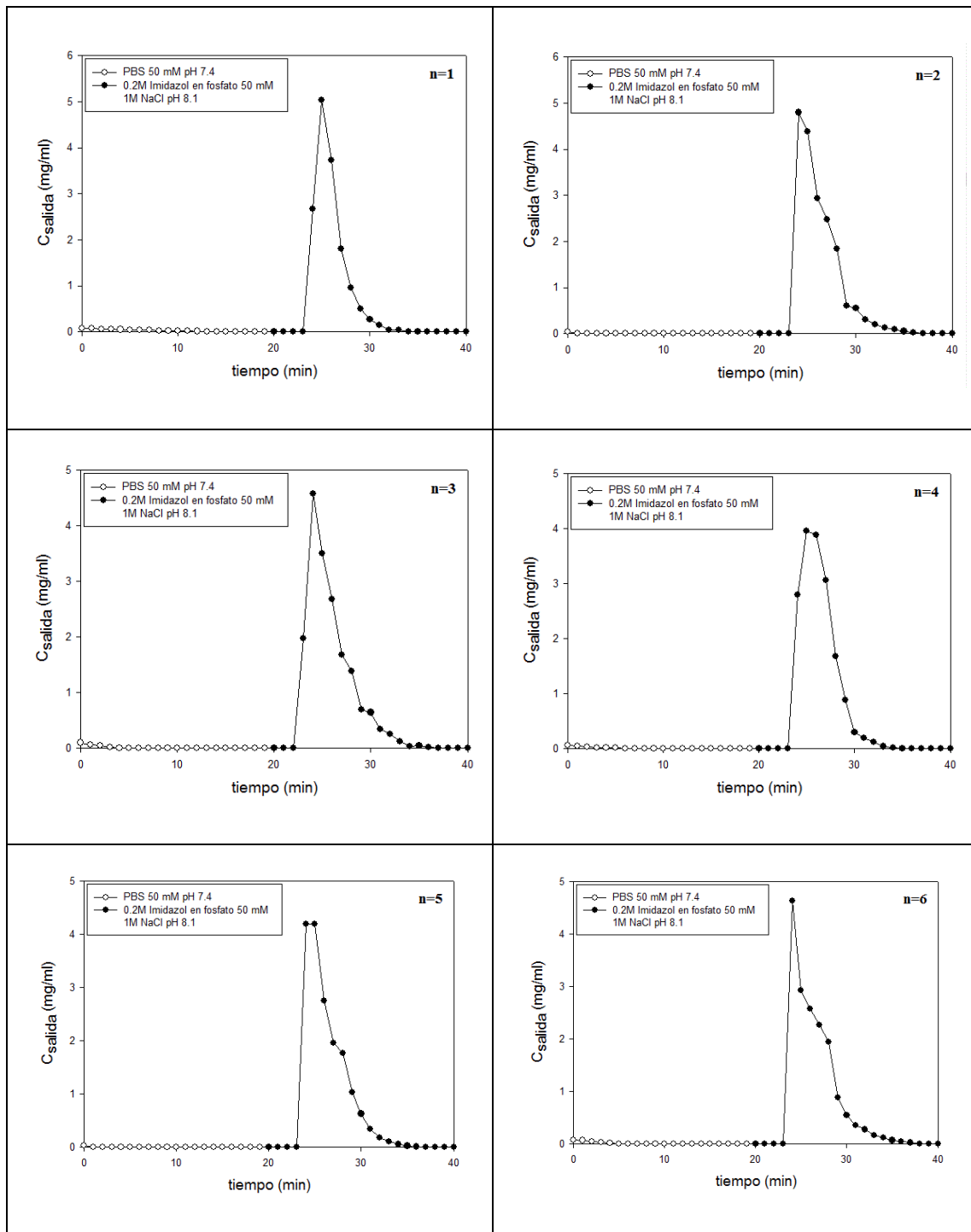
**Figura 6.21. Rendimiento de adsorción de la BSA para cada ciclo de reutilización.**

Teniendo en cuenta la Figura 6.21, el **rendimiento de adsorción** se puede considerar constante para un **caudal de 1.5 mL/min** y con un valor de **89.65%**, donde las diferencias entre los valores pueden atribuirse a errores experimentales menores del 3%.

#### **6.3.4.2 Ciclos de elución de la BSA.**

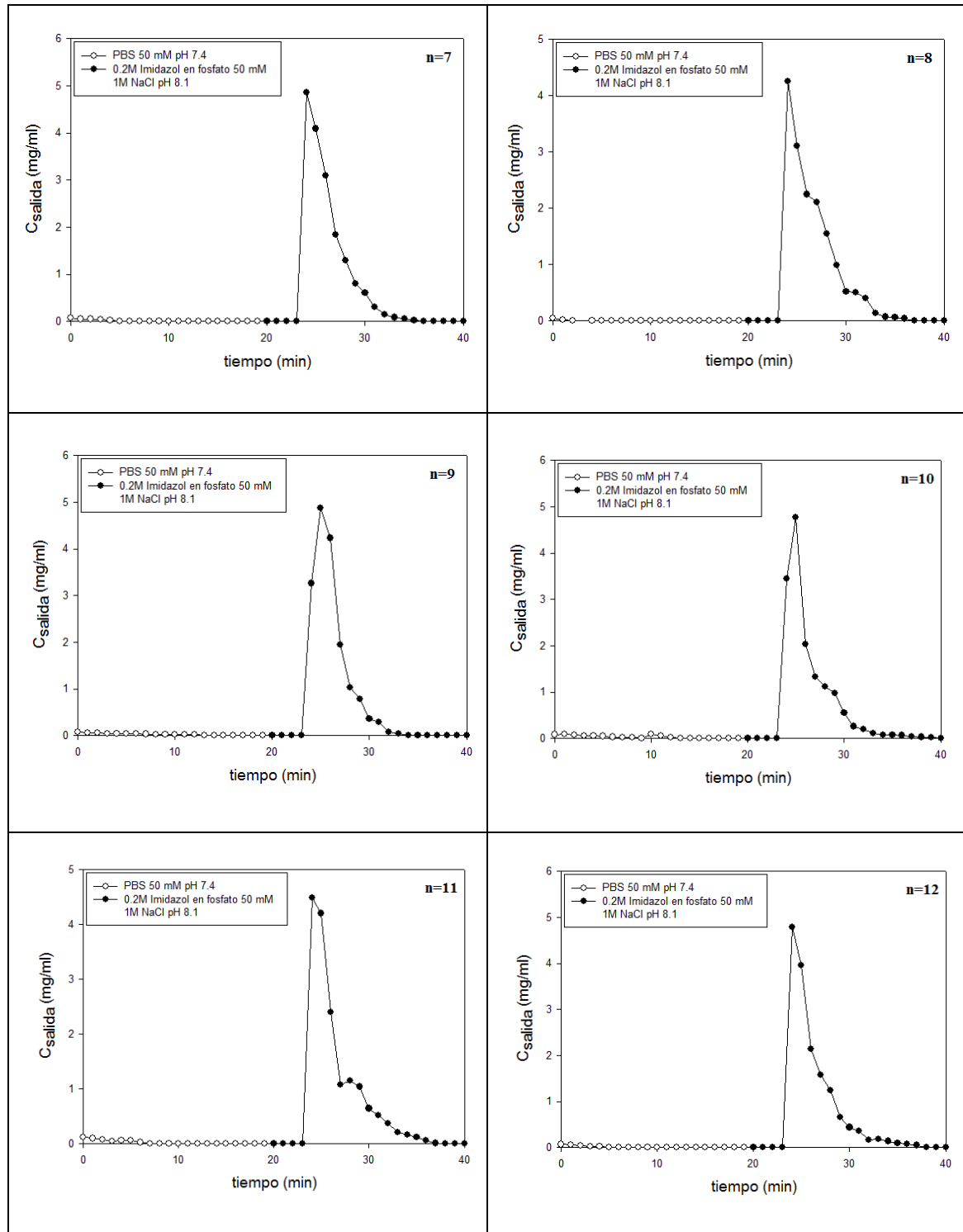
Como se ha descrito previamente, una vez alcanzado el equilibrio de adsorción se realizó el proceso de elución para cada ciclo.

Los resultados obtenidos de este proceso de elución se muestran en las Figura 6.22, Figura 6.23, Figura 6.24 y Figura 6.25.

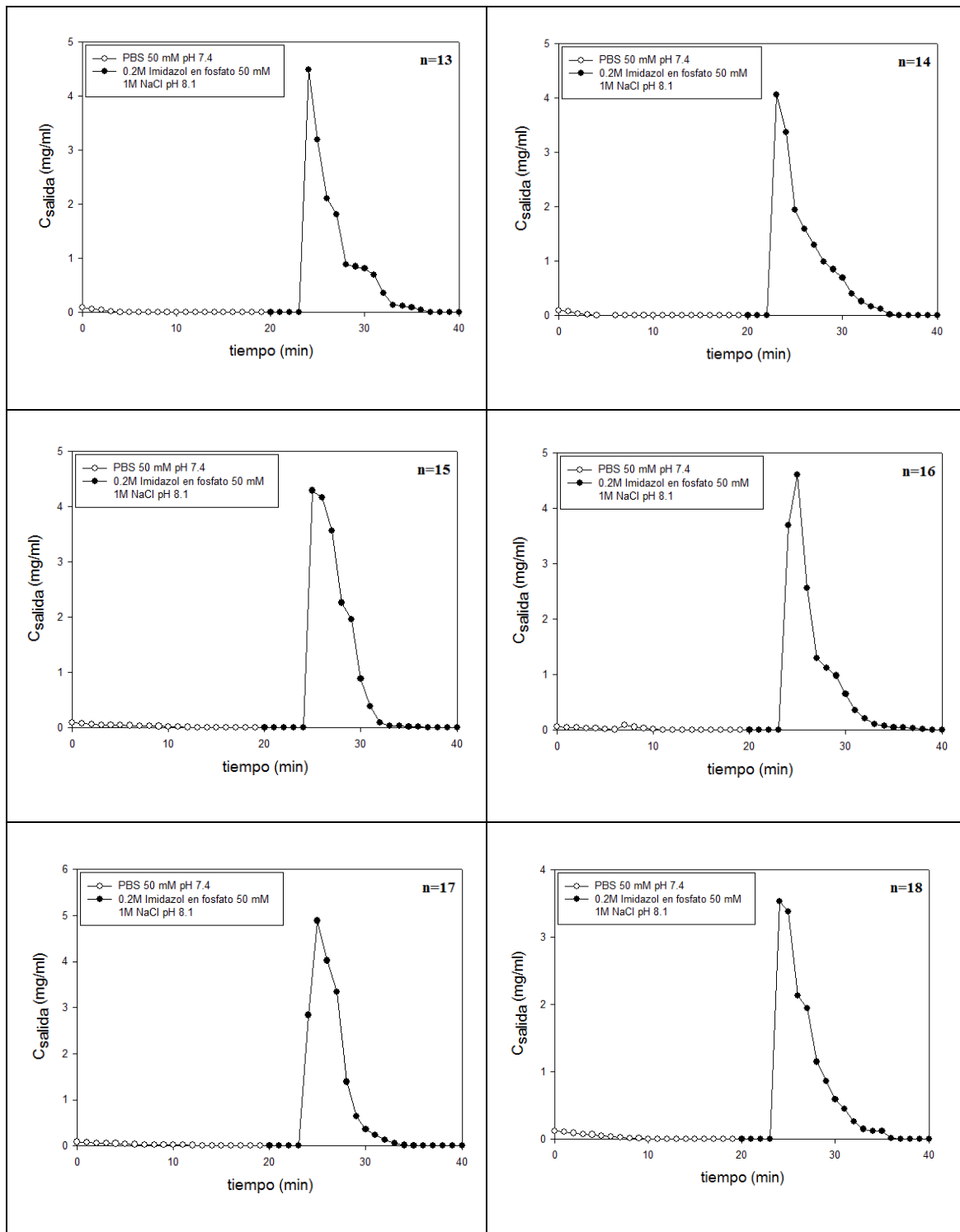


**Figura 6.22. Picos de elución de la BSA (ciclos 1-6). En círculos blancos, elución de la proteína no enlazada de forma específica (PBS 50 mM pH 7.4) y en círculos negros, elución específica (0.2M Imidazol en fosfato 50 mM 1M NaCl pH 8.1).**

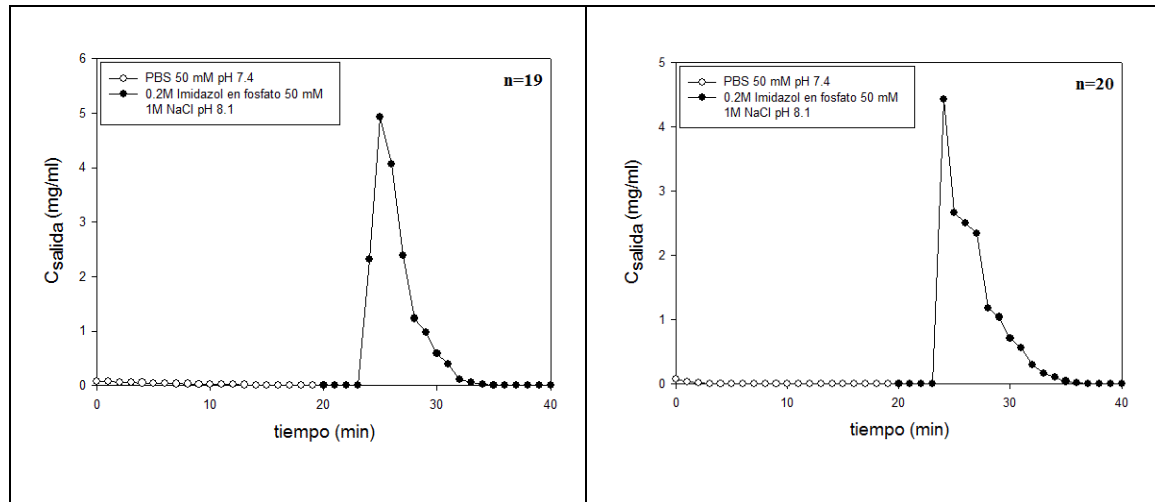




**Figura 6.23. Picos de elución de la BSA (ciclos 7-12). En círculos blancos, elución de la proteína no enlazada de forma específica (PBS 50 mM pH 7.4) y en círculos negros, elución específica (0.2M Imidazol en fosfato 50 mM 1M NaCl pH 8.1).**



**Figura 6.24. Picos de elución de la BSA (ciclos 13-18). En círculos blancos, elución de la proteína no enlazada de forma específica (PBS 50 mM pH 7.4) y en círculos negros, elución específica (0.2M Imidazol en fosfato 50 mM 1M NaCl pH 8.1).**



**Figura 6.25. Picos de elución de la BSA (ciclos 19 y 20). En círculos blancos, elución de la proteína no enlazada de forma específica (PBS 50 mM pH 7.4) y en círculos negros, elución específica (0.2M Imidazol en fosfato 50 mM 1M NaCl pH 8.1).**

En las Figura 6.22, Figura 6.23, Figura 6.24 y Figura 6.25 puede observarse que el primer pico corresponde a la proteína que se encuentra en el interior del monolito pero no está enlazada específicamente al mismo (círculos blancos), mientras que el pico muestra la cantidad de BSA que se eluye mediante la aplicación de un agente competitivo (círculos negros). Por tanto, este pico hace referencia a la cantidad de BSA que se ha adsorbido de forma específica en los centros activos del monolito.

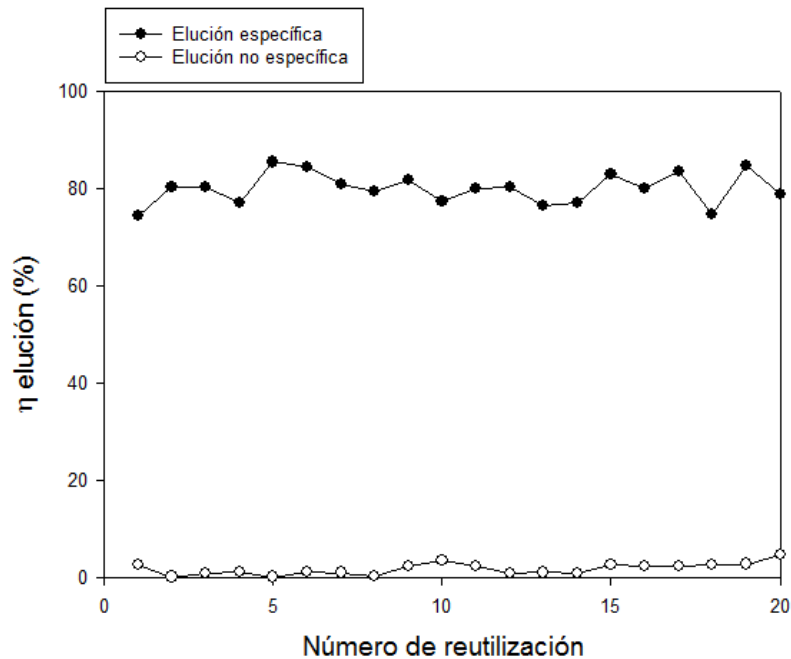
**En todos los ciclos de reutilización los picos de elución tienen la misma forma, y el tiempo necesario para estas etapas es el mismo.**

Los rendimientos de elución se recogen en la Tabla 6.7 y Figura 6.26.

Tabla 6.7. Datos de elución de la BSA.

Ciclo	Cantidad adsorbida (mg)	Cantidad eluida específica (mg)	Cantidad eluida no específica (mg)	Rendimiento de elución total (%)
1	30.49	22.74	0.83	77.29
2	34.25	27.53	0.07	80.57
3	33.45	26.90	0.34	81.44
4	32.87	25.34	0.40	78.32
5	30.25	25.86	0.06	85.70
6	29.85	25.25	0.37	85.83
7	31.87	25.78	0.35	81.99
8	30.18	23.96	0.11	79.77
9	30.95	25.35	0.75	84.32
10	29.27	22.64	1.04	80.91
11	30.81	24.68	0.75	82.54
12	29.58	23.80	0.29	81.43
13	30.61	23.40	0.34	77.57
14	30.73	23.66	0.32	78.04
15	31.97	26.57	0.87	85.82
16	29.62	23,71	0.69	82.37
17	32.12	26.83	0.77	85.92
18	30.89	23.06	0.86	77.44
19	30.24	25.65	0.86	87.67
20	30.51	24,06	1.44	83.58
			<b>Media</b>	<b>81.93</b>

Los datos de eficacia de elución recogidos en la Tabla 6.7 se representan en la Figura 6.26.



**Figura 6.26. Rendimiento de elución de la BSA para cada ciclo de reutilización. En círculos negros se muestra la elución específica y en círculos blancos, elución no específica.**

Los resultados recogidos en la Tabla 6.7 y Figura 6.26 muestran que el **proceso es estable** y que **la adsorción es altamente específica** para todos los ciclos ya que más del **98%** de media de proteína eluida se recupera mediante una elución utilizando un agente competitivo.

Por otra parte, menos del 2 % de media de proteína eluida se encontraba adsorbida de forma no específica, lo que significa que esta proteína se encuentra en el interior del monolito enlazada mediante interacciones no específica. Por tanto, se puede concluir que el monolito presente una interacción altamente específica con la BSA.

Además, se puede concluir que utilizando un **caudal de 1.5 mL/min**, la cantidad de **proteína recuperada** se puede considerar prácticamente **constante en todos los ciclos** y presenta un valor de **81.93%**.

### 6.3.4.3 Influencia del caudal en el rendimiento de elución.

Como se mencionó previamente, con el fin de comparar los resultados obtenidos entre biomoléculas y entre este monolito y el monolito cerámico recubierto con Agarosa D5, el caudal del proceso de adsorción se mantuvo constante con un valor de 1.5 mL/min, ya que para la Catalasa no es adecuado emplear caudales mayores en este proceso [53].

Sin embargo, con el fin de determinar la cantidad máxima de proteína que se puede recuperar, se estudió la influencia del caudal en el proceso de elución, ya que es un factor importante en el rendimiento del proceso e interviene, a su vez, en el tiempo necesario de elución.

Por tanto, se estudió la relación entre el caudal empleado en la elución y la cantidad de proteína recuperada, expresada en rendimiento de elución. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 6.8.

**Tabla 6.8. Datos del rendimiento de elución de la BSA a diferentes caudales.**

<b>Caudal (mL/min)</b>	<b>Rendimiento de elución (%)</b>
0.5	65.23
1.0	76.25
1.5	81.93
2.0	94.12
3.0	99.04
4.0	99.23

Los datos recogidos en la Tabla 6.8 se representan en la Figura 6.27.

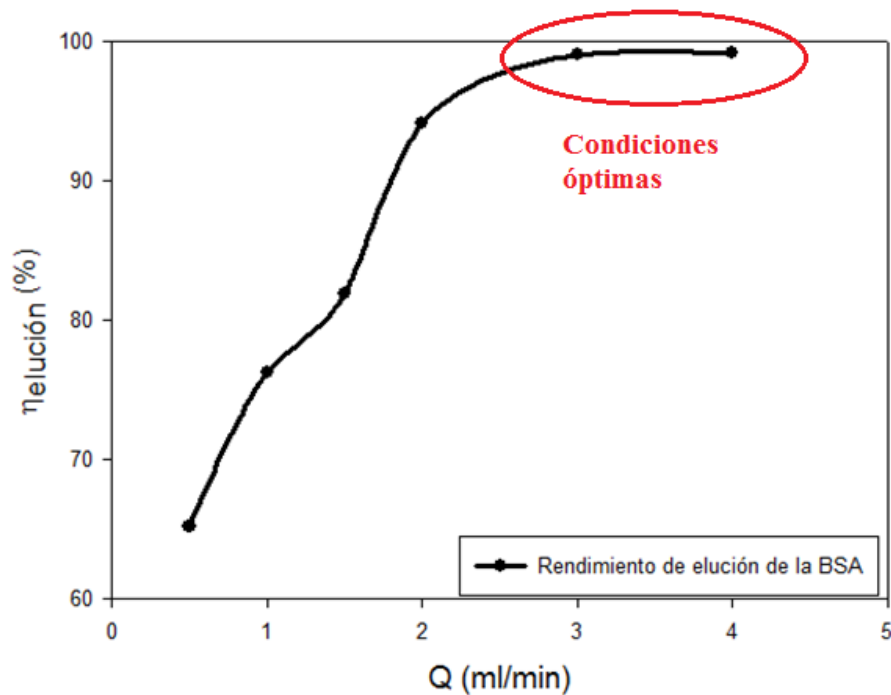
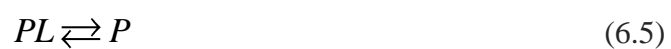


Figura 6.27. Rendimiento de elución de la BSA obtenido para diferentes caudales.

Como se observa en la Figura 6.27, al aumentar el caudal de elución se recupera mayor cantidad de proteína. Esto se podría deber a una sinergia entre dos fenómenos:

En primer lugar, al aumentar el caudal disminuye la resistencia interna, y en segundo lugar, al aumentar el caudal se retira con mayor velocidad la disolución de elución, con lo que la concentración de proteína en disolución disminuye. Esto hace que el equilibrio de elución (Reacción (6.5) se desplace hacia la proteína en disolución.



Además, como es lógico, el tiempo necesario para realizar el proceso de elución es inversamente proporcional al caudal.

Sin embargo, estos resultados contradicen algunos estudios como el de Wang y col. [175] y Vega y col. [38, 53], que sugieren que la utilización de caudales de elución elevados provocan que la cantidad de proteína eluida sea menor debido a que disminuye el tiempo de contacto. Esta diferencia puede deberse, en primer lugar, a la diferencia morfológica entre los soportes empleados, ya que el monolito de Agarosa Superporosa puede considerarse un lecho percolado, donde hay un gran contacto entre fases, lo que mejora la transferencia de materia.

En estos experimentos, este rendimiento de elución permaneció prácticamente constante durante todas las reutilizaciones para un mismo caudal de elución empleado.

### 6.3.5 Conclusiones de los ciclos de adsorción-elución de la BSA.

- Se ha **validado** este monolito de Agarosa Superporosa para su utilización en la separación de proteínas mediante cromatografía IMAC, utilizando **BSA** como proteína tipo.
- Se ha demostrado que el **ligando** es **estable** a lo largo de todo el proceso, al menos durante 20 ciclos, y **no hay pérdida** cuantificable del mismo.
- Una de las mayores ventajas con este soporte es que **es posible su utilización hasta**, al menos, **20 ciclos sin la etapa de regeneración**. En este tipo de cromatografía, es habitual que la columna tenga que ser **regenerada** después de su utilización, es decir, **que el ion metálico deba ser reemplazado**, o que la columna cromatográfica deba ser tratada (regenerada o recargada) con el fin de poder ser utilizada de nuevo. En lugar de regenerar la columna, en este caso es suficiente con **reequilibrarla**, es decir, lavarla con una disolución para que recupere las condiciones de pH óptimas para una nueva utilización.



- El **rendimiento de adsorción** permanece prácticamente constante al aumentar el número de reutilización con un valor del **89.65%**.
- El **tiempo** necesario para realizar el proceso de **adsorción** es prácticamente constante y presenta un valor de unos **75 min**.
- En todos los ciclos de reutilización los **picos de elución** tienen la **misma forma**, y el **tiempo** necesario para esta etapa es el mismo (unos 40 min, de los que 20 min corresponden a la elución específica), considerándose un tiempo efectivo de **30 min**.
- Utilizando un **caudal** de **1.5 mL/min**, la cantidad de proteína recuperada se puede considerar prácticamente constante en todos los ciclos y presenta un valor de **81.93%**.
- **Al aumentar el caudal de elución se recupera mayor cantidad de proteína** ya que se mejora la transferencia de materia, y el equilibrio de elución se desplaza hacia la proteína libre.

## **6.4 ESTUDIO DE LA UTILIZACIÓN DEL MONOLITO EN CROMATOGRAFÍA IMAC CON ENZIMA TIPO: CATALASA.**

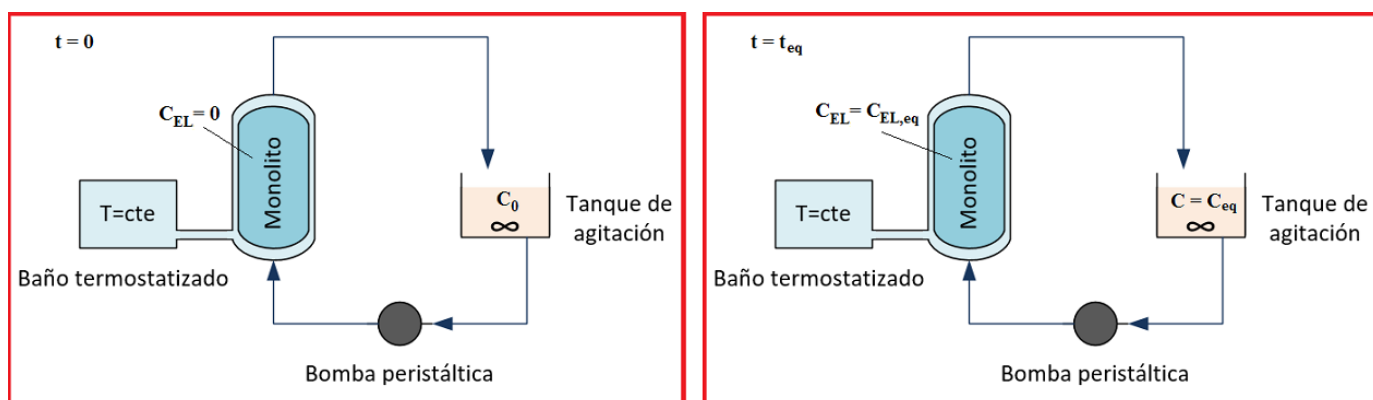
Una vez se ha validado la utilización del monolito para su utilización en purificación de proteínas mediante cromatografía IMAC utilizando BSA, se estudió el comportamiento una proteína tipo más compleja para verificar su validez: la enzima Catalasa (EC 1.11.1.6, *Catalase Bovine Liver*).

A continuación, se muestran los estudios de adsorción y elución realizados con esta enzima.

### 6.4.1 Estudios de adsorción de la enzima Catalasa.

Con el fin de determinar la capacidad de adsorción del monolito, se recirculó una disolución de Catalasa 0.7 mg/mL en PBS 50 mM pH 7.4 a través de la columna cromatográfica (que contiene el monolito y lo mantiene a temperatura constante) con un caudal de 1.5 mL/min utilizando para ello una bomba peristáltica hasta alcanzar el equilibrio, tal como muestra la Figura 6.28.

Las condiciones del proceso de adsorción se han seleccionado previamente en la sección 6.1, de forma que se puedan comparar posteriormente con otra biomolécula (Catalasa) y con otro adsorbente utilizado previamente.



**Figura 6.28. Instalación para el proceso de adsorción a tiempo inicial y cuando se alcanza el equilibrio, compuesta por la columna cromatográfica monolítica en la que se mantiene la temperatura utilizando un baño termostatzado, la bomba peristáltica, y un tanque de agitación que se considera de mezcla perfecta.**

Con el fin de conocer la cantidad de Catalasa adsorbida a lo largo del tiempo, se cuantifica la cantidad de enzima no adsorbida presente en el tanque de agitación, hasta que se alcance el equilibrio de adsorción.

La cantidad total de Catalasa adsorbida se calcula por diferencia entre la cantidad inicial y final en disolución, midiendo su concentración a 280 nm, y utilizando el método de Bradford (595 nm).

Teniendo en cuenta el equilibrio entre la concentración de enzima libre (E) y la enlazada a la matriz (EL), simplificado (Reacción 6.7):



Realizando un balance de materia a la encima:

$$m_E|_0 = m_E|_{eq} + m_{EL}|_{eq} \quad (6.7)$$

De esta forma, es posible determinar la cantidad de encima enlazada por diferencia entre la cantidad inicial y la cantidad no enlazada cuando el sistema alcanza el equilibrio.

#### 6.4.1.1 Estudios de elución de la enzima Catalasa.

Una vez la enzima ha sido adsorbida en el soporte monolítico, es necesaria la elución para la recuperación de la misma.

Como se vio en el Capítulo 5, el mecanismo de adsorción de la BSA y de la Catalasa es el mismo ya que el enlace se forma entre los aminoácidos situados en la superficie (Histidina o Triptófano) y el  $\text{Cu}^{2+}$  quelado en la matriz cromatográfico.

Por tanto, cabe esperar que sea razonable utilizar la misma estrategia de elución.

Además, en este tipo de cromatografía de afinidad, los agentes competitivos más utilizados en la elución son el imidazol y el tiocianato de sodio [65, 187-189]. Sin embargo este último provoca el envenenamiento de la Catalasa [177-179], por lo que no es conveniente su utilización cuando se recupera con el fin de utilizarla posteriormente.

En la elución de la enzima, al igual que en el caso de la BSA, pueden distinguirse diferentes tipos de enlaces o estados de las moléculas de enzima, que se distinguen mediante las siguientes etapas:

$$m_{EL} = m_{no\ esp} + m_{esp} + m_{ocl} \quad (6.8)$$

- La **enzima** que se encuentra en el interior del monolito pero que **no** está **enlazada de forma específica** al  $Cu^{2+}$ ,  $m_{no\ esp}$ , se recupera mediante el lavado con el tampón utilizado en la adsorción (elución no específica). Para recuperar este tipo de enzima se bombea a través del monolito una corriente de disolución de adsorción (PBS 50 mM pH 7.4) con un caudal constante entre 0.5 y 4 mL/min.
- La **enzima** que se encuentra **enlazada de forma específica** al  $Cu^{2+}$  quelado en el monolito,  $m_{esp}$ , se recupera mediante una elución específica, utilizando para ello una disolución con un agente competitivo (Imidazol 0.2M en tampón fosfato 50 mM NaCl 1M pH 8.1) con un caudal constante entre 0.5 y 4 mL/min.
- La **enzima** que está **ocluida** ( $m_{ocl}$ ), es decir, que se encuentra en el interior de la estructura del monolito o forma enlaces no específicos con el monolito y no se puede recuperar debido a problemas difusionales o de formación de canales preferentes. El monolito está formado por canales, en los cuáles se encuentra en  $Cu^{2+}$  fijado. Al recircular la Catalasa a través de él, gran parte de la encima se enlaza al metal. Esto hace que al aumentar la cantidad de biocompuesto retenido, el diámetro del canal pueda verse reducido, lo que podría provocar que la resistencia al flujo aumente y el fluido comience a circular con mayor preferencia por otro canal con menos resistencia. De esta forma, en la etapa de elución, si no hay un buen flujo homogéneo por todos los canales, es posible que parte de la encima no pueda ser eluida.

La cantidad de enzima recuperada se determinó mediante espectrofotometría (280 nm) y utilizando el método de Bradford (595 nm), utilizando una instalación en discontinuo como la de la (Figura 6.3).

#### **6.4.1.2 Reequilibrio y reutilización de la columna cromatográfica.**

Después de la elución de la proteína, se lava la columna con el fin de retirar el Imidazol que ha quedado en su interior, enlazado al  $\text{Cu}^{2+}$ , y devolverle las condiciones necesarias para una nueva utilización.

La disolución empleada en esta etapa es la misma que la utilizada antes de la primera adsorción, TRIS 50 mM pH 10.

La disolución de TRIS utilizada posee un pH superior al  $\text{pK}_2$  del IDA ( $\text{pK}_1=2,98$ ;  $\text{pK}_2=9,89$ ) con el fin de minimizar la pérdida de metal por desestabilización del agente quelante (como se explicó en el Capítulo 3), ya que es la desventaja más importante de la purificación de proteínas mediante cromatografía IMAC.

Esta etapa se realiza bombeando esta disolución en discontinuo (Figura 6.3) con un caudal de 1.5 mL/min durante el tiempo necesario para retirar de la columna el imidazol que se encuentra enlazado al  $\text{Cu}^{2+}$  [38].

Para ello, se sigue la absorbancia a 280 nm hasta que la misma alcanza un valor próximo a cero. En este momento, se considera que ya no hay prácticamente imidazol en el interior de la columna ocupando centros activos.

Una vez ha finalizado el reequilibrio de la columna, el monolito está listo para un nuevo ciclo de adsorción de encima.

#### **6.4.1.3 Resultados obtenidos con la enzima Catalasa.**

Con el fin de comprobar la eficacia y estabilidad del soporte monolítico se decidió reutilizar dicho soporte durante 14 ciclos. Esto se debe a que, teniendo en cuenta el

tiempo de proceso necesario, para un número mayor de reuso, es más rentable regenerar la columna (retirar el  $\text{Cu}^{2+}$  de la columna) y comenzar la carga del ion metálico en soporte, desde el principio.

En este proceso se estudia la influencia del rendimiento de adsorción y elución con el número de reutilización y la influencia del caudal en la etapa de elución.

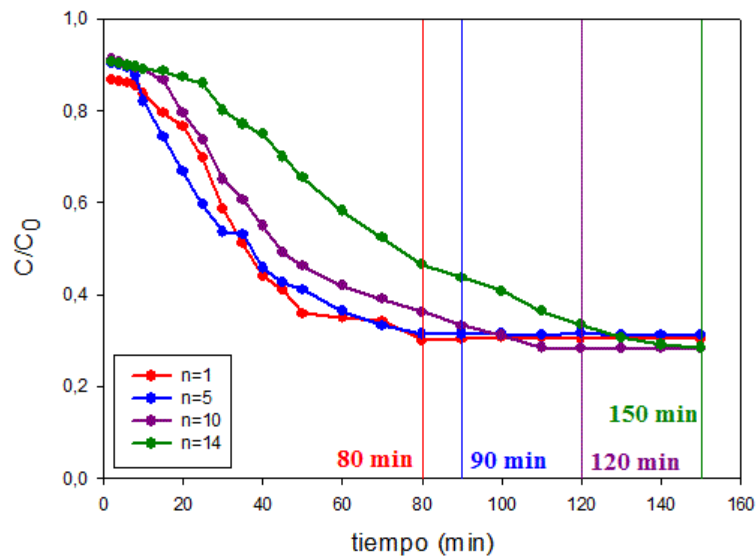
Como se ha mencionado previamente, el proceso completo utilizado se resume en la Figura 6.29.



**Figura 6.29.** Esquema de las etapas en la reutilización del monolito [38].

Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

En la Figura 6.30 se muestran las curvas de equilibrio para algunos ciclos de adsorción, siendo  $n$  el número de reutilización.



**Figura 6.30. Curvas de equilibrio de adsorción de la Catalasa para diferentes reutilizaciones (n).**

Por tanto, de la Figura 6.30 se observa que:

- Es posible utilizar el monolito hasta, **14 ciclos** sin necesidad de regenerar el soporte.
- Sin embargo, teniendo en cuenta factores económicos, a partir del ciclo 14 es más rentable regenerar la columna y comenzar el proceso desde el principio.
- **El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de adsorción varía con el número de reutilización, desde 80 min (n=1) hasta 150 min (n=14) para un caudal de 1.5 mL/min.**

A continuación se muestran los resultados obtenidos, que se recogen en las Figura 6.31, Figura 6.32 y Figura 6.33.

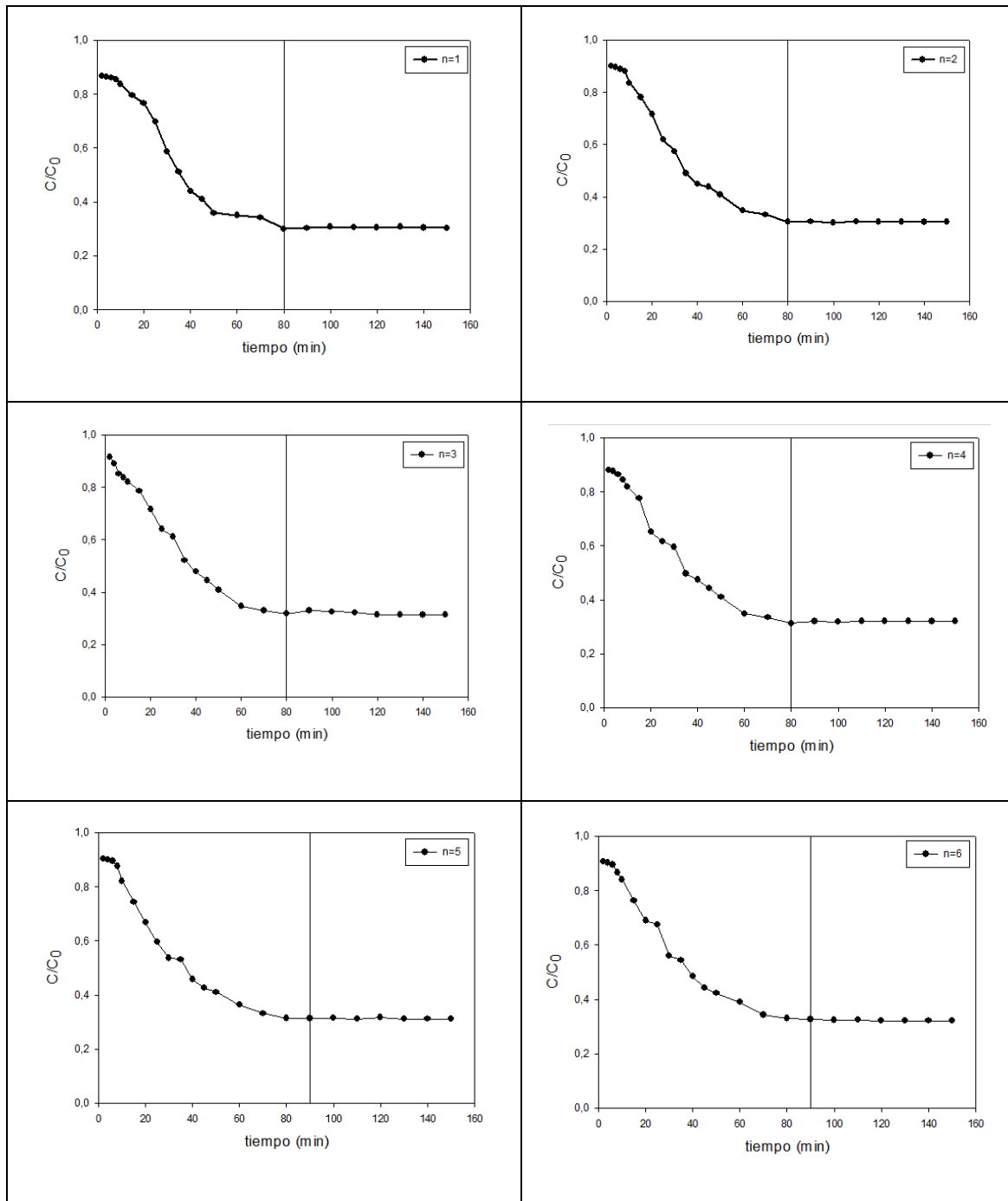


Figura 6.31. Curvas de equilibrio de adsorción de la Catalasa (ciclos 1-6).



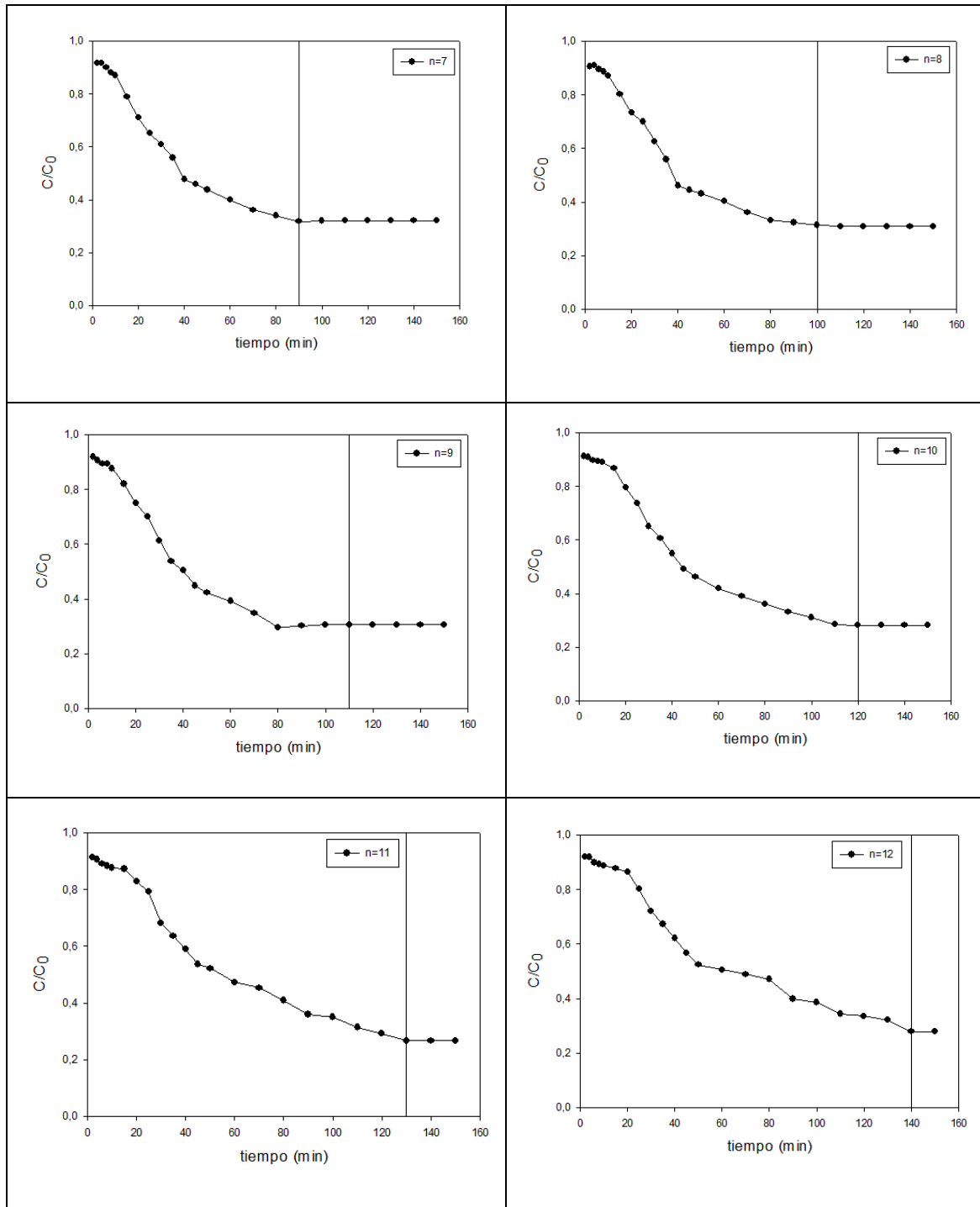
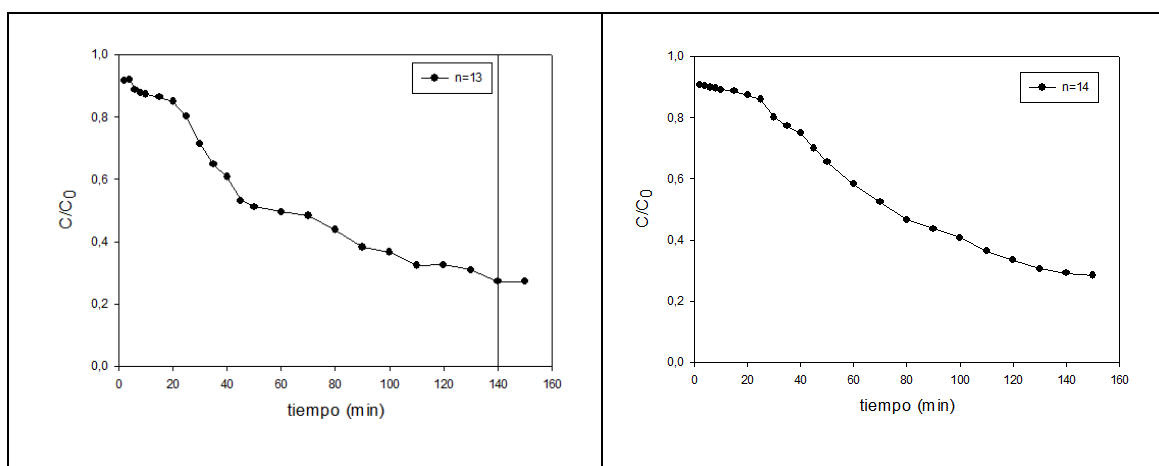


Figura 6.32. Curvas de equilibrio de adsorción de la Catalasa (ciclos 7-12).



**Figura 6.33. Curvas de equilibrio de adsorción de la Catalasa (ciclos 13 y 14).**

Las curvas de equilibrio de adsorción y el rendimiento de adsorción con el número de reusos (Figura 6.34) muestran que **la capacidad de adsorción permanece constante, pero que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio aumenta con el número sucesivo de reusos.**

Esto se podría deber a que **algunos centros activos pueden no estar disponibles por la presencia de moléculas de enzima que no se han eluido de forma exitosa o a la presencia de imidazol que no ha sido retirado de forma efectiva.**

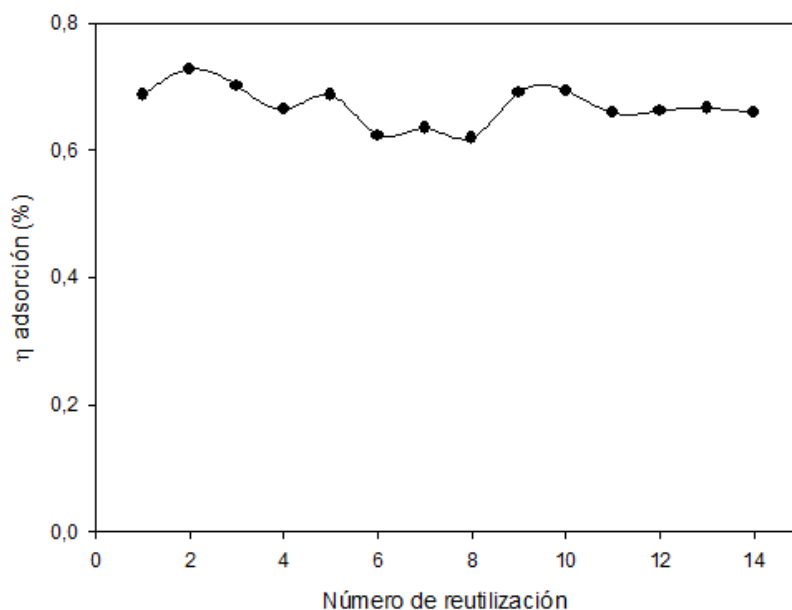
Por ello, **al aumentar el número de reutilización, la enzima necesita más tiempo para encontrar un centro activo disponible.**

Los diferentes datos obtenidos en proceso de adsorción (Figura 6.31, Figura 6.32 y Figura 6.33) se recogen en la Tabla 6.9 y Figura 6.34.

**Tabla 6.9. Datos de adsorción de la Catalasa.**

<b>Ciclo</b>	<b>Concentración inicial (mg/ml)</b>	<b>Cantidad inicial (mg)</b>	<b>Cantidad adsorbida (mg)</b>	<b>Rendimiento de adsorción (%)</b>
1	0.667	33.35	22.916	68.71
2	0.726	36.31	26.43	72.79
3	0.679	33.95	23.835	70.21
4	0.678	33.93	22.538	66.42
5	0.690	34.50	23.727	68.77
6	0.714	35.70	22.268	62.38
7	0.669	33.45	21.24	63.50
8	0.679	33.95	21.05	62.00
9	0.689	34.45	23.84	69.20
10	0.674	33.70	23.40	69.44
11	0.675	33.75	22.27	65.99
12	0.713	35.655	23.62	66.24
13	0.680	34.00	22.659	66.64
14	0.690	34.50	22.769	66.00
			<b>Media</b>	<b>67.02</b>

Los datos de eficacia de adsorción recogidos en la Tabla 6.9 se representan en la Figura 6.34.



**Figura 6.34. Rendimiento de adsorción de la Catalasa para cada ciclo de reutilización.**

En la Figura 6.34 el **rendimiento de adsorción** se puede considerar constante para un **caudal de 1.5 mL/min** y con un valor de **67.02%**, donde las diferencias entre los valores pueden atribuirse a errores experimentales (desviación estándar del 3%).

El número de iones de  $\text{Cu}^{2+}$  o centros activos disponibles es, al menos, tres órdenes de magnitud superior a la cantidad de Catalasa (42,36 mg  $\text{CuCl}_2$  de media, que equivalen a  $3.1 \cdot 10^{-4}$  moles de  $\text{Cu}^{2+}$ , frente a los  $5.30 \cdot 10^{-7}$  moles de BSA y  $1.40 \cdot 10^{-7}$  moles de Catalasa presentes en disolución), por lo que se puede asegurar que **hay centros activos disponibles suficientes para la adsorción**, por lo que el factor limitante de esta etapa será algún tipo de ensuciamiento de la matriz cromatográfica [38].

Con el fin de determinar si este posible ensuciamiento de la matriz es producido por enzima que no haya sido eluida de forma efectiva, se estudia a continuación la elución de la Catalasa.

#### 6.4.1.4 Ciclos de elución de la Catalasa.

Como se ha descrito previamente, una vez alcanzado el equilibrio de adsorción se realiza el proceso de elución para cada ciclo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.35, Figura 6.36 y Figura 6.37.

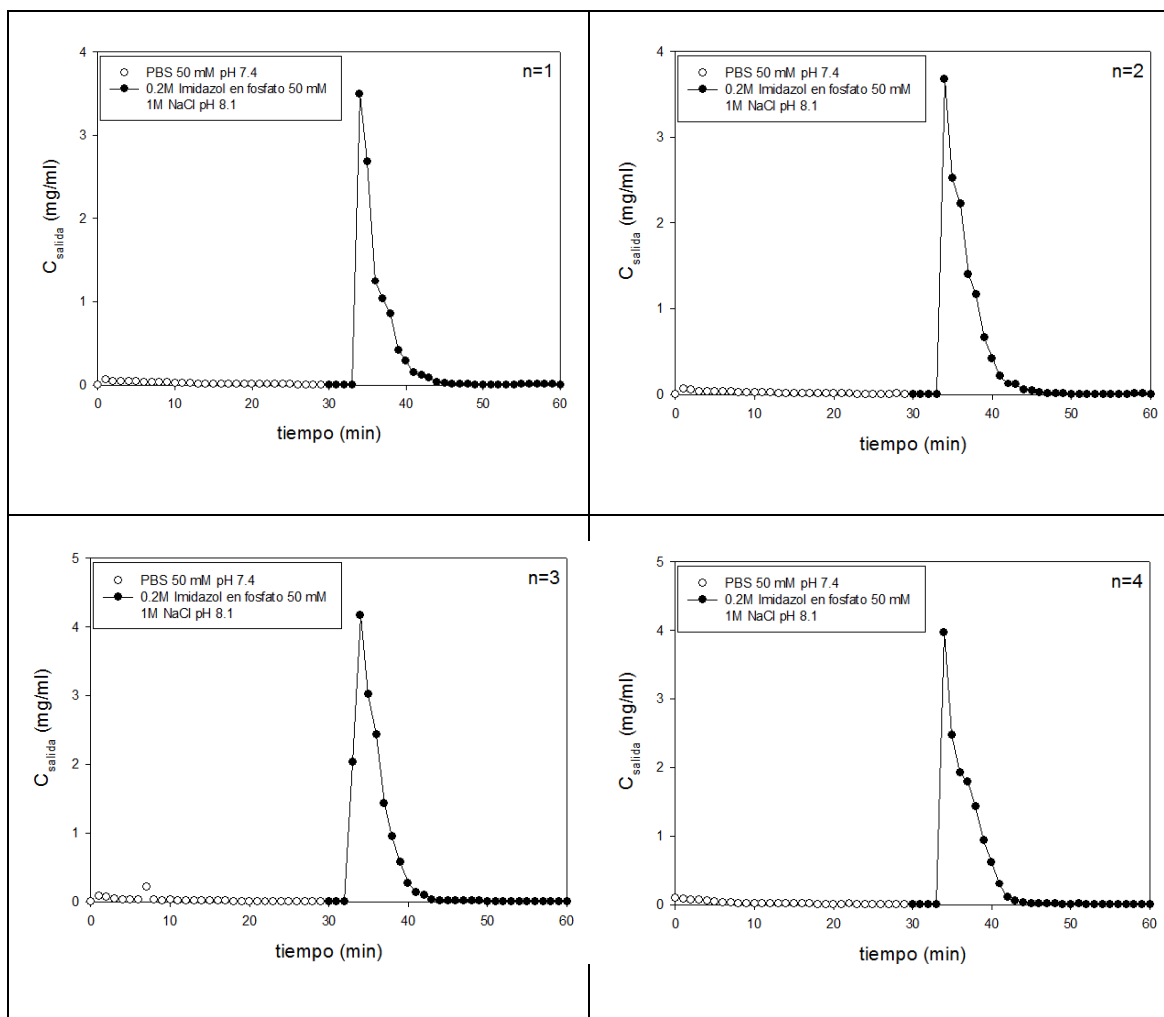
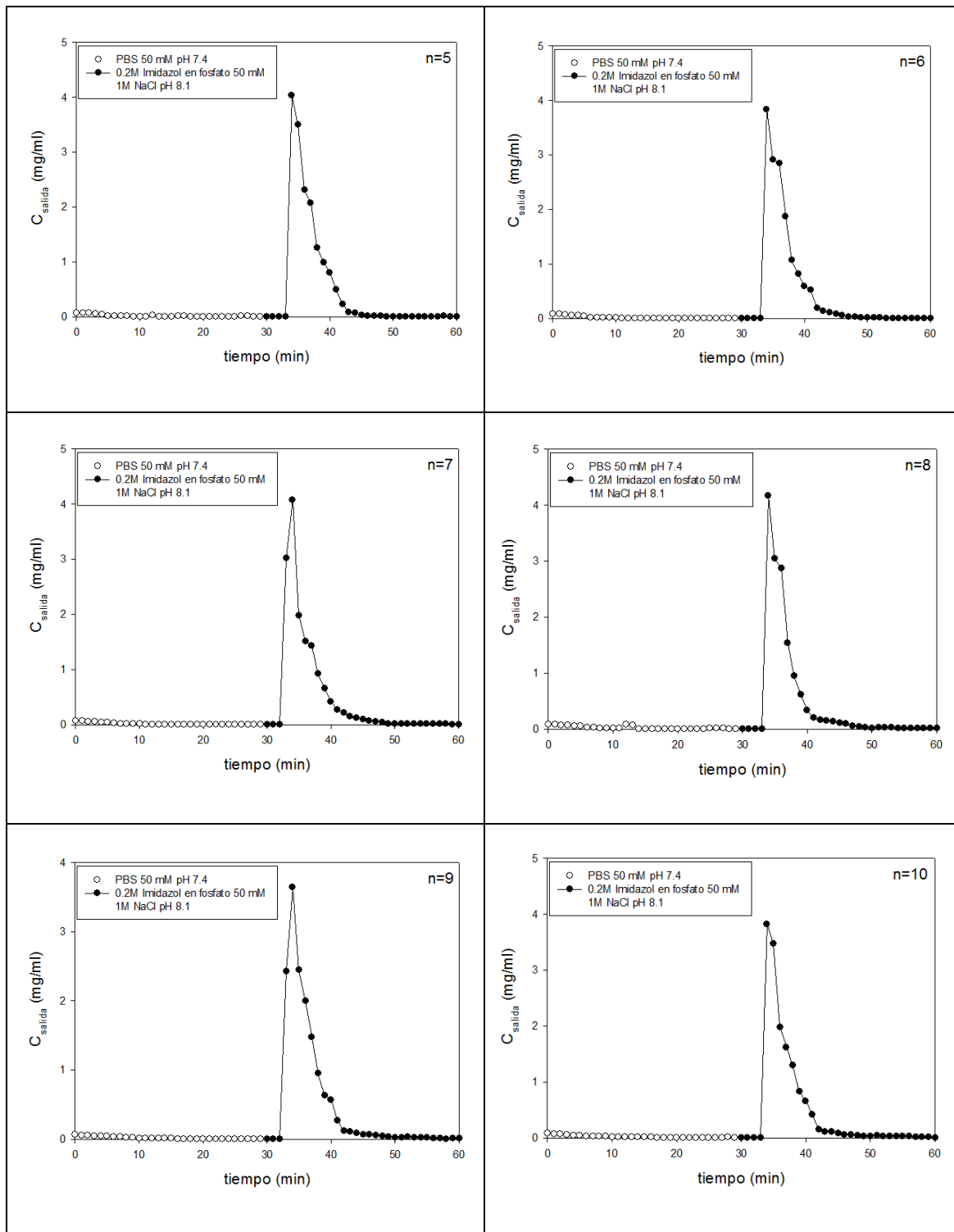
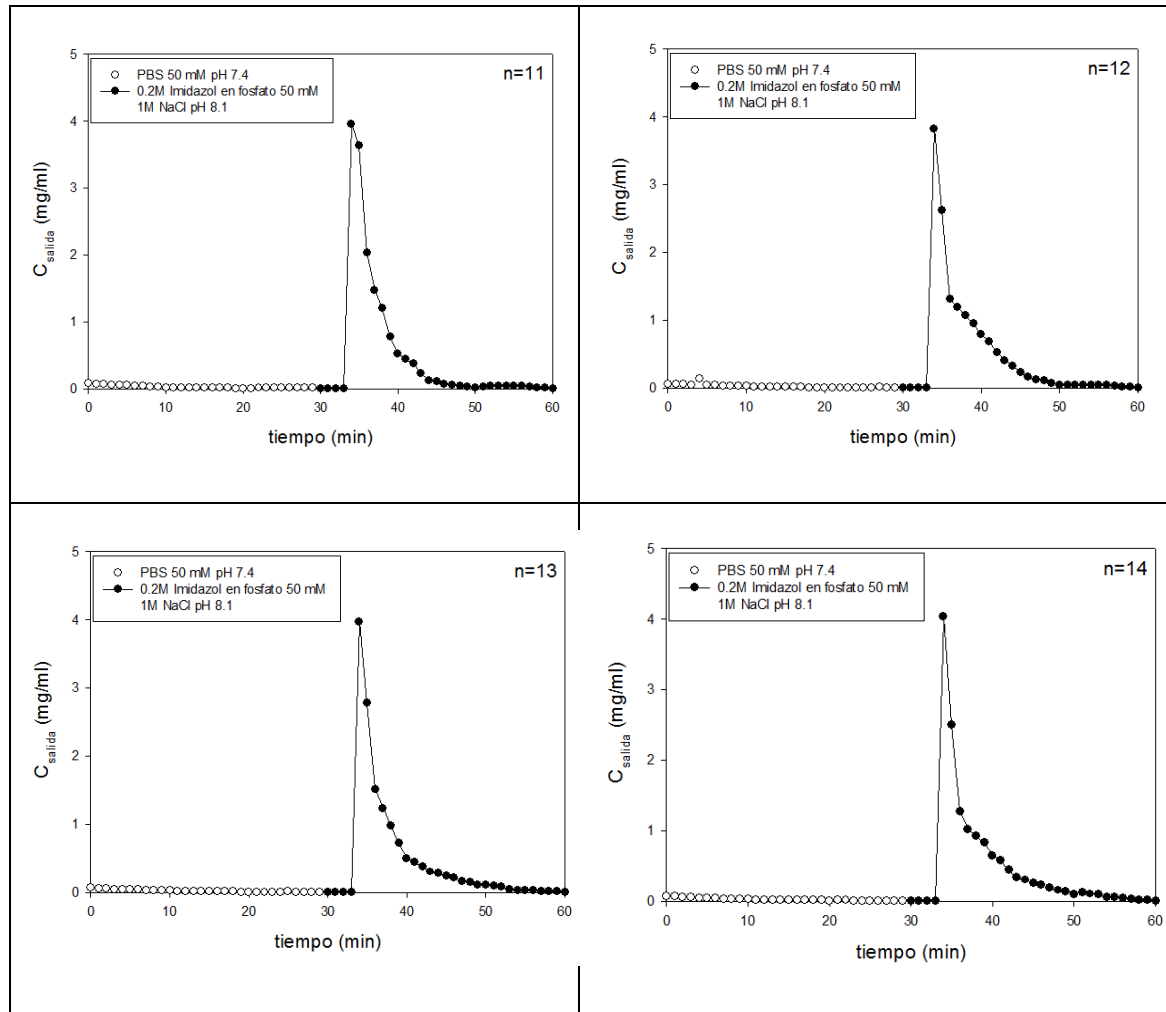


Figura 6.35. Picos de elución de la Catalasa (ciclos 1-4). En círculos blancos, elución de la proteína no enlazada de forma específica (PBS 50 mM pH 7.4) y en círculos negros, elución específica (0.2M Imidazol en fosfato 50 mM 1M NaCl pH 8.1).



**Figura 6.36. Picos de elución de la Catalasa (ciclos 5-10). En círculos blancos, elución de la proteína no enlazada de forma específica (PBS 50 mM pH 7.4) y en círculos negros, elución específica (0.2M Imidazol en fosfato 50 mM 1M NaCl pH 8.1).**



**Figura 6.37. Picos de elución de la Catalasa (ciclos 11-14). En círculos blancos, elución de la proteína no enlazada de forma específica (PBS 50 mM pH 7.4) y en círculos negros, elución específica (0.2M Imidazol en fosfato 50 mM 1M NaCl pH 8.1).**

En estas Figuras (Figura 6.35, Figura 6.36 y Figura 6.37), el primer pico corresponde a la enzima que se encuentra en el interior del monolito pero no está enlazada específicamente al mismo (círculos blancos), mientras que el pico muestra la cantidad de Catalasa que se eluye mediante la aplicación de un agente competitivo (círculos negros). Por tanto, este pico hace referencia a la cantidad de Catalasa que se ha adsorbido de forma específica en los centros activos del monolito.

Además, se puede comprobar que, al igual que en el caso de la BSA, **en todos los ciclos de reutilización los picos de elución tienen la misma forma, y el tiempo necesario para estas etapas es el mismo (40 min reales, de los cuales 20 min son de la elución no específica).**

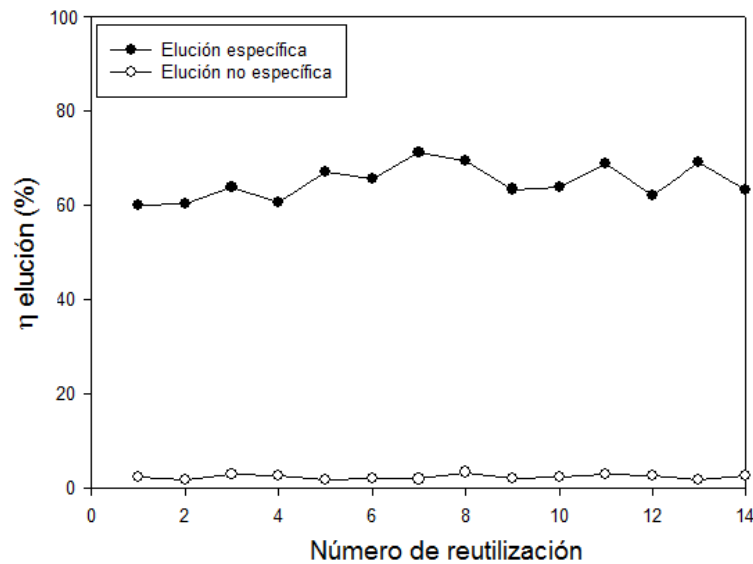
Los rendimientos de elución se recogen en la Tabla 6.10 y la Figura 6.38.

**Tabla 6.10. Datos de elución de la Catalasa.**

<b>Ciclo</b>	<b>Cantidad adsorbida (mg)</b>	<b>Cantidad eluida específica (mg)</b>	<b>Cantidad eluida no específica (mg)</b>	<b>Rendimiento de elución total (%)</b>
1	22.92	13.77	0.55	62.49
2	26.43	15.98	0.46	62.20
3	23.84	15.21	0.70	66.75
4	22.54	13.68	0.60	63.36
5	23.73	15.93	0.43	68.95
6	22.27	14.59	0.48	67.68
7	21.24	15.13	0.42	73.21
8	21.05	14.65	0.72	73.02
9	23.84	15.12	0.50	65.52
10	23.40	14.95	0.57	66.32
11	22.27	15.33	0.68	71.89
12	23.62	14.68	0.64	64.86
13	22.66	15.67	0.44	71.10
14	22.77	14.42	0.62	66.05
			<b>Media</b>	<b>67.39</b>



Los datos de eficacia de elución recogidos en la Tabla 6.10 se representan en la Figura 6.38.



**Figura 6.38. Rendimiento de elución de la Catalasa para cada ciclo de reutilización. En círculos negros se muestra la elución específica y en círculos blancos, elución no específica.**

Los resultados recogidos en la Tabla 6.10 y la Figura 6.38 muestran que el **proceso es estable** y que **la adsorción es altamente específica** para todos los ciclos ya que, de un total de 67.39% de enzima eluida, el **64.95%** corresponde a la elución utilizando un agente competitivo.

Por otra parte, el **2.43%** de proteína eluida se encontraba **adsorbida** de forma **no específica**, lo que significa que esta proteína se encuentra en el interior del monolito enlazada mediante interacciones no específica.

Además, se puede concluir que utilizando un **caudal de 1.5 mL/min**, la cantidad de **enzima recuperada** se puede considerar prácticamente **constante en todos los ciclos** y presenta un valor de **67.39 %**.

Las diferencias entre los resultados experimentales pueden atribuirse a **errores experimentales**, siempre **menores al 4%**.

#### **6.4.1.5 Influencia del caudal en el rendimiento de elución.**

Como se mencionó previamente, con el fin de comparar los resultados obtenidos entre biomoléculas y entre este monolito y el monolito cerámico recubierto con Agarosa D5, el caudal del proceso de adsorción se mantuvo constante con un valor de 1.5 ml/min, ya que para la Catalasa no es adecuado emplear caudales mayores en este proceso [53].

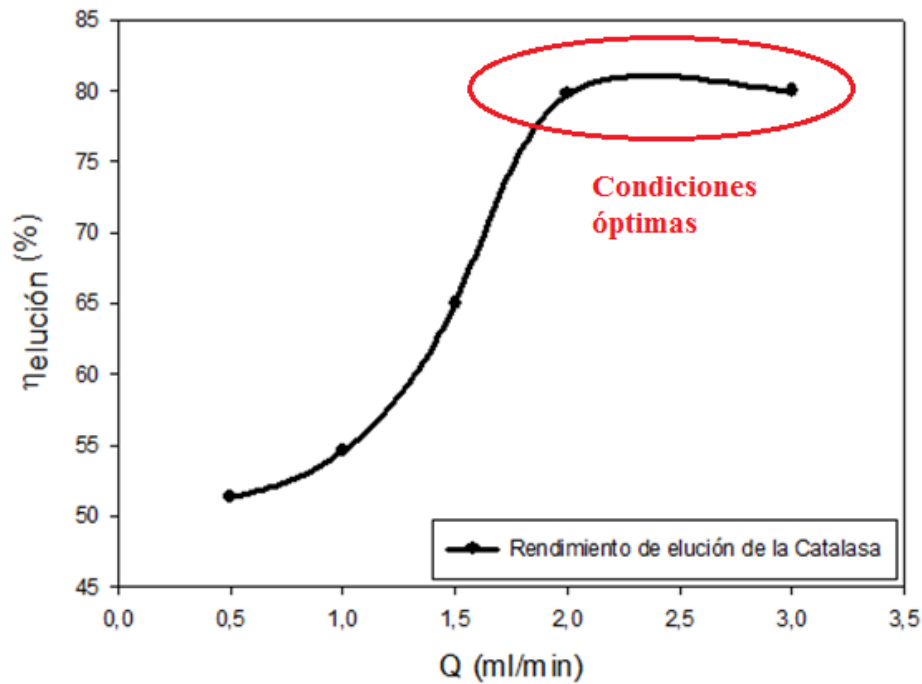
Sin embargo, con el fin de determinar la cantidad máxima de enzima que se puede recuperar, se estudió la influencia del caudal en el proceso de elución, ya que es un factor importante en el rendimiento del proceso e interviene, a su vez, en el tiempo necesario de elución.

Por tanto, se estudió la relación entre el caudal empleado en la elución y la cantidad de enzima recuperada, expresada en rendimiento de elución. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 6.11.

**Tabla 6.11. Datos del rendimiento de elución de la Catalasa a diferentes caudales.**

<b>Caudal (mL/min)</b>	<b>Rendimiento de elución (%)</b>
0.5	51.30
1.0	54.60
1.5	65.13
2.0	79.80
3.0	80.02

Los datos recogidos en la Tabla 6.11 se representan en la Figura 6.39.



**Figura 6.39. Rendimiento de elución de la Catalasa obtenido para diferentes caudales.**

Como se observa en la Figura 6.39, al aumentar el caudal de elución se recupera mayor cantidad de enzima. Esto se podría explicar de la misma forma que en el caso de la BSA:

En primer lugar, al aumentar el caudal disminuye la resistencia interna, y en segundo lugar, al aumentar el caudal se retira con mayor velocidad la disolución de elución, con lo que la concentración de enzima en disolución disminuye. Esto hace que el equilibrio de elución (Reacción (6.9)) se desplace hacia la enzima en disolución.



Además, el tiempo necesario para realizar el proceso de elución es inversamente proporcional al caudal.

En estos experimentos, este rendimiento de elución permaneció prácticamente constante durante todas las reutilizaciones para un mismo caudal de elución empleado.

Sin embargo, el rendimiento máximo de elución en este caso corresponde a un valor de 80.02%, muy inferior al rendimiento máximo para el caso de la BSA (99%). Esto corrobora las hipótesis planteadas en el Capítulo 5.

### 6.4.2 Actividad de la Catalasa.

Una vez finalizado el proceso de elución de la enzima, se midió su actividad tal y como se mencionó en la sección 6.1.6.4.

Los resultados obtenidos muestran que la catalasa eluida presenta una actividad menor que la catalasa inicial (unas 10 veces menor), tal y como se puede observar en la Figura 6.40.

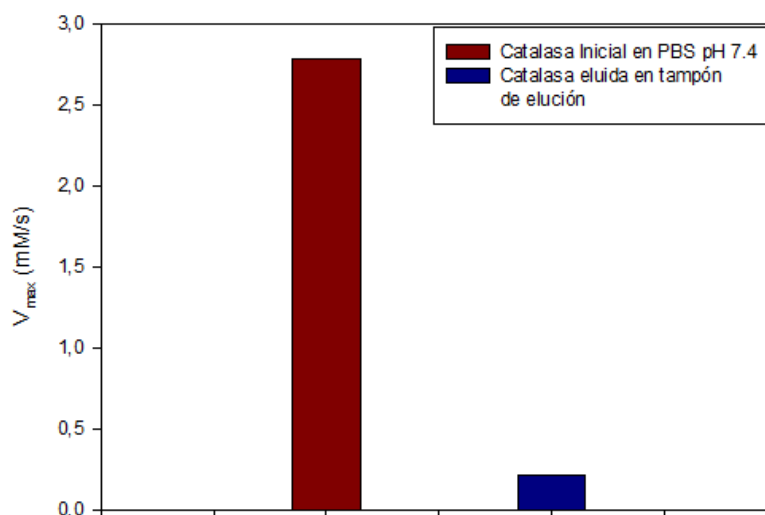


Figura 6.40. Comparación de la actividad de la catalasa inicial (rojo) y recuperada (azul).

Teniendo en cuenta este resultado, se realizó un estudio completo de los diferentes parámetros que influyen en la actividad de la catalasa, que se describirá en el Capítulo 7.

Además, se **midió la actividad de la Catalasa en la disolución de reequilibrio** para asegurar que no hay catalasa activa en la disolución de salida de la columna en la etapa de reequilibrio (lavando con Trizma 50 mM pH 10). Para ello, se mezclaron 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrada (33% w/v) con 1 mL de cada muestra de regeneración de la columna, y se mezclaron enérgicamente. No se observó la presencia de ninguna burbuja, lo que implica que no hay presencia de catalasa en estas muestras y que, en caso de haberla, estaría completamente desnaturalizada.

Teniendo en cuenta el resultado del análisis de Bradford, que indica que no hay presencia de proteína en estas disoluciones, tendría más sentido pensar que no hay Catalasa en esas fracciones de lavado.

### **6.4.3 Conclusiones de los ciclos de adsorción-elución de la Catalasa.**

- Se ha **comprobado** que este monolito de Agarosa Superporosa puede ser utilizado en la separación de enzimas como Catalasa. Sin embargo, la enzima recuperada presenta una disminución de su actividad que debe ser estudiada de forma más exhaustiva con el fin de determinar sus causas.
- Se ha demostrado que el **ligando** es **estable** a lo largo de todo el proceso, al menos durante 14 ciclos, y **no hay pérdida** cuantificable del mismo.
- Una de las mayores ventajas con este soporte es que **es posible su utilización hasta 14 ciclos sin la etapa de regeneración**. En este tipo de cromatografía, es habitual que la columna tenga que ser **regenerada** después de su utilización, es decir, **que el ion metálico deba ser reemplazado**, o que la columna cromatográfica deba ser tratada (regenerada o recargada) con el fin de poder

ser utilizada de nuevo. En lugar de regenerar la columna, en este caso es suficiente con **reequilibrarla**, es decir, lavarla con una disolución para que recupere las condiciones de pH óptimas para una nueva utilización.

- El **rendimiento de adsorción** permanece prácticamente constante al aumentar el número de reutilización con un valor del **67.02 %**.
- El **tiempo** necesario para realizar el proceso de **adsorción** varía con el número de reutilización entre 80 min para el primer ciclo y 150 min para el ciclo número 14, como consecuencia de la presencia de Catalasa no eluida en el ciclo anterior.
- En todos los ciclos de reutilización los **picos de elución** tienen la **misma forma**, y el **tiempo** necesario para esta etapa es el mismo (unos 40 min, de los que **20 min** corresponden a la elución específica).
- Utilizando un **caudal** de **1.5 mL/min**, la cantidad de proteína recuperada se puede considerar prácticamente constante en todos los ciclos y presenta un valor de **67.39 %**.
- **Al aumentar el caudal de elución se recupera mayor cantidad de proteína** ya que se mejora la transferencia de materia, y el equilibrio de elución se desplaza hacia la enzima libre. Sin embargo, el valor del rendimiento máximo de elución es de 80.02% para un caudal de 3 mL/min.

## 6.5 ESTUDIO COMPARATIVO DE ADSORCIÓN-ELUCIÓN: BSA y CATALASA.

Tras el estudio del comportamiento de la BSA y la Catalasa en el proceso de cromatografía IMAC, se comparan los resultados obtenidos con el fin de obtener algunas conclusiones y comprobar si las hipótesis propuestas en el Capítulo 5 eran correctas.

La Tabla 6.12 resume los resultados de los experimentos realizados de adsorción y posterior recuperación de BSA y Catalasa, donde es posible comparar el comportamiento de cada proceso.

**Tabla 6.12. Comparación entre los resultados de los experimentos con la BSA y la Catalasa en purificación mediante cromatografía IMAC utilizando un caudal de 1.5 ml/min en los experimentos de adsorción y elución.**

	<b>Monolito de Agarosa Superporosa BSA</b>	<b>Monolito de Agarosa Superporosa Catalasa</b>
<b>Área superficial / longitud del monolito</b>	389.77 cm <sup>2</sup> / cm longitud	389.77 cm <sup>2</sup> / cm longitud
<b>Proteína inicial</b>	35.0 mg	35.0 mg
<b>Proteína adsorbida</b>	31.38 mg	23.46 mg
<b>Proteína eluida</b>	25.70 mg	15.81 mg
<b>Tiempo necesario para un ciclo completo</b>	75 min adsorción 30 min elución 105 min total	80 – 150 min adsorción 40 min elución 120 – 190 min total
<b>Número de reutilizaciones</b>	Hasta 20 veces <sup>1</sup>	14 veces

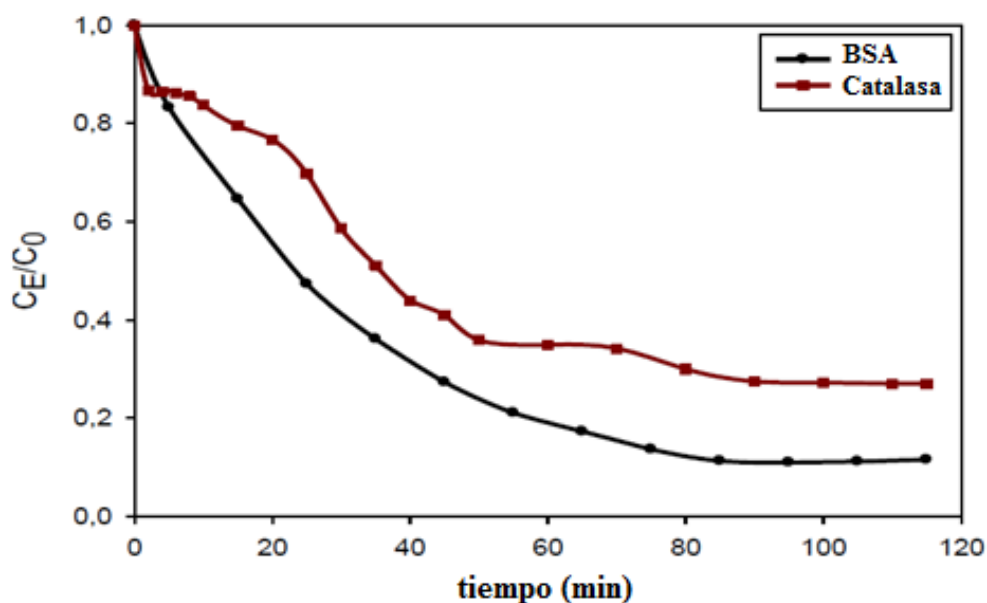
<sup>1</sup> El número de reutilizaciones puede ser mayor.

Como puede observarse en la Tabla 6.12, utilizando las mismas condiciones de operación para el mismo tipo de monolito, los resultados obtenidos muestran un rendimiento de adsorción y elución mayor y un tiempo de proceso menor para la BSA.

Los comportamientos de adsorción y elución para el primer ciclo de reutilización se resumen en la Figura 6.41 y Figura 6.42.

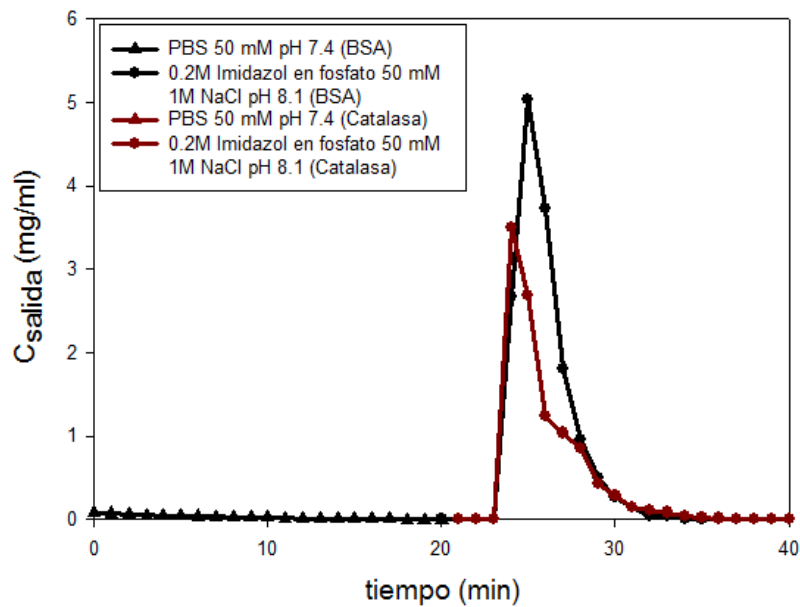
En ellas, se observa que la cantidad de biomolécula adsorbida es mayor en el caso de la BSA (Figura 6.41), y que tanto la cantidad eluida como la concentración de biomolécula obtenida presentan un mayor valor para la BSA (Figura 6.42).

Teniendo en cuenta el tiempo de adsorción, es prácticamente el mismo para ambas proteínas (Figura 6.41), mientras que en el caso del tiempo de elución, es menor para la BSA (Figura 6.42).



**Figura 6.41. Comparación de la curva de equilibrio de la BSA y la Catalasa en el monolito de Agarosa Superporosa.**





**Figura 6.42. Comparación de la curva de elución de la BSA y la Catalasa en el monolito de Agarosa Superporosa.**

En las Figura 6.41 y Figura 6.42 se comprueba que se cumple las hipótesis propuestas en el Capítulo 5:

En primer lugar, la **cantidad de proteína adsorbida** es función de:

- El **tamaño de biomolécula**: Cuanto mayor sea, mayor impedimento estérico presentará, y bloqueará mayor cantidad de centros activos que no podrán ser utilizados. Por este motivo, la cantidad total de catalasa que se adsorbe es menor que la de BSA.
- La **probabilidad de enlace**: cuanto mayor sea la probabilidad de enlace, más cantidad de biomolécula quedará retenida, y con mayor rapidez.

El **tiempo necesario para que se alcance el equilibrio de adsorción** depende de:

- **La cantidad total de proteína adsorbida:** cuanto mayor sea ésta, más tiempo se necesitará para su adsorción.
- **Tamaño de la proteína:** cuanto mayor sea el tamaño de la proteína, más centros activos quedarán bloqueados e inutilizados, y más tiempo se necesitará para encontrar otros centros activos disponibles.
- **Caudal:** cuanto mayor sea el caudal, menor será el tiempo necesario de adsorción. Sin embargo, si el caudal es elevado, no se facilitará la interacción necesaria para retener la biomolécula. Por tanto, debe ser un compromiso y tener un valor intermedio. Además, algunos estudios sugieren que el caudal no influye en la velocidad de adsorción en este tipo de soportes cromatográficos [14].

La cantidad de proteína eluida es función de:

- **La cantidad de proteína adsorbida:** como es lógico, cuanto mayor sea la cantidad de proteína adsorbida, mayor será la cantidad eluida.
- **Constante de enlace:** Cuanto mayor sea la constante de enlace, mayor dificultad habrá a la hora de eluir la proteína. Esta constante de enlace está fuertemente influida por el tipo de enlace que presenta. En este caso, como la Catalasa puede formar dobles enlaces, su constante de enlace será mayor que la BSA ( $149.000,84 \text{ M}^{-1} \text{ BSA} < 214.000 \text{ M}^{-1} \text{ Catalasa}$ ) a 304K [53].
- **Caudal:** cuanto mayor sea el caudal, mejor será la transferencia de materia, lo que provoca que el proceso sea más rápido y completo. Además, al aumentar el caudal, se desplaza el equilibrio químico hacia la desorción, lo que favorece el proceso.

Por último, el **tiempo necesario para que la proteína se eluya** depende de:

- El **tamaño de la proteína**: cuanto mayor sea la proteína, mayor impedimento estérico tendrá, y por tanto, será más difícil que un el agente competitivo pueda acceder al centro activo para romper el enlace.
- **Constante de enlace**: cuanto mayor sea la constante de enlace, más dificultad habrá para romper el enlace, lo que hace que se necesite más tiempo para ello.
- **Caudal**: al igual que en el caso anterior, cuanto mayor sea el caudal, mejor será la transferencia de materia, lo que provoca que el proceso sea más rápido y completo. Además, al aumentar el caudal, se desplaza el equilibrio químico hacia la desorción, lo que favorece el proceso.

### **6.5.1 Comparación entre el monolito de Agarosa Superporosa y el Monolito Cerámico recubierto con Agarosa D5 [38, 53].**

Como se comentó previamente, en nuestro grupo de investigación se ha trabajado en el desarrollo de un monolito Cerámico recubierto con Agarosa D5 [38, 53], capaz de solventar algunos de los problemas más importantes de los soportes cromatográficos industriales. Su esqueleto cerámico le proporciona gran resistencia mecánica y permite la utilización de un caudal elevado sin prácticamente pérdida de carga [52], mientras que el recubrimiento de Agarosa D5 le aporta todas las ventajas de este polisacárido descritas anteriormente a lo largo del presente trabajo.

Los resultados obtenidos en la separación de BSA y Catalasa utilizando este monolito Cerámico se muestran en la presente sección, y ponen de manifiesto su gran capacidad para purificar grandes cantidades de ambas biomoléculas [38, 53].

Sin embargo, este monolito Cerámico presenta una baja área disponible para la adsorción y su eficiencia de separación disminuye al reutilizar el monolito [53].

Por este motivo, en el presente trabajo se desarrolló un nuevo monolito válido para la cromatografía IMAC con una mayor área superficial, con el fin de intentar mejorar los resultados obtenidos previamente en el grupo de investigación.

Además, a lo largo del presente trabajo se han mantenido constantes las condiciones experimentales para que sea posible una comparación entre ambos soportes monolíticos.

A continuación procede a la comparación del comportamiento de estos dos monolitos para la adsorción y posterior recuperación de la BSA y la Catalasa, respectivamente (Tabla 6.13 y Tabla 6.14), utilizando las mismas condiciones experimentales (caudal de adsorción 1.5 mL/min; caudal de elución 1.5 mL/min; concentración de la disolución empleada 0.7 mg/mL; volumen de disolución empleado 50 mL).

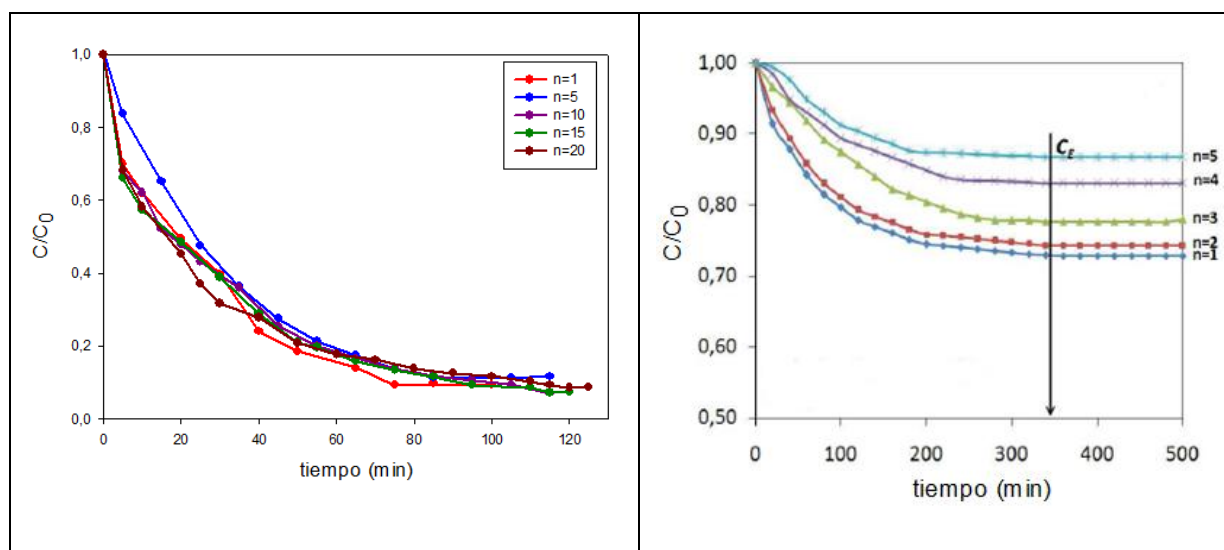
**Tabla 6.13. Comparación entre el comportamiento del monolito de Agarosa Superporosa y el monolito Cerámico recubierto con Agarosa D5 [53] para los experimentos de purificación de BSA 0.7 mg/mL con IMAC, utilizando un caudal de 1.5 mL/min en los experimentos de adsorción y elución.**

	<b>Monolito de Agarosa Superporosa BSA</b>	<b>Monolito Cerámico recubierto con Agarosa BSA [53]</b>
<b>Área superficial / longitud del monolito</b>	389.77 cm <sup>2</sup> / cm longitud	28 cm <sup>2</sup> / cm longitud
<b>Proteína inicial</b>	35.0 mg	35.0 mg
<b>Proteína adsorbida</b>	31.38 mg	9.02 – 5.13 mg
<b>Proteína eluida</b>	25.70 mg	8.92 – 5.10 mg
<b>Tiempo necesario para un ciclo completo</b>	75 min adsorción 30 min elución 105 min total	200 min adsorción 90 min elución 290 min total
<b>Número de reutilizaciones</b>	Hasta 20 veces <sup>2</sup>	5 veces

En la Tabla 6.13 se observa, es primer lugar, la diferencia en área superficial por unidad de longitud del monolito para ambos soportes, que es mucho mayor en el caso del monolito de Agarosa Superporosa.

---

<sup>2</sup> El número de reutilizaciones puede ser mayor.



**Figura 6.43. Curvas de adsorción de la BSA en el monolito de Agarosa Superporosa (a la izquierda) y el monolito Cerámico recubierto por Agarosa D5 (derecha) [53].**

Además, para una misma cantidad y concentración de BSA inicial, la cantidad de proteína adsorbida es superior en el caso del monolito de Agarosa Superporosa (31.38 mg, constante para cada reutilización) frente a la cantidad adsorbida por el monolito cerámico recubierto con agarosa (9.02 – 5.13 mg, dependiendo del número de reutilización) [53].

De esta misma forma, la cantidad de proteína recuperada es mayor para el monolito propuesto en el presente trabajo (25.70 mg) frente a la cantidad recuperada en el monolito utilizado anteriormente (8.92 – 5.10 mg, según el número de reutilización) [53]. En este punto cabe destacar que, aunque el monolito Cerámico presenta mayor rendimiento de elución, la cantidad total recuperada y, por tanto, el rendimiento total del proceso es menor [53].

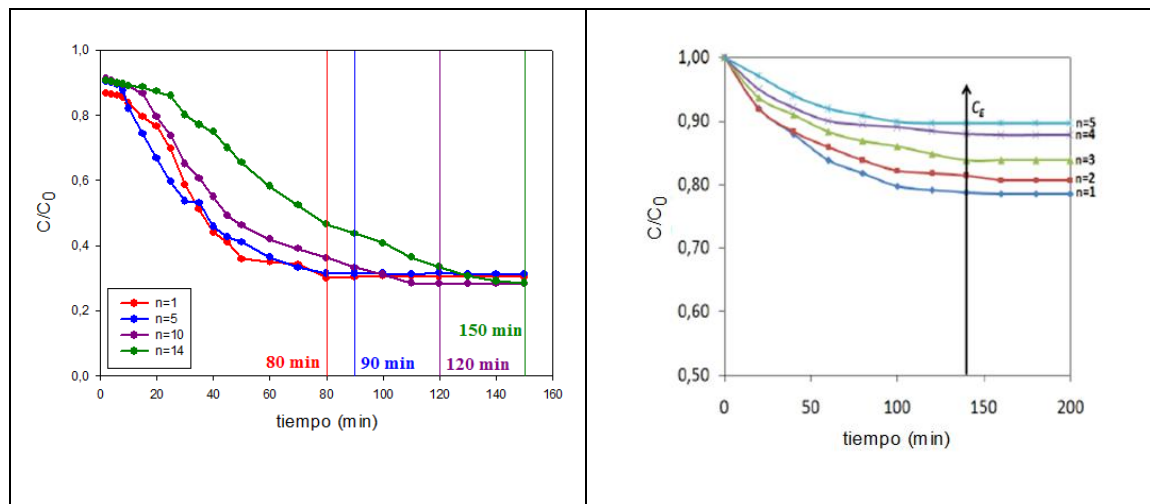
Además, el tiempo necesario para realizar el proceso también es menor en el caso del monolito de Agarosa Superporosa, con 75 min para el proceso de adsorción, 30 min para la elución (constante para cualquier reutilización), lo que hace que el tiempo total sea de 105 min. Por otra parte, el Monolito Cerámico necesita 200 min para el proceso de adsorción, 90 min para la elución, y 290 min en total [53].

Por último, es importante recalcar el número de reutilizaciones posible sin la necesidad de regenerar la matriz cromatográfica y sin volver a cargarla con  $\text{Cu}^{2+}$ , donde este nuevo monolito se ha probado hasta 20 reutilizaciones (que podría ser mayor) sin presentar una disminución de la capacidad de adsorción, pero con un aumento del tiempo necesario para esta etapa. En el caso del monolito cerámico, el número máximo de reutilizaciones es 5, a partir de la cual el proceso no es rentable en términos de tiempo, y compensa más utilizar un nuevo monolito [38, 53].

**Tabla 6.14. Comparación entre el comportamiento del monolito de Agarosa Superporosa y el monolito Cerámico recubierto con Agarosa D5 [53] para los experimentos de purificación de Catalasa con IMAC, utilizando un caudal de 1.5 mL/min en los experimentos de adsorción y elución.**

	<b>Monolito de Agarosa Superporosa Catalasa</b>	<b>Monolito Cerámico recubierto con Agarosa D5 Catalasa [53]</b>
<b>Área superficial / longitud del monolito</b>	389.77 cm <sup>2</sup> / cm longitud	28 cm <sup>2</sup> / cm longitud
<b>Proteína inicial</b>	35.0 mg	35.0 mg
<b>Proteína adsorbida</b>	23.46 mg	7.53 – 3.91 mg
<b>Proteína eluida</b>	15.81 mg	7.02 – 3.53 mg
<b>Tiempo necesario para un ciclo completo</b>	80 – 150 min adsorción 40 min elución 120 – 190 min total	100 min adsorción 100 min elución 200 min total
<b>Número de reutilizaciones</b>	14 veces	5 veces

En la Tabla 6.14 se muestra la comparación en el proceso de adsorción y recuperación de Catalasa. Sin embargo, los resultados son similares en cuestión de la comparación de ambos monolitos:



**Figura 6.44. Curvas de adsorción de la Catalasa en el monolito de Agarosa Superporosa (a la izquierda) y el monolito cerámico recubierto por Agarosa D5 (derecha) [53].**

Para una misma cantidad y concentración de Catalasa inicial, la cantidad de proteína adsorbida es superior en el caso del monolito de Agarosa Superporosa (23.46 mg, constante para cada reutilización) frente a la cantidad adsorbida por el monolito Cerámico recubierto con Agarosa D5 (7.53 – 3.91 mg, dependiendo del número de reutilización) [53].

La cantidad de proteína recuperada es mayor para el monolito propuesto en el presente trabajo (15.81 mg) frente a la cantidad recuperada en el monolito utilizado anteriormente (7.02 – 3.53 mg, según el número de reutilización) [53]. En este punto cabe destacar que, aunque el monolito Cerámico presenta mayor rendimiento de elución, la cantidad total recuperada y, por tanto, el rendimiento total del proceso es menor.

Además, el tiempo necesario para realizar el proceso también es menor en el caso del monolito de Agarosa Superporosa, con 80 – 150 min para el proceso de adsorción (según el número de reutilización), 40 min para la elución (constante para cualquier reutilización), lo que hace que el tiempo total sea de 120 – 190 min, según el número de reutilización. Por otra parte, el monolito cerámico necesita 100 min para el proceso de



adsorción, 100 min para la elución, y 200 min en total (constante para cada reutilización) [53].

Como ambos soportes son equivalentes en cuanto a estructura química, teniendo en cuenta que el proceso realizado se ha realizado de la misma forma (utilizando las mismas concentraciones y volúmenes de disolución), para que ambos sean comparables es necesario que la cantidad de biomolécula adsorbida por unidad de área superficial sea la misma en ambos soportes.

En la Tabla 6.15 se resumen y comparan los resultados de biomolécula adsorbida por unidad de área superficial, tanto del monolito Cerámico recubierto con Agarosa D5 [53] como para el monolito de Agarosa Superporosa.

**Tabla 6.15. Comparación de cantidad de biomolécula adsorbida por unidad de área superficial, para los dos tipos de monolitos.**

		Área superficial	BSA adsorbida	Relación proteína adsorbida / área superficial
BSA	Monolito de Agarosa Superporosa	779.54 cm <sup>2</sup>	31.40 mg	0.040 mg / cm <sup>2</sup>
	Monolito Cerámico recubierto con Agarosa D5 [53]	210 cm <sup>2</sup>	9.02 mg	0.043 mg / cm <sup>2</sup>
Catalasa	Monolito de Agarosa Superporosa	779.54 cm <sup>2</sup>	24.40 mg	0.031 mg / cm <sup>2</sup>
	Monolito Cerámico recubierto con Agarosa D5 [53]	210 cm <sup>2</sup>	7.53 mg	0.034 mg / cm <sup>2</sup>

Por último, es importante recalcar el número de reutilizaciones posible sin la necesidad de regenerar la matriz cromatográfica y sin volver a cargarla con  $\text{Cu}^{2+}$ , donde este nuevo monolito se ha probado hasta 14 reutilizaciones (que podría ser mayor) sin presentar una disminución de la capacidad de adsorción, pero con un aumento del tiempo necesario para esta etapa. En el caso del monolito cerámico, el número máximo de reutilizaciones es 5, a partir de la cual el proceso no es rentable en términos de tiempo, y compensa más utilizar un nuevo monolito [38, 53].

## 6.6 CONCLUSIONES.

De los experimentos realizados y resultados obtenidos en el presente capítulo se puede concluir:

- Este monolito de Agarosa Superporosa puede utilizarse para purificación de proteínas mediante cromatografía IMAC, como se demuestra en el caso de la BSA y la Catalasa.
- El monolito no interacciona con las biomoléculas utilizadas en ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , lo que implica que no se producen enlaces no deseados biomolécula-matriz cromatográfica.
- En las condiciones propuestas no hay pérdida de  $\text{Cu}^{2+}$  detectable, lo que elimina la mayor desventaja de este método cromatográfico.
- Existen diferencias en los procesos de separación de ambas proteínas como consecuencia de sus propiedades, tal y como se propuso en el Capítulo 5:
  - El rendimiento de adsorción es mayor en la BSA debido a su menor tamaño y a que su probabilidad de enlace es el doble que la de la Catalasa, lo que mejora la interacción hace que sea necesario menos tiempo adsorberse.

- El rendimiento de elución de la BSA es mayor que el de la Catalasa ya que su tamaño es menor (66 kDa frente a los 240 kDa de la Catalasa), lo que disminuye el impedimento estérico y facilita el acceso del imidazol al enlace; y al valor de su constante de afinidad ( $149.000,84 \text{ M}^{-1}$  BSA <  $214.000 \text{ M}^{-1}$  Catalasa) a 304 K [53].
- Las propiedades cromatográficas de esta nueva matriz presenta grandes mejoras en comparación con el monolito Cerámico en términos de rendimiento de adsorción, cantidad total recuperada, tiempo necesario para cada etapa y número de reutilizaciones, lo que hace que sea un soporte interesante en este tipo de aplicaciones.
- La Catalasa presenta una pérdida de actividad tras el proceso, que no se sabe muy bien si es debido al efecto de algún compuesto presente en disolución o por el propio proceso cromatográfico. Esto se estudiará en el siguiente capítulo.

El siguiente capítulo consiste en el estudio de los factores que influyen en la actividad de la Catalasa, para intentar determinar el motivo por el cual la actividad de la Catalasa recuperada disminuye considerablemente.



## **Capítulo 7.**

### **Efecto del proceso de Adsorción- Elución en la actividad de la Catalasa**



Aunque la utilización de cromatografía IMAC para la purificación de diferentes tipos de Catalasa ha sido ampliamente estudiada [190-193], es habitual no encontrar en bibliografía la determinación de la actividad de la enzima eluida [160, 187, 188, 194-196].

La actividad de la Catalasa recuperada es un parámetro fundamental que determina la utilidad de la purificación de la misma mediante la cromatografía IMAC.

Con el fin de estudiar la pérdida de actividad de la enzima eluida, se modificaron diferentes parámetros como el tipo de disolvente, pH, fuerza iónica (I), concentración de agente competitivo y presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ . De esta forma se determina la influencia de estos parámetros en la actividad de la Catalasa recuperada.

## **7.1 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA E INHIBICIÓN DE UNA ENZIMA.**

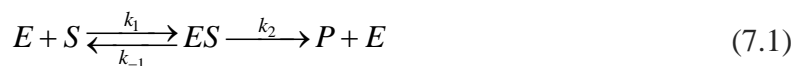
Previamente al estudio de la actividad de la Catalasa, se describe el modelo matemático que sigue la reacción enzimática, los tipos de inhibición que pueden tener lugar y las ecuaciones empleadas para el cálculo de los parámetros de actividad.

A continuación se resume el modelo de la cinética enzimática.

### **7.1.1 Modelo de Michaelis-Menten [197].**

En 1913 los bioquímicos Leonor Michaelis y Maud L. Menten propusieron un mecanismo de reacción enzimática capaz de relacionar la velocidad inicial de las reacciones catalíticas con la concentración de sustrato.

Este mecanismo propuesto pone de manifiesto la formación de un compuesto intermedio entre la enzima ( $E$ ) y el sustrato ( $S$ ), ( $ES$ ), en una primera etapa de equilibrio, y la formación del producto ( $P$ ) en una segunda etapa, tal como se muestra a continuación [198]:



Donde se define  $K_S$  como la constante de disociación del equilibrio de formación del compuesto intermedio  $ES$  (Ecuación (7.2)), y  $K_M$  es la constante de Michaelis y se define en la Ecuación (7.3):

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (7.2)$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (7.3)$$

Siendo:

$K_S$ : Constante de disociación [=] mM.

$K_M$ : Constante de Michaelis [=] mM.

$[E]$ : Concentración de enzima [=] mM.

$[S]$ : Concentración de sustrato ( $H_2O_2$ ) [=] mM.

$[ES]$ : Concentración de compuesto intermedio enzima-sustrato [=] mM.

$k_{-1}$ : Constante cinética de la reacción inversa a la formación del compuesto intermedio enzima-sustrato [=] 1/s.

$k_1$ : Constante cinética de la reacción directa a la formación del compuesto intermedio enzima-sustrato [=] 1/(mM·s).

$k_2$ : Constante cinética de la reacción irreversible para la formación del producto a partir del compuesto intermedio enzima-sustrato [=] 1/s.



En general, las cinéticas enzimáticas siguen el modelo cinético de Michaelis-Menten [197], en el que se realiza una aproximación de equilibrio rápido en la primera etapa ( $k_{-1} \gg k_2$ ), dando lugar a la expresión de la velocidad inicial de reacción como se muestra en la Ecuación (7.4):

$$v_0 = \frac{k_2 [E_0] [S]}{K_S + [S]} \quad (7.4)$$

Siendo:

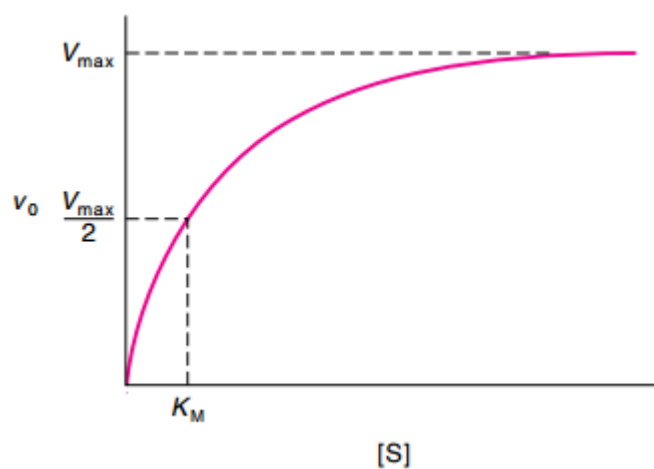
$v_0$ : Velocidad inicial de reacción [=] mM/s

$[E_0]$ : Concentración de enzima libre inicial [=] mM.

$K_S$ : Constante de disociación [=] mM.

$[S]$ : Concentración de sustrato [=] mM.

Cuando se representa la velocidad inicial de la reacción enzimática frente a la concentración de sustrato, se obtiene la Figura 7.1.



**Figura 7.1. Representación de la velocidad de reacción ( $v_0$  en mM/s) frente a la concentración de sustrato (mM), en una reacción enzimática [199].**

En ella se observa que la velocidad de reacción aumenta cuando la concentración de sustrato aumenta, aproximándose de forma asintótica a un valor máximo de velocidad inicial de reacción,  $V_{m\acute{a}x}$ , que se alcanza cuando toda la enzima se ha unido al sustrato y se define como  $V_{m\acute{a}x} = k_2 [E_0]$ .

Por tanto,  $V_{m\acute{a}x}$  es una constante numérica que representa la velocidad máxima obtenida cuando la enzima (E) se encuentra completamente formando el compuesto intermedio con el sustrato (ES) [200].

Por otra parte, el valor numérico de  $K_M$  equivale a la constante de disociación en el caso de equilibrio rápido y se define como la concentración de sustrato a la cual la velocidad inicial de reacción es la mitad de la velocidad inicial máxima, es decir, donde  $[E] = [ES]$  [200]. Un valor bajo de  $K_M$  indica una afinidad sustrato-enzima alta.

El valor de  $K_M$  depende tanto de la enzima y sustrato como de las condiciones como temperatura y pH [199, 201].

Bajo las suposiciones anteriores, la velocidad inicial de reacción se define mediante la Ecuación (7.5):

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_M + [S]} \quad (7.5)$$

### 7.1.2 Linealización de Lineweaver- Burk [200].

Como se observó en la Figura 7.1, la relación entre la velocidad de reacción,  $v_0$ , y la concentración de sustrato,  $[S]$ , no es lineal. Aunque a bajas concentraciones de sustrato se mantenga lineal, se va curvando a medida que aumenta la concentración del mismo.

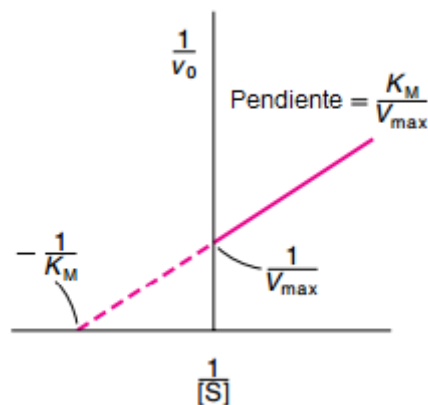
Una forma habitual de representar los datos cinéticos es mediante la linealización de Lineweaver-Burk o representación del doble recíproco [200]. En ella, se representa la siguiente ecuación, que sigue la ecuación de una recta (Ecuación (7.6)):

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{m\acute{a}x} [S]} \quad (7.6)$$

O lo que es lo mismo:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (7.7)$$

De esta forma, representando  $\frac{1}{v_0}$  frente a  $\frac{1}{[S]}$  se pueden determinar los parámetros de la reacción enzimática (Figura 7.2).



**Figura 7.2. Representación de la inversa de la velocidad de reacción (s/mM) frente a la inversa de la concentración de sustrato (mM<sup>-1</sup>) (linealización de Lineweaver-Burk) [199].**

Por tanto, mediante esta linealización es posible obtener los valores de los parámetros cinéticos de reacciones enzimáticas ( $K_M$ ,  $V_{m\acute{a}x}$  y  $k_{cat}$ ), y se aplicará para la determinación de la actividad de la Catalasa.

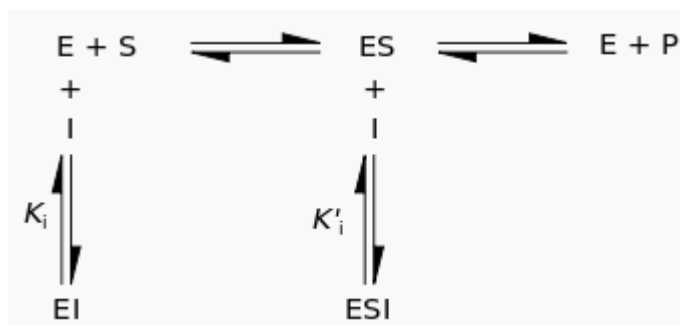
### 7.1.3 Inhibición enzimática.

Los inhibidores enzimáticos son compuestos que reducen o anulan la actividad enzimática. Estos inhibidores pueden unirse a las enzimas de forma reversible (la desaparición del inhibidor restaura la actividad enzimática) o irreversible (el inhibidor inactiva permanentemente a la enzima) [199, 201, 202].

#### 7.1.3.1 Inhibidores reversibles.

Los inhibidores enzimáticos reversibles pueden ser clasificados como competitivos, acompetitivos, no competitivos y mixtos, según el efecto que produzcan en las constantes cinéticas  $K_M$  y  $V_{máx}$ .

Este efecto dependerá de que el inhibidor interactúe con la enzima  $[E]$ , con el complejo enzima-sustrato  $[ES]$ , o con ambos (Figura 7.3).



**Figura 7.3. Esquema de una reacción enzimática en presencia de un inhibidor enzimático de unión reversible.**

Se definen los factores de corrección siguientes para mejorar la clasificación de los tipos de inhibición, cuando  $[S] \gg K_M$ :

Para la interacción del inhibidor con la Enzima ( $E$ )

$$\alpha = \frac{v_0}{(v_0)_{inhibición}} = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad (7.8)$$

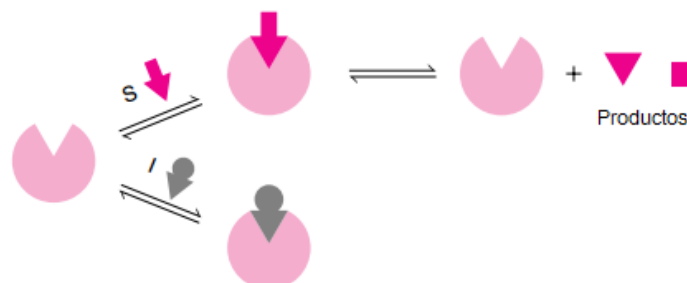
Para la interacción del inhibidor con el compuesto intermedio ( $ES$ )

$$\alpha' = \frac{v_0}{(v_0)_{inhibición}} = 1 + \frac{[I]}{K_i'} \quad (7.9)$$

**Tabla 7.1. Esquema de los tipos de inhibición enzimática y cómo influye en los parámetros de la cinética enzimática para el caso de un inhibidor enzimático de unión reversible.**

		Tipo de inhibición
Sólo $K_i$	$\alpha=1$	Competitiva
Sólo $K_i'$	$\alpha' =1$	Acompetitiva
$K_i = K_i'$	$\alpha = \alpha'$	No competitiva
$K_i \neq K_i'$	$\alpha \neq \alpha'$	Mixta

- **Inhibición Competitiva:** Tanto el sustrato como el inhibidor compiten por el centro activo de la enzima pero sólo el compuesto intermedio  $ES$  se convierte en producto.



**Figura 7.4. Esquema de la inhibición Competitiva [199].**

En este caso, la gráfica de Lineweaver-Burk se ve modificada en su pendiente, tal como se observa en la Figura 7.5.

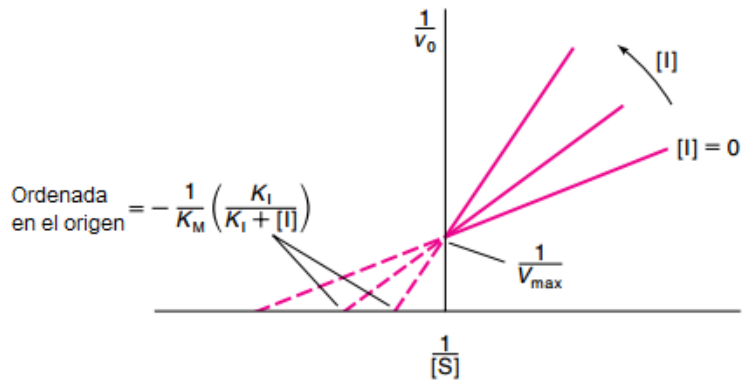


Figura 7.5. Representación de Lineweaver-Burk para la inhibición competitiva [199].

- **Inhibición Acompetitiva:** El inhibidor se enlaza sólo al compuesto intermedio ES. El compuesto ESI formado no se convierte en producto.



Figura 7.6. Esquema de la inhibición Acompetitiva [199].

En este caso, la gráfica de Lineweaver-Burk se ve modificada en su ordenada en el origen, tal como se observa en la Figura 7.7.

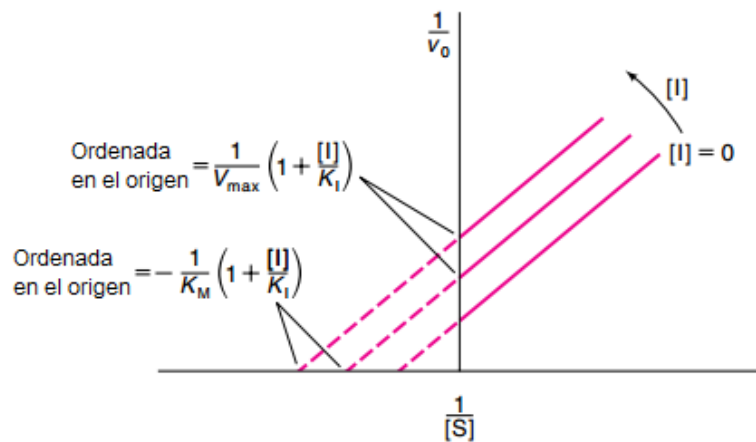


Figura 7.7. Representación de Lineweaver-Burk para la inhibición acompetitiva [199].

- **Inhibiciones No competitiva y Mixta:** El inhibidor se enlaza por otra zona diferente al centro activo de la enzima. El compuesto intermedio formado ESI no se convierte en producto.

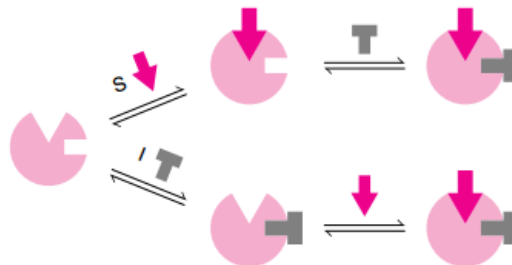
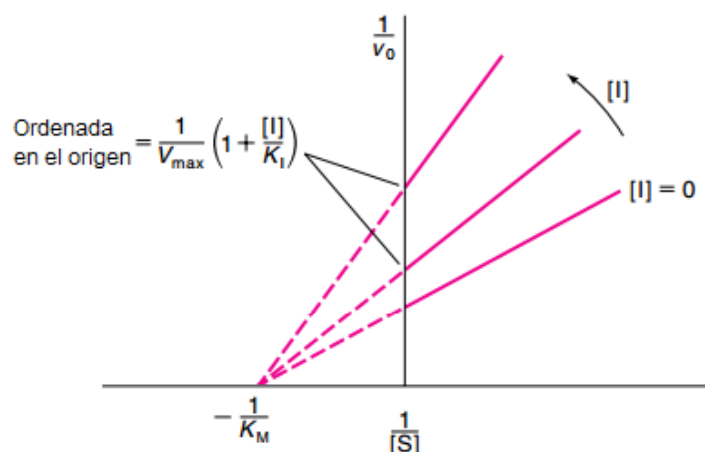


Figura 7.8. Esquema de las inhibiciones No competitiva y Mixta [199].

En este caso, la gráfica de Lineweaver-Burk se ve modificada tanto en su pendiente como en su ordenada en el origen, tal como se observa en la Figura 7.9.



**Figura 7.9. Representación de Lineweaver-Burk para la inhibición no competitiva y mixta [199].**

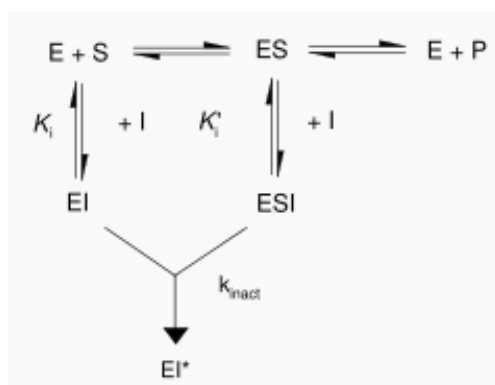
Para clasificar un inhibidor se realizan estudios de cinética enzimática en función de la concentración de inhibidor.

### 7.1.3.2 Inhibidores irreversibles.

Los inhibidores enzimáticos también pueden unirse e inactivar una enzima de forma irreversible, generalmente por medio de modificaciones covalentes de residuos del centro catalítico de la enzima [199].

Estas reacciones decaen de forma exponencial y suelen ser saturables. Por debajo de los niveles de saturación, mantienen una cinética de primer orden con respecto al inhibidor.





**Figura 7.10. Esquema de una reacción enzimática en presencia de un inhibidor enzimático de unión irreversible.**

En este caso, la efectividad del inhibidor no se determina mediante la constante de equilibrio sino que se calcula como la velocidad a la que tienen lugar los enlaces irreversibles [199].

## **7.2 DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA.**

En primer lugar, se define la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato ( $H_2O_2$ ) por minuto a 25°C.

En el caso de la enzima Catalasa, la reacción enzimática que produce se muestra en la Reacción (7.10), siendo el  $H_2O_2$  el sustrato [159, 161-163]:



Por tanto, la actividad de la Catalasa se puede cuantificar teniendo en cuenta la velocidad de desaparición del sustrato o la velocidad de aparición de alguno de los productos y teniendo en cuenta el tratamiento matemático expuesto previamente.

A continuación, se detalla la determinación experimental de la actividad de la Catalasa en diferentes condiciones con el fin de determinar la influencia del proceso cromatográfico, concentración de imidazol, pH, fuerza iónica (I), presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , o utilización de otros agentes eluyentes en la actividad de la Catalasa recuperada.

## 7.2.1 Materiales y métodos.

### 7.2.1.1 Reactivos:

**Tabla 7.2. Reactivos utilizados y empresa comercializadora.**

Reactivos	Empresa
Cloruro sódico (NaCl) Fosfato monobásico sódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) Tampón fosfato salino pH 7.4 (PBS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Imidazol	Aldrich (St. Louis, MO, USA).
Hidroximetilaminometano (TRIS base) Fosfato sódico dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) Catalasa de hígado bovino (EC 1.11.1.6)	Sigma (St. Louis, MO, USA).
Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30% w/v Ácido Acético Ácido Clorhídrico (HCl)	Panreac (Barcelona, España)
Tampón Laemmli 2X 2-Mercaptoetanol 10% w/v Glicerol 20% w/v Bromofenol Blue Bisacrilamida 30% w/v Persulfato de amonio (APS) 10 % w/v Tetrametiletilendiamina (TEMED) Persulfato de amonio (APS) Glicina Azul Comassie G-250	BioRad (CA, USA)

### 7.2.1.2 Equipos utilizados:

Los equipos empleados en el presente capítulo se resumen en la Tabla 7.3.

**Tabla 7.3. Equipos utilizados y función.**

<b>Equipos</b>	<b>Función</b>
Espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Madrid, España).	Seguir la descomposición del sustrato en la reacción enzimática
Kit completo Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems, Bio-Rad (Madrid, España). Fuente de alimentación PowerPac Basic System, Bio-Rad (Madrid, España). Agitador de balanceo Drocker 25XL Biogen (Madrid, España)	Realizar la electroforesis

### 7.2.1.3 Calibrado de la concentración de sustrato para la determinación de la actividad enzimática de la Catalasa.

Como se mencionó previamente, la Catalasa es una enzima común en el organismo de los seres vivos que cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, tal y como se muestra en la Ecuación (7.10) [161-163].

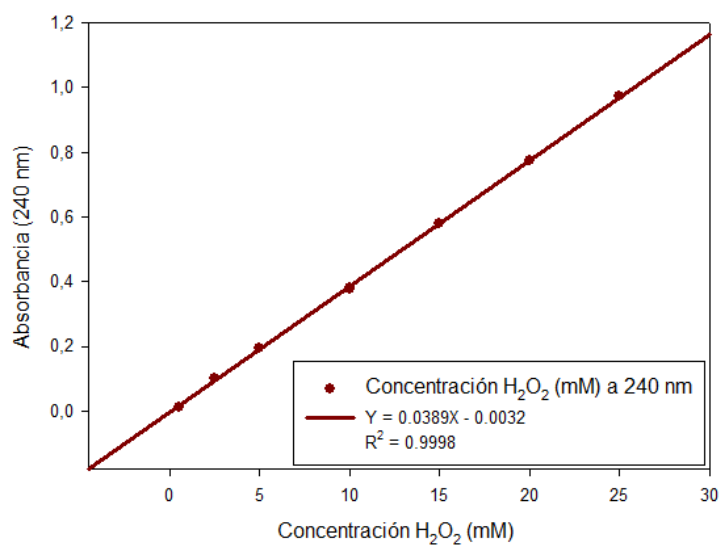


El método más habitual para determinar su actividad es siguiendo el consumo de sustrato, ya que es posible detectar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm [162, 163].

Para ello, es necesario determinar la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en función de la medida de absorbancia a 240 nm (Tabla 6.5 y Figura 6.7).

**Tabla 7.4. Valores de absorbancia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS pH 7.4 a 240 nm.**

Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	Absorbancia ( $\lambda=240$ nm)
0.5	0.0127
2.5	0.1006
5.0	0.1943
10	0.3786
15	0.5806
20	0.7740
25	0.9722



**Figura 7.11. Recta de calibrado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm.**

Una vez que la concentración de sustrato es conocida, se realiza el estudio cinético para determinar los parámetros de la cinética enzimática y su actividad, como se mencionó en la sección 7.1.

El método empleado para ello es el de Beers y Siziers [182] modificado por Li y Schellhorn [183], que se explica a continuación:

- Se mezclan 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en PBS con 250  $\mu\text{L}$  de disolución con Catalasa con una concentración determinada.
- Se mide la concentración de sustrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en los instantes iniciales para calcular la velocidad inicial enzimática.

Una vez se conocen los valores de las concentraciones iniciales de sustrato es posible calcular la actividad de la catalasa, y determinar la pérdida de actividad de la misma.

## **7.2.2 Actividad enzimática de la Catalasa.**

Como se comentó en el Capítulo 6, la actividad enzimática disminuye considerablemente tras el proceso de adsorción-elución. Sin embargo, no se conoce si esta disminución viene motivada por el proceso cromatográfico o por las condiciones en las que se encuentra la enzima en el tampón de elución.

Por tanto, se realiza un estudio de la influencia de diferentes parámetros (la utilización de diferentes tampones, agentes competitivos, efecto de la columna, pH y fuerza iónica (I)) para determinar los factores que disminuyen la actividad enzimática de la Catalasa eluida.

Los resultados obtenidos en dicho estudio se resumen a continuación.

### **7.2.2.1 Influencia del proceso cromatográfico y del tipo de disolución tampón en la actividad enzimática de la Catalasa.**

Con el fin de determinar la influencia de la naturaleza del proceso de adsorción-elución que se produce en la columna cromatográfica y del tipo de tampón utilizado se determinaron los valores de los parámetros cinéticos que caracterizan la reacción enzimática, así como la actividad de la misma.

Para ello, se determina la actividad de una disolución de Catalasa 0.05 M en diferentes disoluciones tampón y condiciones, a temperatura ambiental controlada de 25°C:

- En primer lugar, se utilizó una disolución de **Catalasa 0.05 M en PBS 50 mM pH 7.4**, para obtener la actividad de la enzima en el tampón de adsorción, es decir, la actividad de la Catalasa antes del proceso cromatográfico.
- En segundo lugar, se utilizó una disolución de **Catalasa 0.05 M en tampón fosfato 50 mM, 1M NaCl, 0.2M imidazol pH 8.1** para obtener la actividad de la Catalasa en el tampón de elución.
- Con el fin de determinar el efecto del proceso cromatográfico en la actividad de la enzima, se determinó la actividad de **Catalasa 0.05 M eluida en tampón fosfato 50 mM, 1M NaCl, 0.2M imidazol pH 8.1**.
- Por último, para determinar la influencia de la presencia de imidazol en la actividad de la enzima se utilizó una disolución de **Catalasa 0.05 M en tampón fosfato 50 mM, 1M NaCl pH 6.5**, que es la disolución tampón empleada en el proceso de elución sin el imidazol.

Estos experimentos se realizaron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, utilizando diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre 10 y 50 mM. A partir de los resultados experimentales obtenidos se calculan los parámetros del modelo de Michaelis-Menten utilizando la linealización de Lineweaver-Burk [200].

Los resultados obtenidos de los experimentos realizados se muestran a continuación, en las Figura 7.12, Figura 7.13, Figura 7.14 y Figura 7.15.

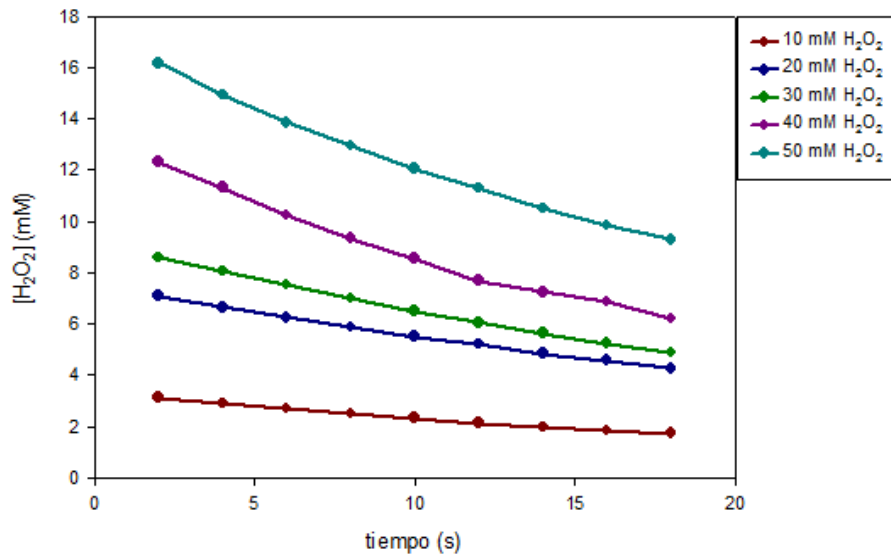


Figura 7.12. Velocidad de descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 - 50 mM) por acción de Catalasa 0.05 M disuelta en tampón PBS 50 mM pH 7.4.

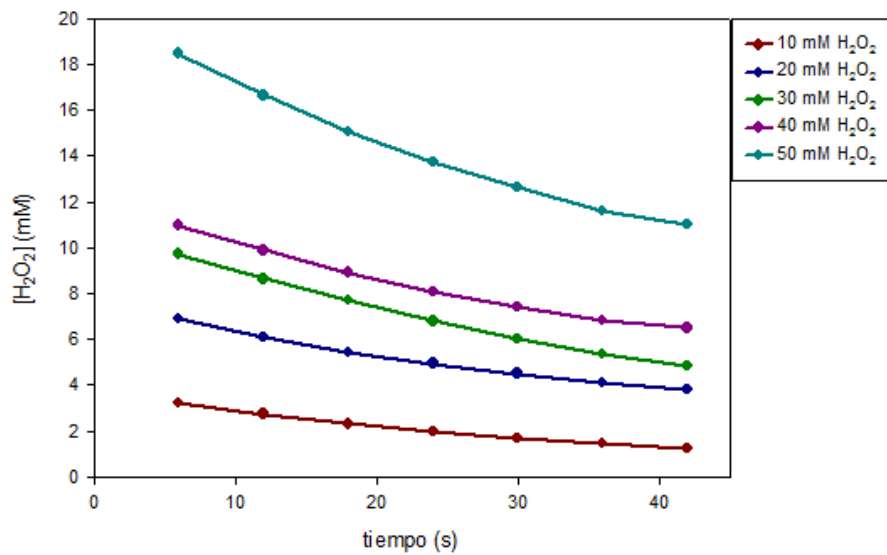
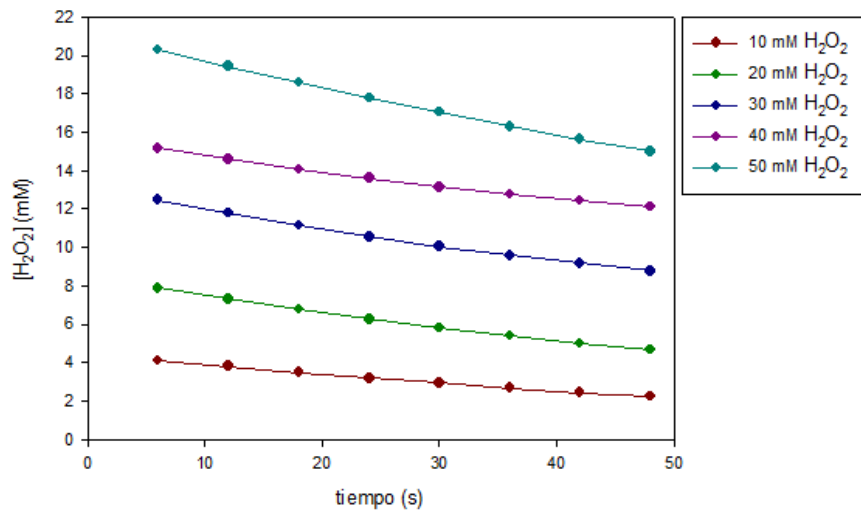
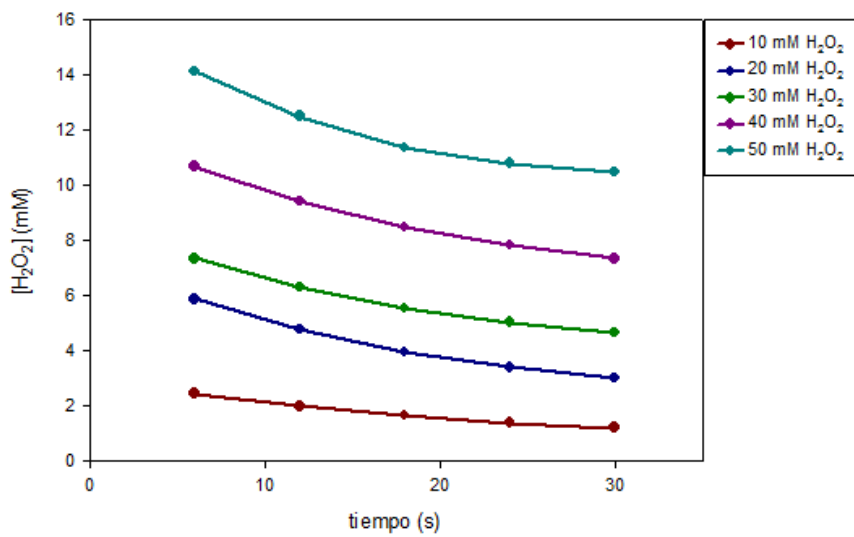


Figura 7.13. Velocidad de descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 - 50 mM) por acción de Catalasa 0.05 M disuelta en tampón de elución PBS 50 mM 0.2 M imidazol 1 M NaCl, pH 8.1.



**Figura 7.14.** Velocidad de descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 - 50 mM) por acción de Catalasa eluida 0.05 M disuelta en tampón de elución PBS 50 mM 0.2 M imidazol 1 M NaCl, pH 8.1.



**Figura 7.15.** Velocidad de descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 - 50 mM) por acción de Catalasa 0.05 M disuelta en tampón fosfato 50 mM pH 6.5.

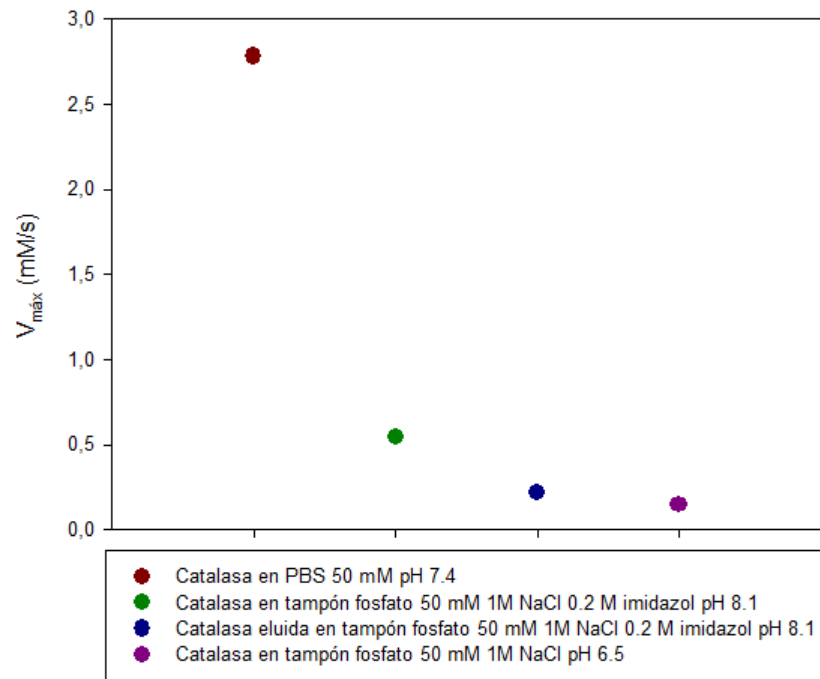


A partir de estos resultados experimentales, y realizando la linealización de Lineweaver-Burk descrita en la sección 7.1.2, se obtienen los parámetros de la cinética enzimática y la actividad de la Catalasa, que se resumen en la Tabla 7.5.

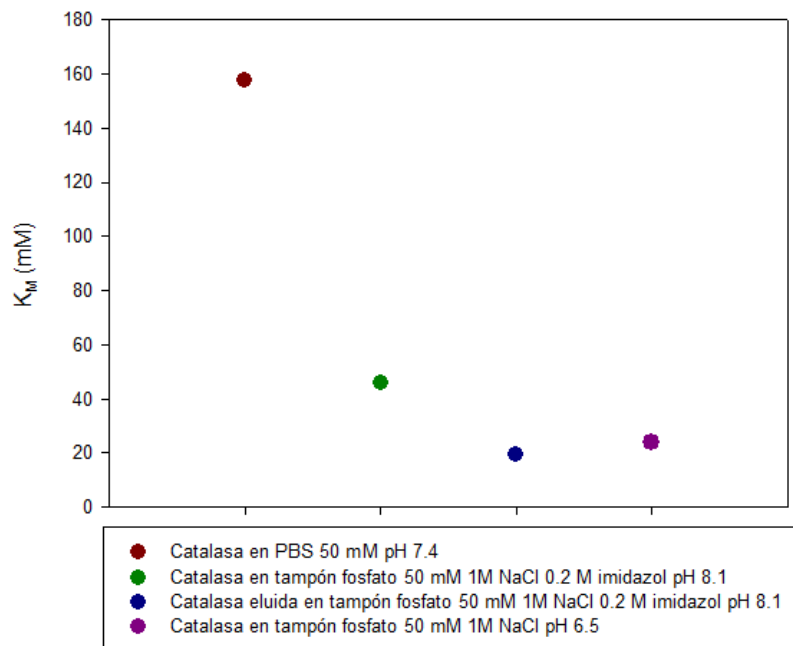
**Tabla 7.5. Valores de los parámetros de la cinética enzimática obtenidos para diferentes disoluciones.**

	<b>Catalasa 0.05 M en PBS 50 mM pH 7.4</b>	<b>Catalasa 0.05 M en tampón fosfato 50 mM, 1M NaCl, 0.2M imidazol pH 8.1</b>	<b>Catalasa 0.05 M eluida en tampón fosfato 50 mM, 1M NaCl, 0.2M imidazol pH 8.1</b>	<b>Catalasa 0.05 M en tampón fosfato 50 mM, 1M NaCl pH 6.5</b>
<b>V<sub>máx</sub> (mM/s)</b>	2.78	0.541	0.215	0.147
<b>K<sub>m</sub> (mM)</b>	157.75	46.03	19.36	23.93
<b>K<sub>cat</sub> (U/mg)</b>	6672	1298	516	352

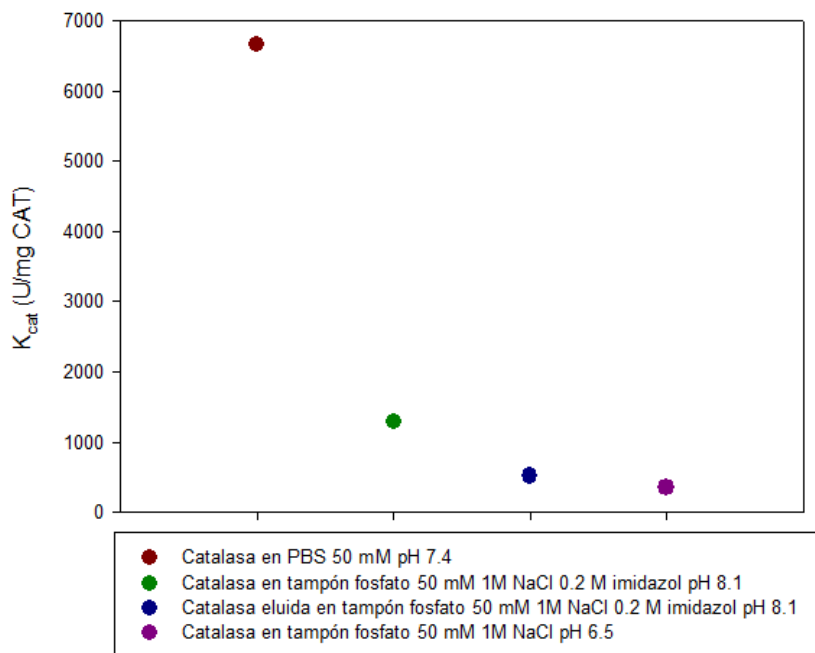
Los resultados recogidos en la Tabla 7.5. se representan en la Figura 7.16, Figura 7.17 y Figura 7.18.



**Figura 7.16. Velocidad máxima de la reacción catalítica de la Catalasa en diferentes disoluciones.**



**Figura 7.17. Constante de Michaelis-Menten de la reacción catalítica de la Catalasa en diferentes disoluciones.**



**Figura 7.18. Constante catalítica de la reacción catalítica de la Catalasa en diferentes disoluciones.**

Según se observa en la Figura 7.16, Figura 7.17 y Figura 7.18, la disolución que presenta mayor actividad es la de la Catalasa disuelta en PBS a pH 7.4.

Tras ella, la disolución de Catalasa en el tampón de elución (sin que se haya producido el proceso cromatográfico de adsorción-elución) es la siguiente que presenta mejores resultados. La diferencia entre estas dos disoluciones pone de manifiesto la influencia del tipo de disolvente utilizado, y sus propiedades (fuerza iónica (I), presencia de Imidazol y pH) en la actividad de la Catalasa.

Comparando los resultados de la enzima disuelta en el tampón de elución con la actividad de la Catalasa eluida de la columna (en el tampón de elución), se observa que los parámetros cinéticos se han reducido a la mitad aproximadamente. De aquí se puede concluir que el proceso cromatográfico en columna influye en la pérdida de la actividad de la Catalasa, y se plantea la hipótesis de que la este hecho sea consecuencia de una **interacción con el  $\text{Cu}^{2+}$  inmovilizado** en la columna cromatográfica, que podría afectar a la estructura de la enzima.

Por último, se obtiene que el valor de la actividad de la Catalasa disuelta en el tampón de elución sin imidazol (con un pH de 6.5), presenta una menor actividad.

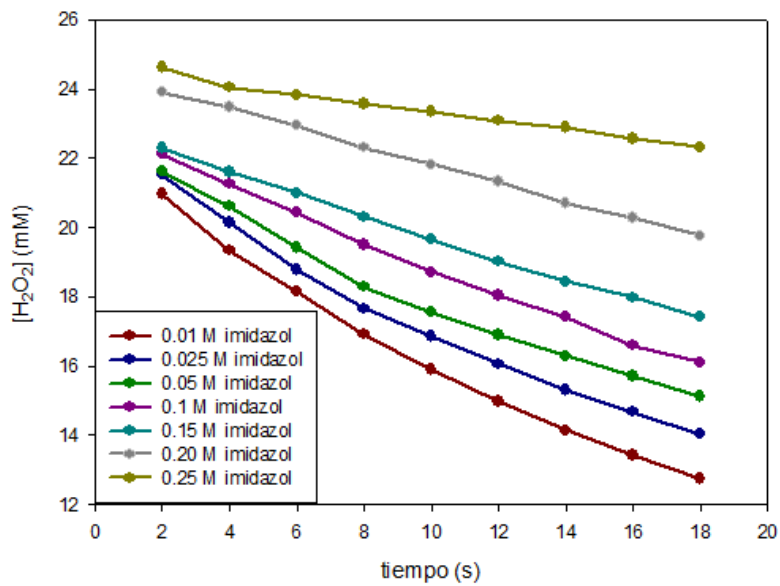
Sin embargo, no se conoce con exactitud si esta diferencia se debe a que la presencia de imidazol podría mejorar la actividad de la proteína, o a que sea un efecto del pH.

Por este motivo, es necesario estudiar la influencia de diferentes factores como la influencia de la concentración de imidazol, el pH, la fuerza iónica (I), la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  o el tipo de disolución tampón empleada en la actividad de la Catalasa.

#### **7.2.2.2 Efecto de la concentración del imidazol en la actividad enzimática de la Catalasa:**

Con el fin de determinar la influencia de la concentración de imidazol en la actividad de la Catalasa, se midió la velocidad de descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  50 mM por acción de Catalasa 0.05M disuelta en tampón fosfato 50 mM 1M NaCl, con diferentes concentraciones de imidazol (0.01-0.25 M).

Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 7.19.

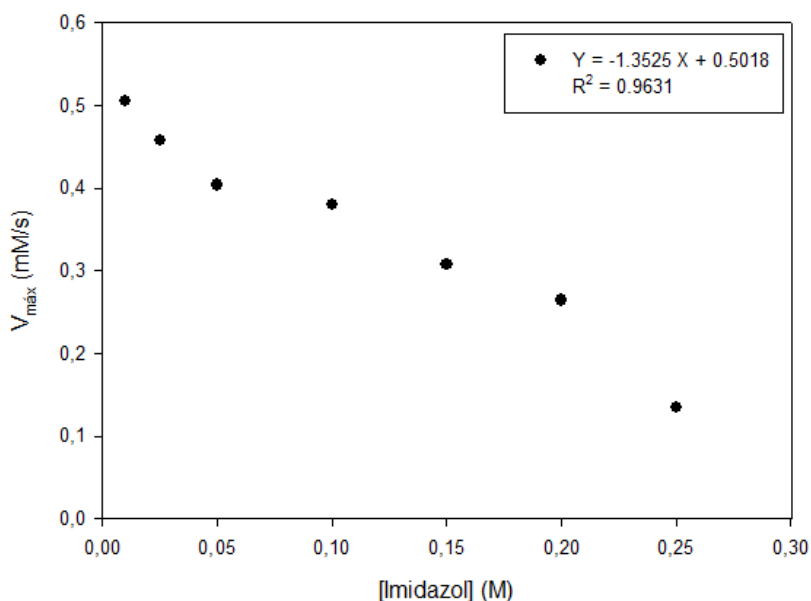


**Figura 7.19.** Velocidad de descomposición de  $H_2O_2$  50 mM por acción de Catalasa 0.05 M disuelta en tampón fosfato 50 mM 1M NaCl, con diferentes concentraciones de imidazol (0.01-0.25 M).

Los resultados de las velocidades de reacción obtenidos se recogen en la siguiente Tabla 7.6 y Figura 7.20:

**Tabla 7.6.** Velocidades de reacción de  $H_2O_2$  50 mM para diferentes concentraciones de imidazol.

Concentración de imidazol (M)	Velocidad máxima de reacción (mM/s)
0.01	0.505
0.025	0.458
0.05	0.403
0.10	0.380
0.15	0.307
0.20	0.264
0.25	0.134



**Figura 7.20. Velocidad máxima de reacción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mM frente a la concentración de imidazol presente en la muestra.**

En la Tabla 7.6 y Figura 7.20 se observa que la velocidad máxima de reacción es inversamente proporcional a la concentración de imidazol presente en la muestra. La dependencia es lineal, con una pendiente negativa con un valor de  $1.3525 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1} \text{ mM H}_2\text{O}_2/\text{mM imidazol}$ .

Estos resultados corroboran la suposición de Chaga y col. [166] que sugiere que existe algún tipo de interacción entre el imidazol y la Catalasa.

Aunque parece que la presencia de imidazol actúa como inhibidor en la reacción enzimática, los resultados obtenidos en la Tabla 7.5 demuestran que la velocidad máxima y la constante catalítica en el caso de la disolución con imidazol 0.2 M son mayores, mientras que su menor valor de la Constante de Michaelis indica que hay mayor preferencia por el sustrato en ese caso.

Por tanto, para poder demostrar que el imidazol actúa como inhibidor, es necesario determinar qué factor provoca este aumento de los parámetros cinéticos en la disolución con imidazol, respecto a la disolución fosfato 50mM sin imidazol.

Para ello, se completa el presente estudio con la influencia del resto de parámetros como pH y fuerza iónica (I) en la actividad del medio, con el fin de determinar su influencia en la actividad enzimática de la Catalasa.

### **7.2.2.3 Efecto de la fuerza iónica (I).**

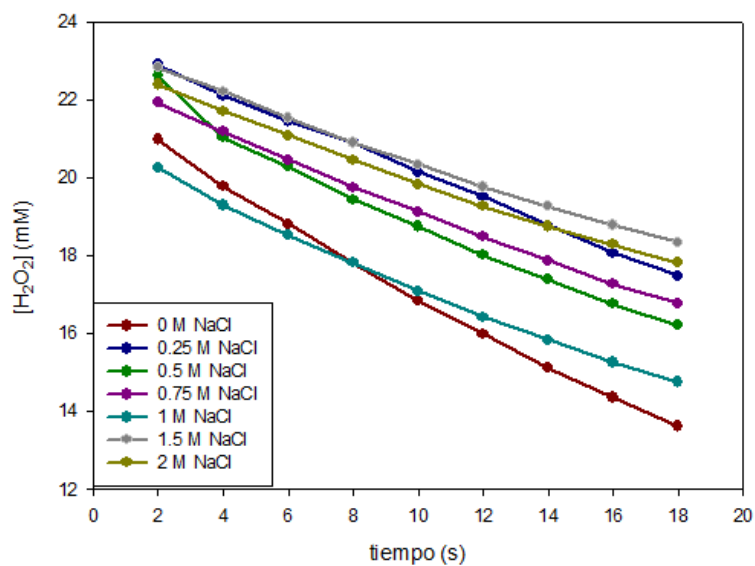
Para determinar el efecto de la fuerza iónica (I) del disolvente en la actividad enzimática de la Catalasa, se estudió la cinética de descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, manteniendo la concentración de la enzima y del sustrato constante, y variando la concentración de NaCl.

La fuerza iónica (I) de la disolución, para diferentes concentraciones de NaCl, se muestra en la Tabla 7.7.

**Tabla 7.7. Relación entre la concentración añadida de NaCl y la fuerza iónica de la muestra utilizada.**

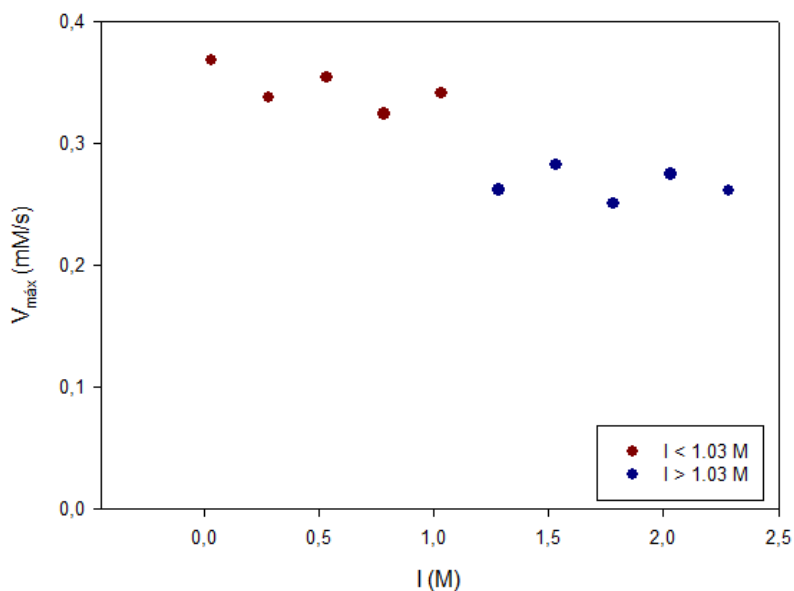
<b>NaCl (M)</b>	<b>Fuerza iónica (M)</b>
0	0.032
0.25	0.282
0.5	0.532
0.75	0.782
1	1.032
1.25	1.282
1.5	1.532
1.75	1.782
2	2.032
2.25	2.282

Los resultados obtenidos se representan en la Figura 7.21.



**Figura 7.21. Velocidad de descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  50 mM por acción de Catalasa 0.05M disuelta en tampón fosfato 50 mM pH 7.66, con diferentes concentraciones de NaCl (0 -2 M).**

En la Figura 7.22 se representan los valores obtenidos de la velocidad máxima (mM/s).



**Figura 7.22. Velocidad de reacción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  50 mM frente a la fuerza iónica presente en la muestra.**

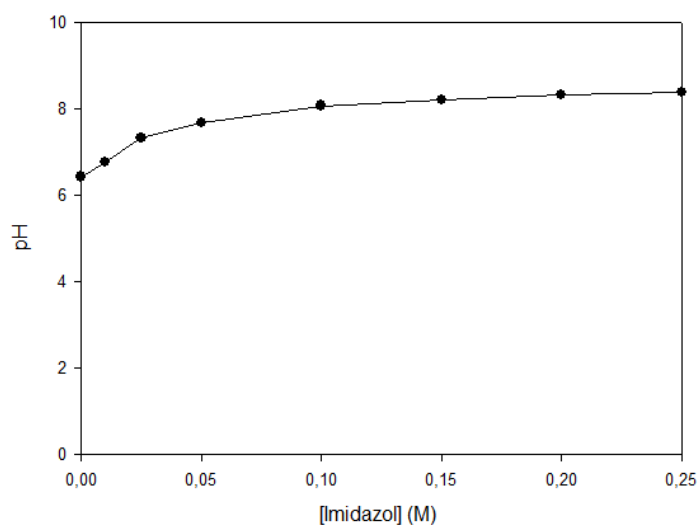


Los resultados obtenidos (Figura 7.22) ponen de manifiesto una concentración crítica de fuerza iónica ( $I=1.03M$ ), a partir de la cual la Catalasa pierde actividad de forma drástica. Esto es debido a que, a partir de dicha concentración crítica, la Catalasa podría desestabilizarse por efecto de interacciones electrostáticas como consecuencia de la fuerza iónica del medio, y su estructura podría verse modificada.

#### **7.2.2.4 Efecto del pH en la actividad enzimática de la Catalasa.**

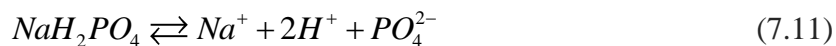
Para determinar el efecto del pH en la actividad de la Catalasa es necesario tener en cuenta algunos aspectos previos:

En primer lugar, al variar la concentración de imidazol en la disolución de tampón fosfato 50 mM 1M NaCl con Catalasa 0.05M, el pH varía como se muestra en la Figura 7.23.



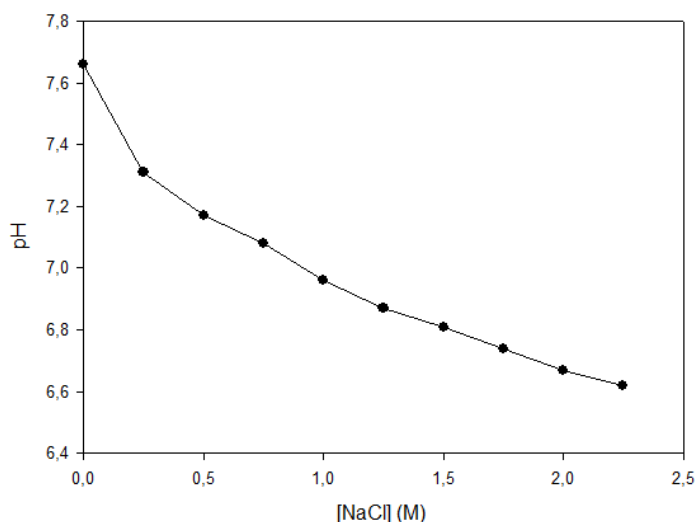
**Figura 7.23. Valor de pH para cada disolución con diferentes concentraciones de imidazol.**

Además, la presencia de otras sales como NaCl también modifica el pH, ya que al aumentar la concentración de iones, aumenta la presencia de protones en el medio según la Reacción (7.11), y el pH disminuye como consecuencia de esto.



Por este motivo, es necesario tener en cuenta la influencia de la concentración de NaCl en el pH.

Para ello, se midió el pH de diferentes disoluciones de Catalasa 0.05 M en tampón PBS 50 mM (sin NaCl ni KCl) con diferentes concentraciones de NaCl para estudiar si hay una relación entre el pH y la actividad (Figura 7.24).



**Figura 7.24. Valor de pH para diferentes disoluciones de Catalasa 0.05 M en tampón PBS 50 mM (sin NaCl ni KCl), con diferentes concentraciones de NaCl.**

Una vez determinada la influencia entre la concentración de NaCl y el pH, se midió la velocidad de descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mM en una disolución de Catalasa 0.05 M disuelta en tampón fosfato 50 mM 1M NaCl, con diferentes valores de pH.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7.25 y Figura 7.26.

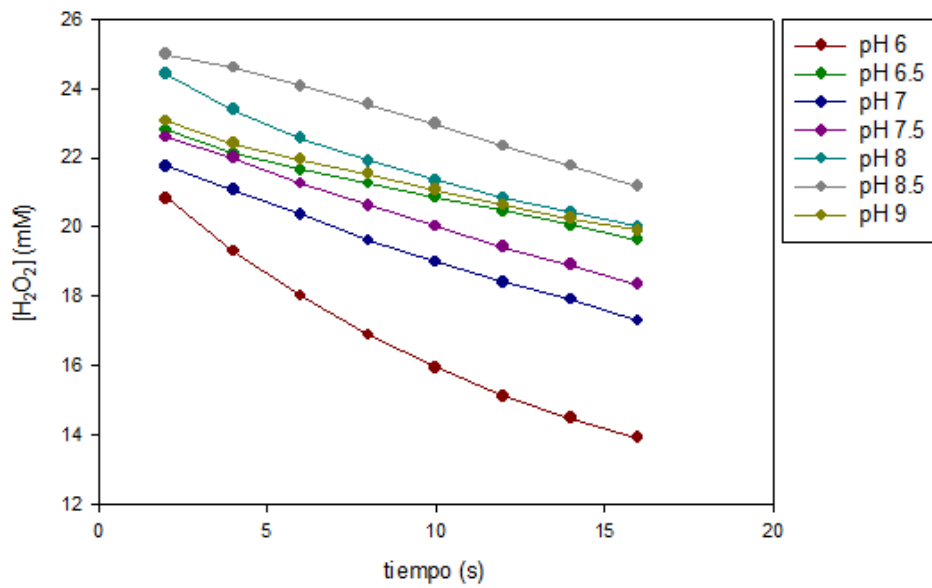


Figura 7.25. Velocidad de descomposición de  $H_2O_2$  50 mM por acción de Catalasa 0.05 M disuelta en tampón fosfato 50 mM 1M NaCl, con diferente pH.

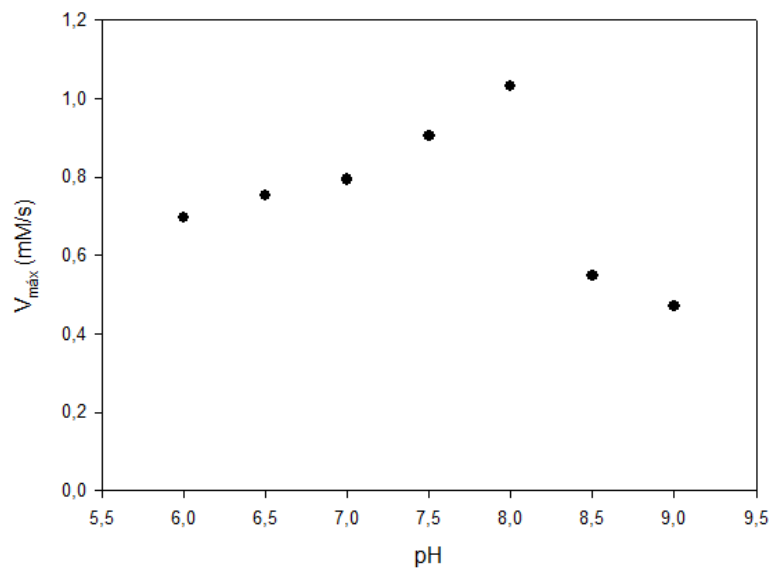


Figura 7.26. Velocidad máxima enzimática de descomposición de  $H_2O_2$  50 mM por acción de Catalasa 0.05M disuelta en tampón fosfato 50 mM 1M NaCl, con diferente pH.

Los resultados obtenidos están en concordancia con los obtenidos para otras Catalasas, donde se observa un máximo de actividad con valores de pH entre 7 y 8 [188, 195, 203].

Por tanto, se puede concluir que la presencia de imidazol 0.2M disminuye la actividad de la Catalasa. Sin embargo, si se comparan los valores de la actividad enzimática de la disolución de Catalasa 0.05M eluida en tampón fosfato 50 mM 1 M NaCl 0.2M imidazol pH 8.1 con los de Catalasa 0.05M disuelta en tampón fosfato 50 mM 1M NaCl pH 6.5, es mayor la actividad de la primera como consecuencia del pH, ya que a pH 8 la actividad se ve mejorada.

Una vez que se ha determinado los factores que influyen en la actividad de la Catalasa, se estudiará el tipo de inhibición que produce cada uno de ellos.

#### **7.2.2.5 Inhibición según el tipo de disolución tampón empleado.**

A continuación, se comparan los resultados obtenidos de los parámetros enzimáticos con el fin de determinar el tipo de inhibición de cada disolución estudiado.

##### a) Pérdida de actividad de la Catalasa por efecto del tampón de elución:

El efecto del tampón de elución como inhibidor se evalúa comparando los resultados obtenidos para la disolución de **Catalasa 0.05 M en PBS 50 mM pH 7.4** y de **Catalasa 0.05 M en tampón fosfato 50 mM, 1M NaCl 0.2M imidazol pH 8.1**.

Comparando los valores de  $K_M$  de las disoluciones de la Catalasa en el tampón de adsorción y de elución (valores aparentes), se obtiene que el coeficiente de corrección de  $K_M$  igual a  $\alpha = 3.43$ .

Por otra parte, comparando los valores de  $V_{m\acute{a}x}$ , se obtiene  $\alpha' = 5.14$ .

Como  $\alpha \neq \alpha'$ , la inhibición que produce la disolución de elución es una **inhibición mixta**, es decir, es una mezcla entre la inhibición competitiva y acompetitiva, con diferente factor de corrección en cada una de ellas.

Además, teniendo en cuenta las Ecuaciones (7.8) y (7.9), donde las constantes de inhibición se encuentran en el denominador, se puede concluir que la disolución de elución afecta más a la enzima (E) que al complejo enzima-sustrato (ES).

b) Tipo de inhibición que produce el tampón de elución (tampón fosfato 50 mM 1M NaCl 0.2M imidazol pH 8.1):

Con el fin de determinar la inhibición que produce el efecto global (tampón de elución, imidazol, columna), se han comparado los valores de los parámetros enzimáticos de **Catalasa 0.05 M en tampón de adsorción (PBS 50 mM pH 7.4)** y de **Catalasa 0.05 M eluida, en el tampón de elución (tampón fosfato 50 mM, 1M NaCl, 0.2M imidazol pH 8.1)**.

Comparando los valores de  $K_M$ , se obtiene que el coeficiente de corrección,  $\alpha = 6.59$ .

Por otra parte, comparando los valores de  $V_{m\acute{a}x}$ , se obtiene que  $\alpha' = 18.94$ .

Como  $\alpha \neq \alpha'$ , la inhibición que produce el proceso global es una **inhibición mixta**, es decir, es una mezcla entre la inhibición competitiva y acompetitiva, con diferente factor de corrección en cada una de ellas.

Teniendo en cuenta que la constante de inhibición se encuentra en el denominador, se puede concluir que el proceso global afecta más a la enzima (E) que al complejo enzima-sustrato (ES).

c) Pérdida de actividad de la Catalasa por efecto de la presencia de imidazol:

El efecto de la presencia de imidazol como inhibidor se evalúa comparando los resultados obtenidos para la disolución de **Catalasa 0.05 M en tampón fosfato 50 mM, 1M NaCl, 0.2M imidazol pH 8.1** y de **Catalasa 0.05 M en tampón fosfato 50 mM, 1M NaCl pH 6.5**. Lo ideal sería que ambas disoluciones tuviesen el mismo pH, sin

embargo, al modificar el pH se modificaría la composición de la disolución, lo cual no es deseable.

Por tanto, comparando los valores de  $K_M$  de las disoluciones de la Catalasa en el tampón de elución y la Catalasa en el tampón de elución sin imidazol, se obtiene que el coeficiente de corrección de  $K_M$  con un valor de  $\alpha = 3.68$ .

Por otra parte, comparando los valores de  $V_{m\acute{a}x}$ , se obtiene que  $\alpha' = 1.92$ .

Como  $\alpha \neq \alpha'$ , la inhibición que produce el imidazol es una **inhibición mixta**, es decir, es una mezcla entre la inhibición competitiva y acompetitiva, con diferente factor de corrección en cada una de ellas.

Además, teniendo en cuenta las Ecuaciones (7.8) y (7.9),, donde las constantes de inhibición se encuentran en el denominador, se puede concluir que la disolución de elución afecta más al complejo enzima-sustrato (ES) que a la enzima (E).

d) Pérdida de actividad de la Catalasa por efecto del proceso de adsorción-elución en la columna cromatográfica:

Con el fin de determinar el tipo de inhibición que produce exclusivamente el proceso cromatográfico, se compararon los valores de los parámetros enzimáticos para la disolución de **Catalasa 0.05 M en el tampón de elución (tampón fosfato 50 mM, 1M NaCl, 0.2M imidazol pH 8.1)** y de **Catalasa 0.05 M eluida, en el tampón de elución (tampón fosfato 50 mM, 1M NaCl, 0.2M imidazol pH 8.1)**.

Comparando los valores de  $K_M$  ambas disoluciones, se obtiene que el coeficiente de corrección,  $\alpha = 2.38$ .

Por otra parte, comparando los valores de  $V_{m\acute{a}x}$ , se obtiene que  $\alpha' = 2.51$ .

Como  $\alpha \approx \alpha'$ , la inhibición que produce la columna cromatográfica es una **inhibición no competitiva**. Por tanto, el inhibidor afecta en la misma medida al complejo ES y a la enzima libre E. Esto implica que la unión entre la enzima y el inhibidor se produce de forma que no interfiera con la formación del complejo.

Una opción sería **que el  $\text{Cu}^{2+}$  presente en la columna actúe como inhibidor**. Para comprobar esta hipótesis se realizaron pruebas de actividad de la Catalasa en presencia de diferentes concentraciones de cobre, que se muestran a continuación.

### 7.2.2.6 Estudio de la inhibición por presencia o efecto del $\text{Cu}^{2+}$ .

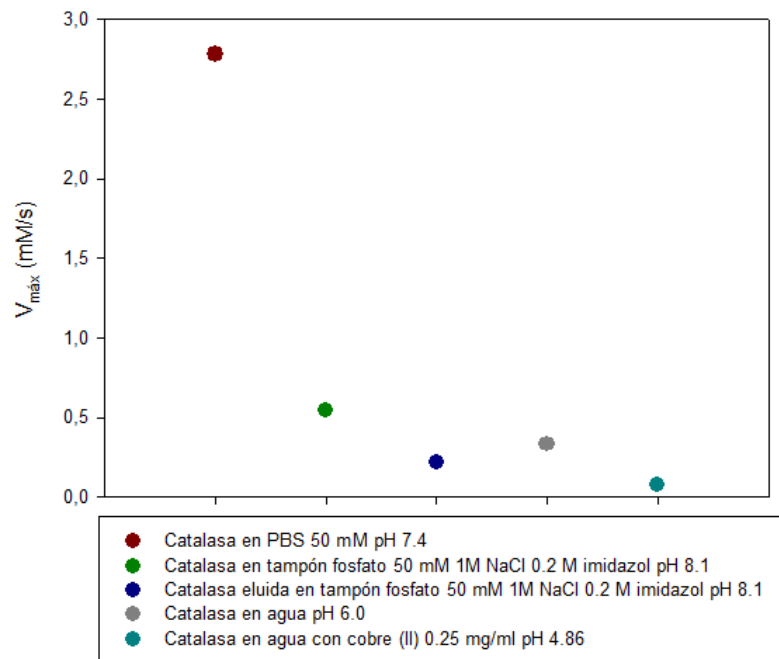
Como ya se ha mencionado previamente, la presencia de iones  $\text{Cu}^{2+}$  es un factor a tener en cuenta ya que se ha comprobado que el proceso en la columna provoca la disminución de la actividad de la Catalasa.

Por ello, se estudió la influencia de la presencia de iones  $\text{Cu}^{2+}$  en contacto con la Catalasa. Previamente se estudió la actividad de la Catalasa en agua para eliminar la influencia del disolvente, como se puede comprobar en la Tabla 7.8.

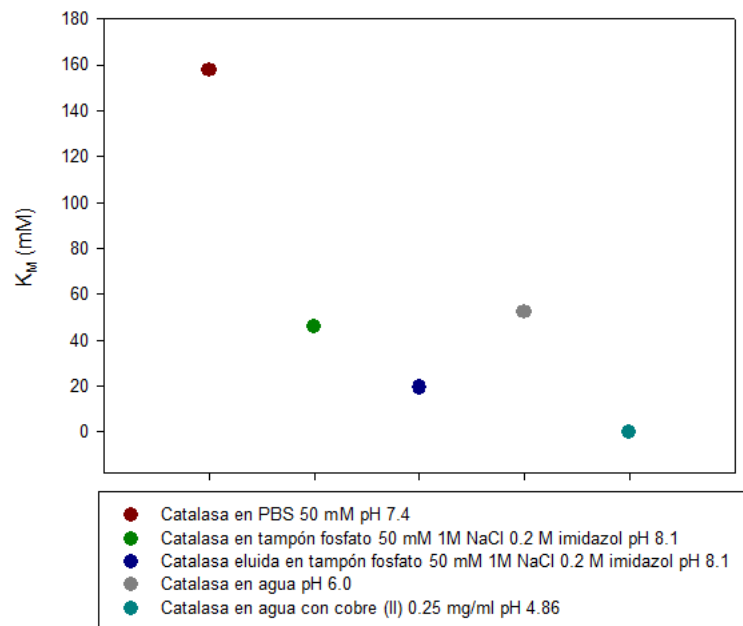
**Tabla 7.8. Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten.**

	<b>Catalasa 0.05 M en PBS 50 mM pH 7.4</b>	<b>Catalasa 0.05 M en tampón fosfato 50 mM, 1M NaCl, 0.2M imidazol pH 8.1</b>	<b>Catalasa 0.05 M eluida en tampón fosfato 50 mM, 1M NaCl, 0.2M imidazol pH 8.1</b>	<b>Catalasa 0.05 M en <math>\text{H}_2\text{O}</math> pH 6.0</b>	<b>Catalasa 0.05 M con <math>\text{Cu}^{2+}</math> 0.25 mg/mL en <math>\text{H}_2\text{O}</math> pH 4.86</b>
<b>V<sub>máx</sub> (mM/s)</b>	2.78	0.541	0.215	0.336	0.076
<b>K<sub>m</sub> (mM)</b>	157.75	46.032	19.36	52.21	0.05
<b>K<sub>cat</sub> (U/mg CAT)</b>	6672	1298	516	806.4	182.4

Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 7.27, Figura 7.28 y Figura 7.29:

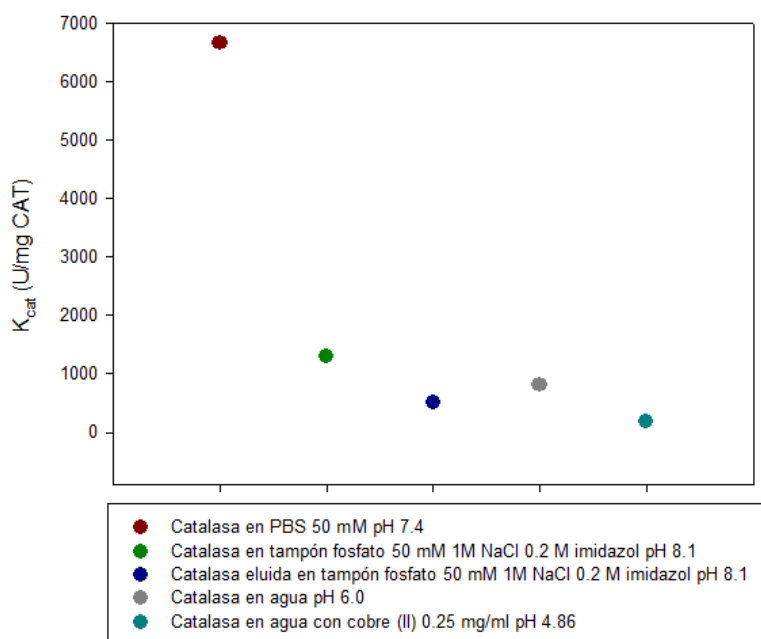


**Figura 7.27. Velocidad máxima de la reacción catalítica de la Catalasa en diferentes disoluciones.**



**Figura 7.28. Constante de Michaelis-Menten de la reacción catalítica de la Catalasa en diferentes disoluciones.**





**Figura 7.29. Constante catalítica de la reacción catalítica de la Catalasa en diferentes disoluciones.**

Teniendo en cuenta los resultados de recogidos en la Tabla 7.8, se puede concluir que la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  elimina de forma drástica la actividad de la Catalasa y presenta mayor afinidad por el sustrato (menor valor de  $K_M$ ).

a) Tipo de inhibición que produce el  $\text{H}_2\text{O}$  como disolvente (pH 6.0):

Con el fin de poder determinar la pérdida de la actividad de Catalasa por presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  en agua, en primer lugar se determina su actividad en la misma disolución, sin  $\text{Cu}^{2+}$ .

Comparando los valores de  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  para las disoluciones de **Catalasa 0.05 M en tampón de adsorción (PBS 50 mM pH 7.4)** y **Catalasa 0.05 M en  $\text{H}_2\text{O}$  pH 6.0**, recogidos en la Tabla 7.8 se obtiene que  $\alpha = 3.02$  y  $\alpha' = 8.27$ .

Como  $\alpha \neq \alpha'$ , la inhibición que produce el imidazol es una **inhibición mixta**, es decir, es una mezcla entre la inhibición competitiva y acompetitiva, con diferente factor de corrección en cada una de ellas.

Además, teniendo en cuenta las Ecuaciones (7.8) y (7.9),, donde las constantes de inhibición se encuentran en el denominador, se puede concluir que la disolución de elución afecta más al complejo enzima-sustrato (ES) que a la enzima (E).

b) Tipo de inhibición que produce la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  en agua (0.25 mg/mL  $\text{CuCl}_2$  en agua, pH 4.86):

Una vez determinada la pérdida de la actividad de Catalasa por estar disuelta en agua, se determina la pérdida de actividad de la enzima por presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  por comparación.

Comparando los valores de  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  para las disoluciones de **Catalasa 0.05 M en  $\text{H}_2\text{O}$  pH 6.0** y **Catalasa 0.05 M con 0.25 mg/mL  $\text{CuCl}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  pH 4.86** (a un menor pH el  $\text{Cu}^{2+}$  precipita), se obtiene que  $\alpha = 1044.2$  y  $\alpha' = 4.42$ .

Como  $\alpha \neq \alpha'$ , la inhibición que produce el imidazol es una **inhibición mixta**, es decir, es una mezcla entre la inhibición competitiva y acompetitiva, con diferente factor de corrección en cada una de ellas.

Además, teniendo en cuenta las Ecuaciones (7.8) y (7.9), donde las constantes de inhibición se encuentran en el denominador, se puede concluir que la disolución de elución afecta más a la enzima (E) que al complejo enzima-sustrato (ES).

Esto indica que la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  afecta a la enzima y actúa como inhibidor mixto, predominantemente competitivo.

Sin embargo, este resultado también podría deberse al pH utilizado para dichos experimentos: menor a 5.5, ya que si es superior el cobre precipita en forma de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .

### **7.2.2.7 Estudio de la actividad de la catalasa en NaSCN.**

Tras comprobar que la catalasa pierde actividad al ser eluida con imidazol, se decidió comparar con el otro disolvente utilizado habitualmente en la elución de la catalasa: NaSCN [160, 187, 188, 194, 196].

No fue posible determinar de forma cuantitativa la actividad, ya que a 240 nm presenta un pico de absorbancia de valor 3 y la medida es muy inestable.

Se han probado otros métodos como la determinación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante reacción de oxidación-reducción con KMnO<sub>4</sub> [204], pero en presencia de catalasa los resultados no son útiles ya que se produce un enmascaramiento de la medida.

Además, se ha observado de forma cualitativa que la presencia de SCN<sup>-</sup> a altas concentraciones (necesarias para la elución completa de la enzima) la actividad de la Catalasa es prácticamente nula. Para ello, se observó que, al adicionar concentraciones altas de sustrato no se produce reacción, la cual se observa fácilmente por la formación de burbujas.

Esto se debe a que el CN<sup>-</sup> envenena la Catalasa, ya que interacciona con el grupo Hemo y actúa como inhibidor irreversible cuando la concentración de sustrato es alta por su gran afinidad por los iones metálicos [177-179].

Como conclusión, no es recomendable utilizar este compuesto como agente eluyente.

## **7.3 TRANSFERENCIA DE IONES METÁLICOS (*METAL ION TRANSFER* ó MIT).**

La transferencia de iones metálicos o *Metal Ion Transfer* (MIT) es un fenómeno que consiste en el movimiento de los metales que se encuentran fijados (en la columna o en la metaloenzima) hacia otra estructura en el proceso de adsorción [13, 18, 88].

Esta transferencia de metales puede clasificarse en varios tipos:

- El metal pasa de la columna a la enzima: se produce cuando una proteína presenta una afinidad por el ion metálico inmovilizado mucho mayor que la que presenta el agente quelante. Como consecuencia, el metal se transfiere desde la matriz hasta la proteína. Este tipo de transferencia es utilizada, sobre todo, en convertir apoproteínas en metaloproteínas [13, 18, 88].
- El metal pasa de la enzima a la columna: También puede ocurrir el caso contrario: que el agente quelante no tenga ion y el agente quelante sea capaz de retirar el metal que contiene la metaloproteína, transformándola en una apoproteína [13, 18, 88].

Debido a estos mecanismos, podría pensarse en la unión de ambos en uno solo: el intercambio entre el metal inmovilizado por el agente quelante y el metal en la estructura de la metaloproteína.

### **7.3.1 Hipótesis que justifica la pérdida de la actividad de la Catalasa por Transferencia de Ion Metálico.**

Teniendo en cuenta el fenómeno de Transferencia de Ion Metálico, es probable que la actividad de la Catalasa se vea disminuida como consecuencia de un intercambio entre el  $\text{Cu}^{2+}$  fijado en la columna y el  $\text{Fe}^{3+}$  presente en el grupo Hemo de la Catalasa.

De esta forma, al interactuar, se intercambiarían electrones, pero también los propios metales, lo que originaría la modificación de la estructura de la Catalasa. Es de esperar que, al intercambiar dichos metales, el grupo Hemo se vea afectado, con lo que la estructura cuaternaria de la Catalasa se vería modificada.

Para que esta hipótesis sea válida, deben cumplirse varios requisitos:

- Que la presencia de iones de  $\text{Cu}^{2+}$  libres disminuya la actividad de la Catalasa.
- Que la Catalasa recuperada después de la elución presente una estructura diferente, es decir, que sea evidente la ruptura del grupo Hemo.

- Que los procesos IMAC donde se ha utilizado  $\text{Fe}^{2+}$  ó  $\text{Fe}^{3+}$  como ion inmovilizado presenten mejor actividad.

El primer caso, en el que la presencia de cobre en disolución hace disminuir la actividad de la Catalasa se confirma con los estudios de actividad que se han realizado en el presente capítulo.

Para ver si la estructura de la Catalasa sigue manteniéndose constante antes y después del proceso cromatográfico, se realizó un Wester-Blott para determinar el tamaño inicial y final de la molécula de enzima.

El método empleado fue el de Mahmood y Yang [205], y se resume a continuación:

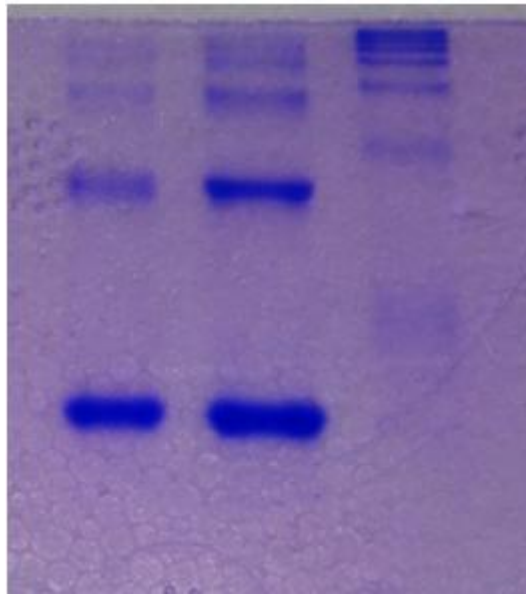
1. Preparación de disoluciones:

- Tampón de carga (sin SDS ya que no se quiere desnaturizar la enzima):
  - Tampón Laemmli 2X.
  - 2-Mercaptoetanol 10% w/v.
  - Glicerol 20% w/v.
  - Bromofenol Blue 0.004 g
  - Tris-HCl 0.125M.
  - Ajustar a pH 8.6.
- Tampón del *stacking gel* 10% (sin SDS ya que no se quiere desnaturizar la enzima):
  - Agua doblemente destilada (3 mL).
  - Tris-HCl 1 M pH 8.9 (2.1 mL).
  - Bisacrilamida 30% w/v (2.8 mL).
  - Persulfato de amonio (APS) 10 % w/v (56  $\mu\text{L}$ ).
  - Tetrametiletilendiamina (TEMED) (6  $\mu\text{L}$ ).

- Tampón de gel de separación 6% (sin SDS ya que no se quiere desnaturalizar la enzima):
    - Agua doblemente destilada (2 mL).
    - Tris-HCl 1 M pH 6.7 (400  $\mu$ L).
    - Bisacrilamida 30% w/v (600  $\mu$ L).
    - Persulfato de amonio (APS) 10 % w/v (24  $\mu$ L).
    - Tetrametiletilendiamina (TEMED) (4  $\mu$ L).
  
  - Tampón de electroforesis 10X (*running buffer*) (sin SDS ya que no se quiere desnaturalizar la enzima):
    - Tris (base) 25 mM (30.2 g).
    - Glicina 190 mM (144.0 g).
    - Agua doblemente destilada hasta completar 1L.
  
  - Solución de tinción:
    - Azul Comassie G-250 0.01% en Metanol 50% w/v.
    - Ácido acético 10% w/v.
  
  - Solución de destinción I :
    - Metanol 50% w/v.
    - Ácido acético 10% w/v.
  
  - Solución de destinción II :
    - Metanol 5% w/v.
    - Ácido acético 7% w/v.
2. Preparación de muestras:
- Añadir 7  $\mu$ L de muestra 1  $\mu$ g/ $\mu$ L y añadir 8  $\mu$ l de tampón de carga.
  - Mezclar bien.

3. Preparación del gel concentrador (*stacking gel*):
  - Preparar la disolución de *stacking gel* como se indicó previamente.
  - Verter el gel entre los cristales y nivelarlo con H<sub>2</sub>O que será retirada una vez que el gel polimerice.
  
4. Preparación del gel separador (*separating gel*):
  - Preparar la disolución de *separating gel* como se indicó previamente.
  - Colocar el peine y verter el gel, dejando que polimerice y solidifique.
  
5. Retirar el peine y añadir la muestra en cada pocillo.
  
6. Electroforesis.
  - Colocar el montaje dentro de la cubeta de electroforesis y rellenar con tampón de electroforesis (*running buffer*), asegurando que el tampón cubre completamente el gel.
  - Realizar la electroforesis a bajo voltaje (60 V) para el *separating gel* y a un voltaje mayor (140 V) para el *stacking gel*.
  
7. Revelado.
  - Poner en contacto el gel con la disolución de tinción en un agitador de bandeja durante 2h.
  - Cambiar la disolución de tinción por la disolución de destinción I durante 30 min. Después se introduce el gel en la disolución de destinción II hasta que el gel tenga la apariencia deseada.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:



**Figura 7.30. Resultado del Western-Blott realizado con diferentes disoluciones de Catalasa. De izquierda a derecha: a) Catalasa desnaturalizada en tampón de adsorción, b) Catalasa eluida en el tampón de elución, c) Catalasa en el tampón de adsorción.**

En la Figura 7.30 se observa que, tanto para la Catalasa desnaturalizada como para la Catalasa eluida, se forman 4 bandas, lo que hace pensar que cada banda corresponde a una subunidad (a moléculas con 1, 2, 3 y 4 subunidades).

Para comprobar esta hipótesis se tiene en cuenta la expresión que relaciona el peso molecular de cada fracción de proteína presente en la disolución (Ecuación (7.12)):

$$\text{Log}(P_M) = K \cdot R_f \quad (7.12)$$

Siendo:

$P_M$  : Peso molecular de la Catalasa [=] Da

$K$  : Constante de proporcionalidad [=] adimensional.

$R_f$  : Movilidad relativa, que se define como la distancia recorrida entre la distancia total del gel [=] adimensional.



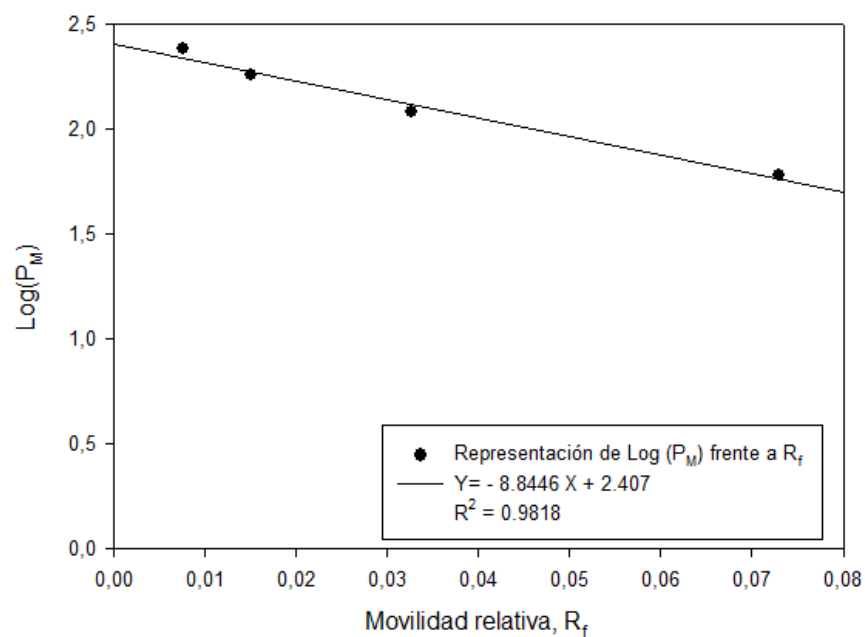
Para comprobar si estas 4 bandas corresponden a moléculas con diferente número de subunidades, se representa la Ecuación ((7.12)).

Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 7.9.

**Tabla 7.9. Resumen de los datos obtenidos del Western-Blott.**

$P_M$ (kDa)	$Log(P_M)$	$R_f$
240	2.38	0.008 cm / 6.3 cm
180	2.26	0.015 cm / 6.3 cm
120	2.08	0.033 cm / 6.3 cm
60	1.78	0.073 cm / 6.3 cm

Representando los datos de la Tabla 7.9, se obtiene la Figura 7.31.



**Figura 7.31. Representación de  $Log(P_M)$  frente a  $R_f$ , suponiendo que las cuatro bandas corresponden a moléculas compuestas por 1, 2, 3 y 4 subunidades de Catalasa.**

A partir de estos resultados se puede comprobar que la suposición de que cada banda corresponde a un tipo de molécula de Catalasa formado por 1, 2, 3 o 4 subunidades es cierta, ya que ajustando los pesos moleculares con la movilidad relativa, los datos presentan una tendencia lineal.

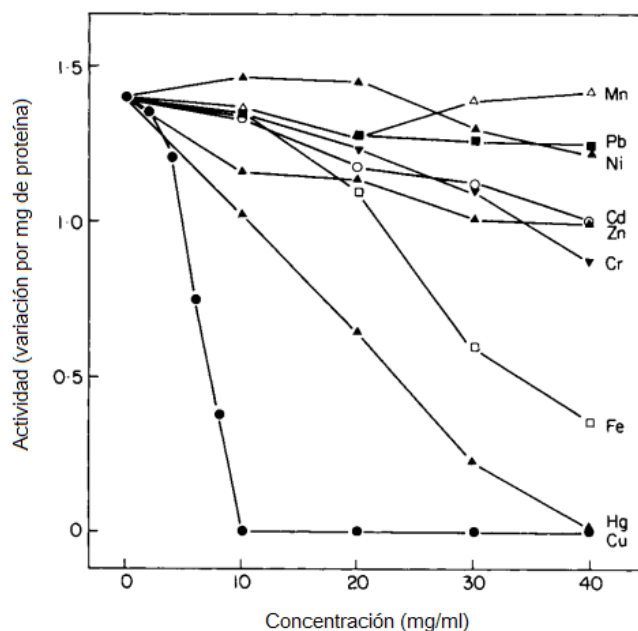
Por tanto, para el caso de la catalasa desnaturalizada se observa que prácticamente toda se encuentra en forma de subunidades, con un  $P_M$  de 60 kDa, mientras que para la catalasa eluida se observan claramente las 4 bandas.

Como consecuencia, se puede pensar que en la columna cromatográfica lo que sucede es que se produce una separación de sus subunidades, producida como consecuencia del intercambio de iones metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$  -  $\text{Fe}^{3+}$ ), lo que origina que el grupo Hemo de la Catalasa se vea afectado y que la estructura cuaternaria de la enzima sea modificada.

Además, sería de esperar que este tipo de purificación utilizando  $\text{Cu}^{2+}$  como ion metálico inmovilizado no sea adecuado, y se deba utilizar  $\text{Fe}^{3+}$  como ligando, ya que evitará la ruptura de la estructura de la enzima. Este hecho se puede corroborar teniendo en cuenta bibliografía, donde la pérdida de actividad de la Catalasa cuando se utiliza  $\text{Fe}^{3+}$  como ion inmovilizado es del 30% [191], lo que demuestra que la enzima no ha sufrido grandes daños estructurales.

Sin embargo, se realizaron ciclos de adsorción-elución de Catalasa utilizando  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  como ligando, y se realizó una prueba de dicroísmo circular, demostrándose que la estructura de la Catalasa se ve modificada, y su estructura también se separa en subunidades al utilizar estos iones como ligandos, lo que sugiere que la presencia de otros iones metálicos influye de forma negativa en la estabilidad de la enzima, como sugieren algunos estudios [206].

Estos resultados son coherentes con los obtenidos por Sing y Sivalingam para la Catalasa de la especie de pez *Sarotherodon mossambicus* [206], donde se demuestra que la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  disminuye en gran medida la actividad de la Catalasa, mientras que la presencia de hierro hace que sea menor dependiendo de la concentración de iones metálicos presentes (Figura 7.32).



**Figura 7.32. Disminución de la actividad de la Catalasa de *Sarotherodon mossambicus* con la concentración de iones metálicos [206].**

Por tanto, es de esperar que la utilización de  $\text{Cu}^{2+}$  como ligando en el proceso cromatográfico disminuya considerablemente la estabilidad del grupo Hemo de la enzima, y genere la división en moléculas con diferente número de subunidades, como muestra el Western-Blott.

Sin embargo, debería estudiarse el efecto de la concentración de  $\text{Fe}^{3+}$  u otros metales con el fin de determinar si es recomendable la utilización de la cromatografía IMAC para la purificación Catalasa que pueda ser utilizada posteriormente.

## 7.4 CONCLUSIONES.

De los experimentos realizados y resultados obtenidos en el presente capítulo se puede concluir:

- La Catalasa presenta una pérdida de actividad tras el proceso cromatográfico, que viene dada por varios efectos:

- El pH, que presenta un máximo a pH 8.
  - La fuerza iónica: para valores de fuerza iónica superiores a  $I=1.03$  (NaCl=1M) la actividad disminuye.
  - La presencia de imidazol: cuanto mayor es la cantidad de imidazol, mayor es la disminución de la actividad de la Catalasa.
  - El efecto del proceso cromatográfico: podría ser consecuencia de la presencia del  $\text{Cu}^{2+}$  que actúa como ligando, ya que la presencia del metal es un fuerte inhibidor competitivo de la enzima.
- Cuando la Catalasa se pone en contacto con iones  $\text{Cu}^{2+}$ , se podría producir un intercambio entre el  $\text{Fe}^{3+}$  que forma parte del grupo Hemo, y el  $\text{Cu}^{2+}$ , lo que originaría que la estructura cuaternaria de la Catalasa se modificase. La Catalasa presenta una estructura con cuatro subunidades idénticas unidas por un grupo Hemo. Si este grupo Hemo se desestabiliza, es probable que la enzima se divida en sus subunidades, hecho que se ha comprobado con el Western-Blott.
  - Se realizaron experimentos de adsorción y elución de Catalasa utilizando  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  como ligando, y la Catalasa recuperada se analizó mediante dicroísmo circular. Los resultados mostraron que, en este caso, la estructura de la Catalasa tampoco se mantiene estable, lo que corrobora algunos resultados presentes en bibliografía que demuestran que la presencia de iones de hierro actúa como inhibidor de la actividad de la Catalasa [206].
  - Como consecuencia de lo mencionado previamente, **la Catalasa no es una enzima apropiada para su purificación mediante cromatografía IMAC** cuando se pretende purificar para su utilización en etapas posteriores como

enzima, ya que en la etapa de elución su estructura se ve dañada de forma importante, separándose en subunidades.

- Sin embargo, una alternativa interesante es la inmovilización de Catalasa [164], ya que mejora los parámetros de la cinética enzimática [160, 187, 188, 194-196] respecto a los valores de la enzima libre.



## **Capítulo 8.**

# **Cinética, equilibrio y transferencia de materia en el proceso de adsorción**





Tras la validación del monolito para su utilización en cromatografía IMAC para cierto tipo de biomoléculas como la BSA, se realizan los estudios necesarios para conocer con más profundidad los fenómenos que ocurren en el proceso, con el fin de obtener la información necesaria para un cambio de escala y la rentabilidad del proceso.

Para realizar el diseño o cambio de escala de un equipo de forma satisfactoria es necesario conocer las velocidades de los procesos físicos y químicos. Los principios que gobiernan las transferencias de materia y energía son frecuentemente tan importantes como los que rigen a la cinética química [207].

En las ecuaciones de conservación aparecen dos clases de términos [207]:

- Términos que se refieren a procesos físicos (velocidades de transferencia de materia y energía).
- Términos que expresan velocidades de conversión de una especie química en otra (velocidad intrínseca de reacción).

Por ello se realizó la modelización de algunos aspectos importantes como la cinética de adsorción de la BSA y la transferencia de materia de la BSA en el interior del monolito.

En el Apéndice A se explica de forma más detallada las opciones y comandos utilizados en cada sección de este capítulo realizados mediante la plataforma *gPROMS*<sup>®</sup>.

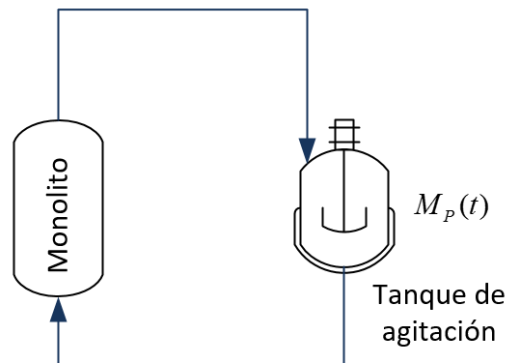
## 8.1 BALANCE DE MATERIA A CADA PUNTO DE LA INSTALACIÓN.

En primer lugar se realizó un balance de materia por unidad de tiempo a cada punto de la instalación con el fin de conocer la concentración de proteína que hay en cada punto de la instalación, en cada momento.

La instalación utilizada se muestra en la Figura 8.1, que consta de una columna cromatográfica monolítica y un vaso de precipitados continuamente agitado que se tratará como tanque de agitación.

Por tanto, la disolución de proteína se recircula, y los datos experimentales disponibles son de la concentración de proteína en sobrenadante del tanque de agitación a lo largo del tiempo,  $C_p(t)$

Como el volumen del tanque de agitación es conocido, se puede determinar la cantidad de proteína a lo largo del tiempo,  $M_p(t)$ .



**Figura 8.1. Esquema de la instalación utilizada en el balance de materia.**

Realizando un balance de materia a la cantidad de proteína por unidad de tiempo al tanque de agitación (Figura 8.2) se obtiene la Ecuación (8.1).

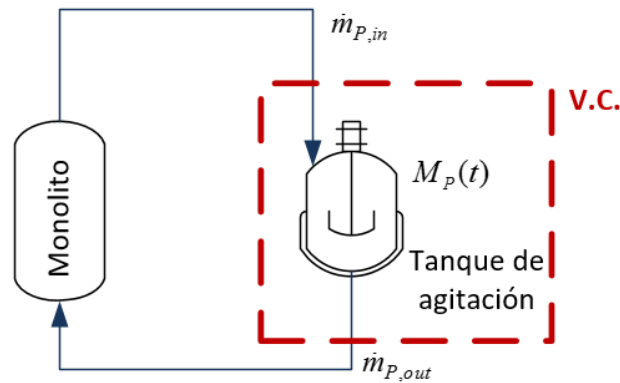


Figura 8.2. Esquema de la instalación donde se muestra el volumen de control (V.C.) al que se le aplica el balance de materia a la cantidad de proteína.

$$\left. \frac{dM_P}{dt} \right|_{V.C.} = \dot{m}_{P,out}|_{V.C.} - \dot{m}_{P,in}|_{V.C.} \pm r_P|_{V.C.} \quad (8.1)$$

En este caso el término de acumulación es negativo ya que la cantidad de materia que entra por unidad de tiempo es menor que la que sale, es decir, la cantidad de proteína disminuye a lo largo del tiempo.

Teniendo en cuenta que no se produce ninguna reacción química, no hay generación o desaparición de proteína en el volumen de control.

Por tanto, la cantidad de proteína que entra por unidad de tiempo al volumen de control es igual a la cantidad de proteína que sale por unidad de tiempo del volumen de control más la cantidad de proteína que se acumula por unidad de tiempo.

Este balance de materia se expresa en la Ecuación (8.2).

$$\frac{dM_P}{dt} = \dot{m}_{P,out} - \dot{m}_{P,in} \quad (8.2)$$

Siendo:

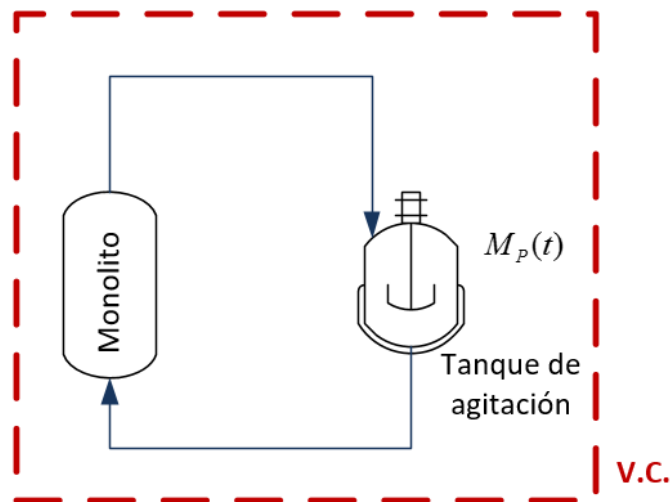
$\frac{dM_p}{dt}$  : variación de cantidad de proteína en el V.C. [=] kg/h

$\dot{m}_{P,out}$  : flujo másico de proteína en la corriente de salida del V.C. [=] kg/h

$\dot{m}_{P,in}$  : Flujo másico de proteína en la corriente de entrada al V.C. [=] kg/h

De esta forma, la variación de proteína en el volumen de control (tanque de agitación) viene dado por la variación de proteína en las corrientes de entrada y salida al tanque agitado.

Se realiza un balance de materia a toda la instalación (Figura 8.3) y, aplicando la Ecuación (8.1), en este caso se observa que no hay entrada ni salida de proteína en el volumen de control, ni se produce una generación de la misma.

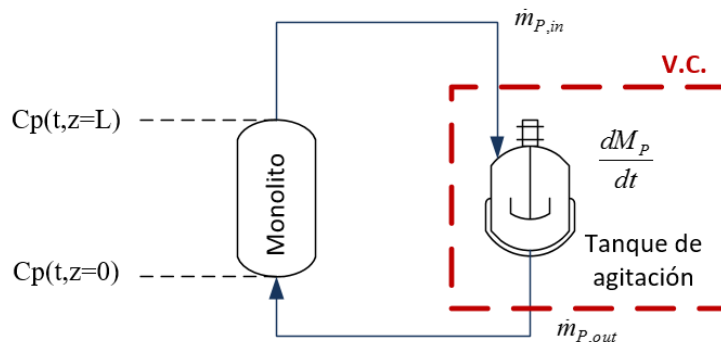


**Figura 8.3. Esquema de la instalación donde se muestra el volumen de control (V.C.) al que se le aplica el balance de materia a la cantidad de proteína.**

Como consecuencia, la variación de proteína en el tanque de agitación (término de acumulación) es consecuencia exclusivamente del proceso de adsorción de proteína que se produce en el interior del monolito.

Es decir, a medida que se produce la adsorción de la proteína en el monolito, la cantidad de proteína en el tanque de agitación disminuye. Por tanto, conociendo la cantidad de proteína en el tanque de agitación es posible determinar la cantidad adsorbida en el soporte cromatográfico.

A partir de la Ecuación (8.2) , y teniendo en cuenta la Figura 8.4, se sustituye el valor del flujo másico de entrada y de salida por los valores de los parámetros conocidos (caudal) y las variables que se quieren determinar (concentración de proteína a la entrada y salida del monolito).



**Figura 8.4. Esquema de la instalación donde se muestran las variables que intervienen en el balance de materia a la cantidad de proteína.**

Transformando el flujo másico a flujo volumétrico, a partir de la Ecuación (8.2) se obtiene la Ecuación (8.3).

$$\frac{dM_P}{dt} = \dot{m}_{P,out} - \dot{m}_{P,in} \quad (8.2)$$

$$\frac{dM_P}{dt} = Q \cdot C_p(z=L) - Q \cdot C_p(z=0) \quad (8.3)$$

Dividiendo la Ecuación (8.3) entre el volumen del tanque de agitación (considerando que todo el volumen de disolución que no se encuentra en el interior del monolito está en el tanque de agitación y despreciando las conducciones), se obtiene la Ecuación (8.4), que es igual a la Ecuación (8.5).

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{Q \cdot C_p(z=L) - Q \cdot C_p(z=0)}{V_{\text{tanque}}} \quad (8.4)$$

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{Q}{V_{\text{tanque}}} [C_p(z=L) - C_p(z=0)] \quad (8.5)$$

De esta forma, utilizando la ecuación del balance de materia (Ecuación (8.5)), la ecuación que relaciona la concentración inicial de proteína con la concentración de proteína en el tanque de agitación y la concentración adsorbida (Ecuación (8.6)) y la ecuación cinética (Ecuación (8.7)), se obtienen los valores de la concentración de proteína en cada punto de la instalación, es decir, en el tanque de agitación ( $C_p$ ), en la entrada a la columna ( $C_{P,inMon}$ ), en la salida de la columna ( $C_{P,outMon}$ ), y en la entrada al tanque de agitación ( $C_{P,inCSTR}$ ), para cada instante de tiempo.

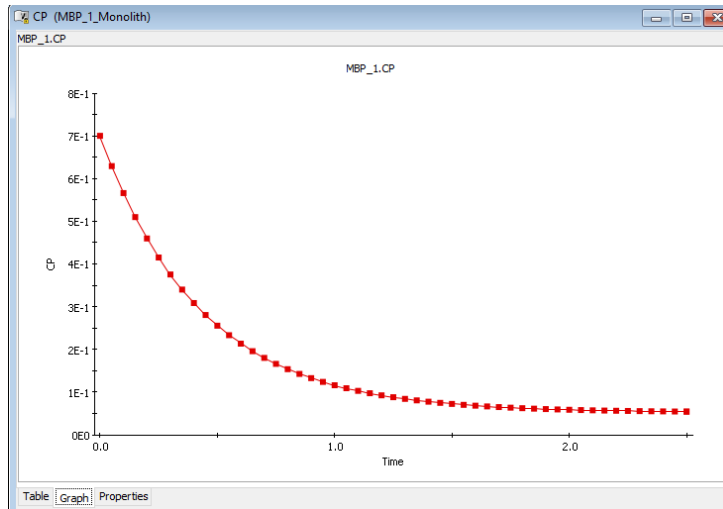
$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{Q}{V_{\text{tanque}}} [C_p(z=L) - C_p(z=0)] \quad (8.5)$$

$$C_{PL}(t) = C_{P0} - C_p(t) \quad (8.6)$$

$$\frac{dC_p}{dt} = -k'_a \cdot C_p + k_d \cdot C_{PL} \quad (8.7)$$

Además, se ha calculado la concentración de proteína que hay en el interior del monolito, a 5 alturas diferentes, a lo largo del tiempo ( $z=0, 0.5, 1.0, 1.5$  y  $2.0$ ).

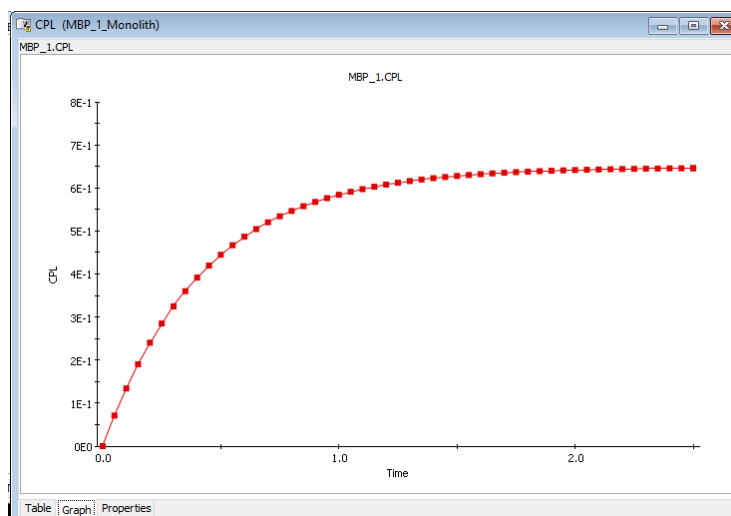
La concentración de proteína en el tanque de agitación a lo largo del tiempo se muestra en la Figura 8.5:



**Figura 8.5. Concentración de proteína (mg/mL) en el tanque de agitación a lo largo del tiempo (h).**

En ella se observa la disminución de la concentración de proteína hasta que el sistema alcanza el equilibrio.

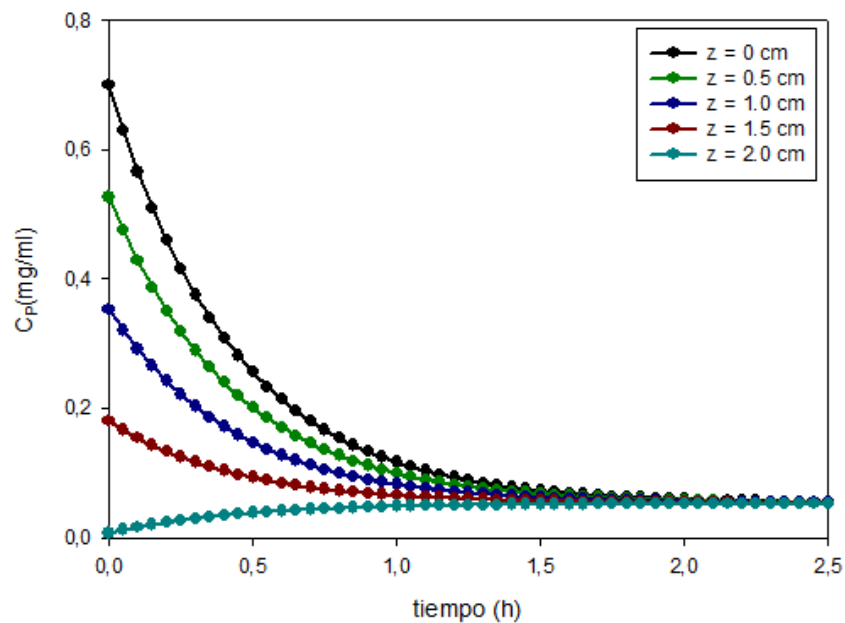
Por otra parte, la concentración de proteína adsorbida a lo largo del tiempo se muestra en la Figura 8.6:



**Figura 8.6. Concentración de proteína adsorbida en el monolito (mg/mL) a lo largo del tiempo (h).**

La concentración de proteína que se adsorbe en el monolito va aumentando hasta alcanzar el equilibrio del sistema.

Sin embargo, la concentración de proteína varía a lo largo del monolito. Considerando que la variación de concentración en el interior del monolito es lineal, se obtienen los siguientes valores de concentración de proteína en el interior del monolito (Figura 8.7).



**Figura 8.7. Representación de la concentración de proteína (mg/mL) a diferentes alturas del monolito (cm) a lo largo del proceso de adsorción en el monolito.**

En la (Figura 8.7) se observa que en los primeros instantes, la concentración a la entrada del monolito ( $z = 0$  cm) es igual a la concentración inicial de proteína, mientras que para la salida del monolito ( $z = 2,0$  cm) tiene el valor 0, lo que indica que el monolito adsorbe toda la proteína que pasa a través de él.

Poco a poco, la disolución que entra al interior del monolito va disminuyendo su carga de proteína, y la cantidad de la misma que sale va aumentando, hasta que se igualan cuando se ha alcanzado el equilibrio del sistema.



Una vez que se ha determinado la concentración de proteína en cada punto de la instalación para cada momento se procede explicar el proceso de adsorción y estudiar los parámetros de las etapas que intervienen en él.

## **8.2 ETAPAS DEL PROCESO DE ADSORCIÓN DE LA BSA EN EL MONOLITO.**

Para conocer los fenómenos que intervienen en el proceso de adsorción, en primer lugar es necesario conocer las etapas en las que se divide dicho proceso, las cuáles se resumen a continuación [207]:

1. Transporte de los adsorbatos del fluido global a la interfase fluido-sólido (superficie externa de la partícula catalizadora): **transferencia de materia externa.**
2. Transporte de los adsorbatos en el interior de la partícula o soporte (si es porosa): **transferencia de materia interna.**
3. Adsorción de los adsorbatos en la superficie o los centros activos de la partícula o soporte: **proceso intrínseco de adsorción.**

Una vez definidas las etapas del proceso de adsorción, a continuación se calculará la influencia de cada una de estas etapas, con el fin de conocer la etapa limitante del proceso global, y obtener así la información necesaria para el escalado.

Para ello, en primer lugar se determinan los parámetros cinéticos y de equilibrio.

### 8.3 ESTUDIO CINÉTICO Y DE EQUILIBRIO DE ADSORCIÓN DE LA BSA.

Para poder determinar las constantes cinéticas y de equilibrio es necesario definir previamente el proceso que se produce: la adsorción de BSA en un monolito de agarosa superporosa funcionalizado con IDA y con  $\text{Cu}^{2+}$  inmovilizado que actúa como ligando.

Este proceso de adsorción viene determinado por el equilibrio que se alcanza entre la proteína, (P), el ligando o  $\text{Cu}^{2+}$ , (L), y el complejo proteína-ligando, (PL), que se muestra en la Reacción (8.8):



Donde  $K_{eq}$  es la constante del equilibrio de adsorción y se define en la Ecuación (8.9).

$$K_{eq} = \frac{C_{PL}}{C_P C_L} \quad (8.9)$$

Siendo:

$C_P$ : Concentración de proteína libre [=]  $\text{mol}/\text{cm}^3$

$C_L$ : Concentración de ligando [=]  $\text{mol}/\text{cm}^3$

$C_{PL}$ : Concentración de proteína adsorbida [=]  $\text{mol}/\text{cm}^3$

De esta forma, la constante del equilibrio de adsorción,  $K_{eq}$ , tiene unidades de  $(\text{mol}/\text{cm}^3)^{-1}$ .

Sin embargo, como se explicó en los capítulos anteriores, la concentración de ligando está en exceso con respecto a la cantidad de proteína presente en la disolución.

De esta forma, el equilibrio de adsorción se puede expresar como se indica en la Reacción (8.10).



Como la única especie que interviene en este equilibrio es la proteína se decidió, por facilidades de cálculo, que la concentración de la misma en disolución ( $C_p$ ), concentración inicial ( $C_{p0}$ ) o concentración de proteína adsorbida ( $C_{PL}$ ) sean expresadas en unidades de  $\text{mg}/\text{cm}^3$ .

Con lo que, la constante de equilibrio se transforma en una pseudoconstante del equilibrio de adsorción,  $K'_{eq}$ , que se define en la Ecuación (8.11).

$$K'_{eq} = \frac{k'_a}{k'_d} = \frac{C_{PL}}{C_P} \quad (8.11)$$

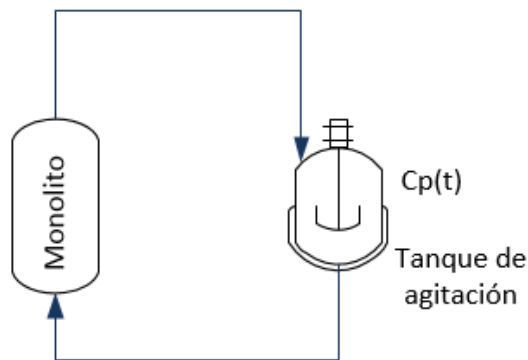
Siendo:

$$K'_{eq} = K_{eq} \cdot C_L \quad (8.12)$$

Por lo que esta pseudoconstante del equilibrio de adsorción,  $K'_{eq}$ , es adimensional y la constante de equilibrio,  $K_{eq}$ , tiene unidades de  $(\text{mg}/\text{cm}^3)^{-1}$ .

La instalación utilizada es la mostrada en la Figura 8.8. En ella se observa que la instalación utilizada es la misma que la descrita en el Capítulo 6 para la etapa de adsorción:

En ella, se hace circular de forma continua una disolución de 50 mL de BSA, con una concentración y caudal conocido (0.7 mg/mL y 1.5 mL/min), a través de una columna cromatográfica encamisada Pharmacia Biotech XK 16/20 que contiene el monolito de agarosa superporosa y lo mantiene a temperatura constante (23°C).



**Figura 8.8.** Esquema de la instalación utilizada, donde  $C_p$  es la concentración de proteína en el tanque de agitación a lo largo del tiempo.

La cantidad de proteína adsorbida a lo largo del tiempo se determina por diferencia entre la cantidad inicial y la cantidad medida en el sobrenadante del tanque de agitación, suponiendo que toda la proteína que no está en la disolución está adsorbida, como se indica en la Ecuación (8.6).

$$C_{PL}(t) = C_{P0} - C_P(t) \quad (8.6)$$

Siendo:

$C_{PL}(t)$ : Concentración de proteína adsorbida [=]  $\text{mg}/\text{cm}^3$

$C_{P0}$ : Concentración inicial de proteína [=]  $\text{mg}/\text{cm}^3$

$C_P(t)$ : Concentración de proteína libre (en el tanque de agitación) [=]  $\text{mg}/\text{cm}^3$

La velocidad de adsorción, o variación de concentración de proteína a lo largo del tiempo se puede considerar de orden 1 respecto a la concentración de proteína (adsorción) y de orden 1 respecto a la concentración de proteína adsorbida (desorción), y se puede expresar mediante la Ecuación (8.7).

$$\frac{dC_P}{dt} = -k'_a \cdot C_P + k_d \cdot C_{PL} \quad (8.7)$$

Definiéndose:

$$k'_a = k_a \cdot C_L \quad (8.13)$$

Siendo:

$k'_a$ : Pseudoconstante cinética de adsorción [=] h<sup>-1</sup>

$k_a$ : Constante cinética de adsorción [=] cm<sup>3</sup>/(mg·h)

$k_d$ : Constante cinética de desorción [=] h<sup>-1</sup>

$C_p$ : Concentración de proteína libre (en el tanque de agitación) [=] mg/cm<sup>3</sup>

$C_{PL}$ : Concentración de proteína adsorbida [=] mg/cm<sup>3</sup>

Cuando la temperatura y presión permanecen constantes, estas constantes cinéticas vienen relacionadas por la pseudoconstante del equilibrio de adsorción,  $K'_{eq}$  adimensional, mediante la relación:

$$K'_{eq} = \frac{k'_a}{k_d} = \frac{C_{PL}}{C_P} \quad (8.11)$$

$$K'_{eq} = K_{eq} \cdot C_L \quad (8.12)$$

En el Capítulo 6 se obtuvieron datos de la velocidad de desaparición de la BSA en el tanque de agitación a lo largo del tiempo. Sin embargo, esta velocidad de desaparición no hace referencia únicamente a la etapa de adsorción sino que es una medida de la **velocidad del proceso global**, es decir, la suma de las velocidades de la transferencia externa, la transferencia interna y el proceso de adsorción:

$$r_{global} = f(r_{transf\ externa}, r_{transf\ interna}, r_{adsorción}) \quad (8.14)$$

Por este motivo, es necesario determinar la velocidad del proceso de adsorción de forma independiente.

Según recomendaciones de Smith [207], es necesario utilizar un reactor, preferiblemente a pequeña escala, para determinar la velocidad intrínseca de forma precisa a partir de mediciones de concentración. Para ello, es necesario poder asegurar que:

- La concentración de un reactante o producto y la temperatura sean iguales en todos los puntos de la muestra reaccionante (mezcla completa).
- Las concentraciones sólo varían con la reacción (volumen constante).

Para cumplir estos requisitos se utilizaron reactores Batch con mezcla completa y manteniendo el volumen y temperatura constante para la obtención de la velocidad intrínseca de adsorción.

### **8.3.1 Estudio de la cinética de adsorción y del equilibrio de adsorción en Batch.**

Con el fin de determinar la velocidad intrínseca del proceso de adsorción sin tener en cuenta los fenómenos de transferencia de materia, se diseñaron una serie de etapas.

Como se comentó en la sección anterior, estos experimentos se realizan en un reactor Batch, manteniendo la temperatura y el volumen constantes. Sin embargo,

además de estos requisitos, es necesario tener en cuenta otros aspectos fundamentales que se detallan a continuación.

### **8.3.1.1 Diseño de experimentos.**

Para realizar el diseño de experimentos de la adsorción en Batch es necesario tener en cuenta los resultados de la adsorción de BSA en columna obtenidos en el Capítulo 6.

Por tanto, la cinética de adsorción de la BSA en un proceso Batch se realiza utilizando las siguientes condiciones:

- La disolución de proteína inicial utilizada es la misma que la empleada en los estudios de adsorción en columna, es decir, BSA 0.7 mg/ml en PBS 50 mM pH 7.4.
- El soporte se pulveriza con el fin de eliminar la etapa de difusión. El método empleado se describe en la sección 8.3.1.3.
- Para obtener la concentración a cada tiempo es necesario filtrar la disolución, por lo que cada valor de concentración se obtiene de un reactor independiente.
- La cantidad de soporte utilizado en cada reactor respeta la proporción volumen de disolución / masa de soporte empleado en los experimentos en columna.
- El tiempo máximo estimado es el mismo que en la adsorción en columna.
- El volumen y temperatura se consideran constantes. Para ello, se taparon los reactores con parafina, y se realizó el proceso en un horno calefactor con agitación orbital para mantener la temperatura constante.

Teniendo en cuenta estas premisas, a continuación se detallan algunas de las etapas previas al proceso.

### 8.3.1.2 Determinación de la estabilidad de la proteína BSA.

En primer lugar, es necesario determinar la agitación con la que se va a realizar la adsorción en Batch.

Para disminuir lo máximo posible los fenómenos de transporte por convección y difusión, es deseable que la agitación sea completa y la capa límite de la interfase sólido-líquido sea lo menor posible, por lo que es necesario trabajar con velocidades altas de agitación.

Sin embargo, las estructuras de algunas proteínas pueden desestabilizarse por la presencia de interfases gas-líquido y este efecto aumenta cuando se somete a grandes gradientes de velocidad [208, 209]. Por tanto, cuando la agitación es elevada es posible que se produzca la desnaturalización y la formación de agregados de la proteína. Por tanto, es necesario realizar unos estudios previos de estabilidad de la proteína BSA a diferentes velocidades de agitación.

Para ello, se preparó una disolución de BSA 0.7 mg/ml en PBS 50 mM pH 7.4 y se añadieron 25 ml en cada matraz Erlenmeyer. Se utiliza este tipo de recipiente ya que favorece la mezcla de la disolución que contiene.

Estas disoluciones se colocaron en un agitador orbital y se sometieron a diferentes velocidades de agitación, por pares, con el fin de evaluar la estabilidad de la proteína a diferentes velocidades de agitación.

La estabilidad de la proteína se midió de dos formas:

En primer lugar, de forma visual. Cuando una disolución de proteína forma agregados o se desnaturaliza, la disolución se vuelve turbia. Además, se corroboró la evaluación visual mediante una medida espectrofotométrica, ya que cuando la proteína forma agregados su absorbancia aumenta.



**Tabla 8.1. Resumen de las pruebas de estabilidad de la proteína a 23°C.**

<b>Velocidad de agitación orbital (rpm)</b>	<b>Estado de la proteína</b>
90	No desnaturalizada ni forma agregados
100	No desnaturalizada ni forma agregados
110	No desnaturalizada ni forma agregados
120	No desnaturalizada ni forma agregados

Los resultados se resumen en la Tabla 8.1, donde se puede observar que esta proteína no presenta problemas de estabilidad en las condiciones estudiadas. Sin embargo, para velocidades de agitación mayores a 100 rpm se observaron fenómenos de salpicaduras en el reactor y desviación de flujo ideal por formación de torbellinos.

Como consecuencia, se decidió utilizar la velocidad de agitación de 100 rpm ya que es suficientemente elevada como para considerar que se produce una mezcla perfecta sin que se produzcan los fenómenos no deseados descritos.

### **8.3.1.3 Preparación del soporte cromatográfico.**

Para poder asegurar que no haya transporte difusional en el proceso de adsorción, se pulverizó el soporte monolítico.

El proceso realizado se describe a continuación:

- Se toman varios monolitos activados (sin  $\text{Cu}^{2+}$ ) y se cortan en trozos lo más pequeños posibles.
- Se introducen en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante unas 10h para asegurar que están completamente congelados.

- Se liofiliza durante 12 h.
- La muestra obtenida, a diferencia de los que se esperaba, no se podía pulverizar. Por tanto, se añadió nitrógeno líquido y, con la ayuda de un mortero, se pulverizó la muestra.
- Se carga con  $\text{Cu}^{2+}$  poniendo en contacto el soporte pulverizado con una concentración de  $\text{CuCl}_2$  5 mg/ml durante 1h a una agitación de 100 rpm.
- Se filtra el soporte y se lava con agua desionizada, y después con disolución fosfato a pH 4.5.
- Por último, el soporte pulverizado se deja en una disolución de PBS pH 7.4 durante 12h para asegurar que su estructura se hincha hasta alcanzar el equilibrio.

Después de realizar este proceso, el soporte está preparado para su utilización en el proceso de adsorción.

#### 8.3.1.4 Proceso de adsorción en Batch.

Una vez que el soporte cromatográfico presenta su menor tamaño posible, es decir, en forma de gel formado a partir del soporte pulverizado, se realiza el proceso de adsorción en diferentes reactores Batch (matraces Erlenmeyer para obtener una mezcla completa) para cada tiempo de adsorción. Este experimento se realizó por duplicado.

El equilibrio de adsorción, definido previamente, se puede expresar como se indica en la Reacción (8.15) .



Siendo:

$C_p$ : Concentración de proteína libre [=] mg/cm<sup>3</sup>.

$C_{PL}$ : Concentración de proteína adsorbida [=] mg/cm<sup>3</sup>.

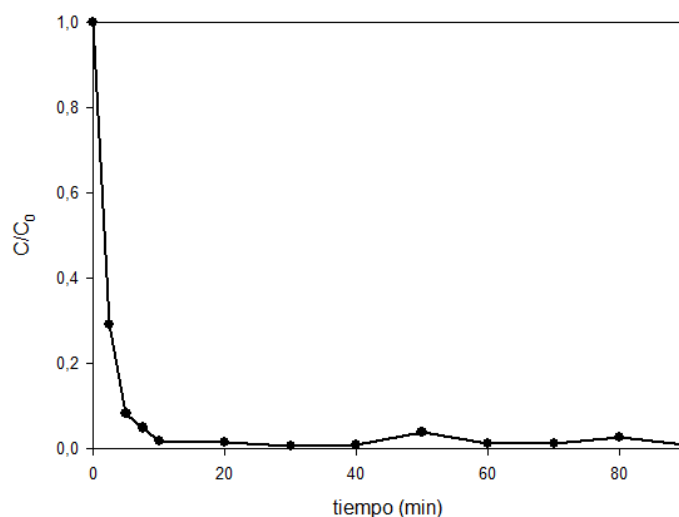
$K'_{eq,int}$ : Pseudoconstante del equilibrio de adsorción intrínseco [=] adimensional.

Suponiendo que la temperatura es constante (horno calefactor) y que la adsorción se realiza poniendo en contacto la disolución de proteína con partículas no porosas de soporte, se puede considerar que no interviene la etapa de difusión en el interior del soporte.

Además, como el matraz Erlenmeyer está agitado de forma conveniente, se puede considerar que hay mezcla perfecta sin cometer mucho error.

De esta forma, la variación de proteína con el tiempo se puede considerar una medida directa del proceso cinético.

Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 8.9.



**Figura 8.9. Cinética de adsorción en Batch.**

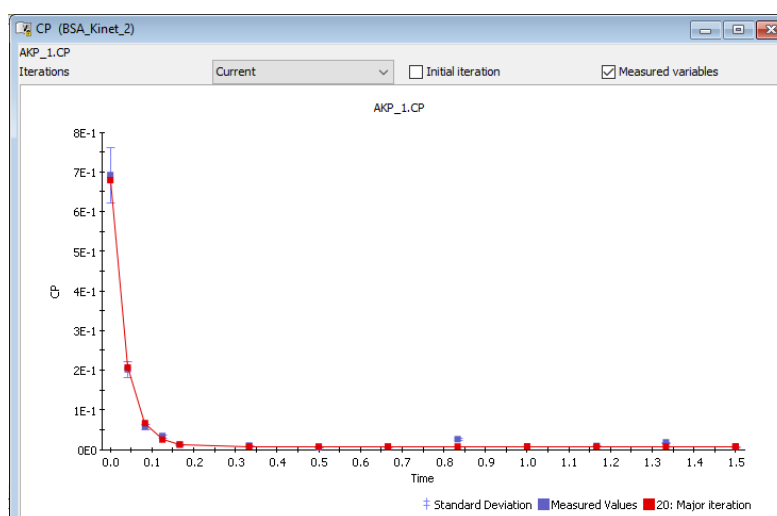
Como se puede observar en la Figura 8.9, la cinética de adsorción es muy rápida, ya que a los 10 min ya se ha alcanzado el equilibrio en el proceso de adsorción. Estos resultados son comparables a los obtenidos por otros autores [210], donde el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de adsorción de la BSA 0.6 mg/ml en un soporte funcionalizado con IDA y con  $\text{Cu}^{2+}$  inmovilizado era 3 min, pero la cantidad total adsorbida es 3 mg en total mientras que en nuestro experimento es más del doble (8.22 mg), y no es la concentración máxima que puede adsorber el material. Además, la concentración inicial de proteína así como las condiciones experimentales son diferentes.

Los valores de estas constantes cinéticas de adsorción y desorción intrínsecas ( $k'_{a,int}$  y  $k_{d,int}$ , respectivamente), así como la pseudoconstante de equilibrio intrínseca,  $K'_{eq,int}$ , se obtuvieron mediante el ajuste de los datos experimentales realizados con la herramienta de *Estimación de Parámetros* de la plataforma *gPROMS*<sup>®</sup> (Apéndice A).

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 8.2.

**Tabla 8.2. Datos de las constantes cinéticas intrínsecas y de equilibrio obtenidos mediante estimación de parámetros para el proceso en Batch (Apéndice A).**

$k'_{a,int} / \text{h}^{-1}$	28.84
$k_{d,int} / \text{h}^{-1}$	0.32
$K'_{eq,int}$	90.13



**Figura 8.10. Estimación de Parámetros de gPROMS a partir de los datos de la cinética de adsorción en Batch.**

Como se observa en la Figura 8.10, los datos experimentalmente se ajustan al modelo propuesto y a los parámetros calculados, a excepción de algunos valores de la concentración en equilibrio, que se pueden considerar errores experimentales.

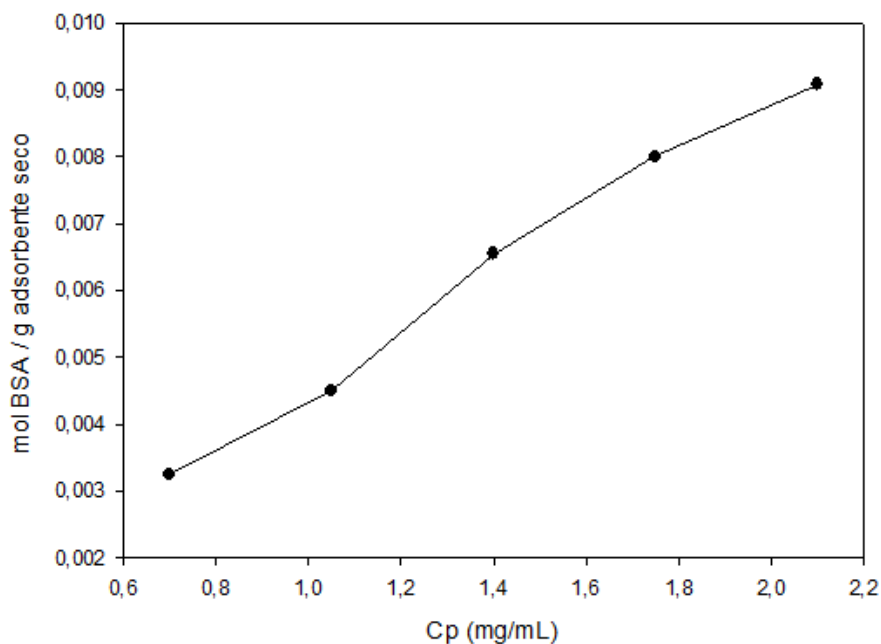
### 8.3.1.5 Isoterma de adsorción.

Con el fin de determinar la capacidad de adsorción máxima del soporte cromatográfico, así como la influencia de la concentración de la disolución de proteína empleada, se determinó la isoterma de adsorción.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 8.3 y Figura 8.11.

**Tabla 8.3. Resultados de los experimentos de adsorción para diferentes concentraciones de BSA.**

Concentración de proteína (mg/mL)	Moles de BSA adsorbidos / g adsorbente seco
2.1	$9.08 \cdot 10^{-3}$
1.75	$8.00 \cdot 10^{-3}$
1.4	$6.54 \cdot 10^{-3}$
1.05	$4.50 \cdot 10^{-3}$
0.7	$3.24 \cdot 10^{-3}$



**Figura 8.11. Isoterma de adsorción de la BSA para diferentes concentraciones de proteína.**

Por tanto, se puede concluir que las disoluciones empleadas son disoluciones diluidas y las condiciones experimentales se encuentran en la zona lineal de Langmuir.

### 8.3.2 Estudio de la cinética de adsorción en el monolito.

Una vez determinadas las constantes cinéticas y de equilibrio intrínsecas, se evalúan las constantes obtenidas en el proceso de adsorción con el monolito como soporte.

Los valores de estas constantes cinéticas de adsorción y desorción ( $k'_{a,global}$  y  $k'_{d,global}$ , respectivamente), así como la pseudoconstante de equilibrio,  $K'_{eq,global}$ , se obtuvieron mediante el ajuste de los datos experimentales realizados con la herramienta de *Estimación de Parámetros* de la plataforma *gPROMS*<sup>®</sup> (Apéndice A).

Para ello, se introducen los datos de la concentración de proteína a lo largo del tiempo en el tanque de agitación ( $C_p$ ), para un total de 5 reutilizaciones del mismo monolito (n=1, 5, 10, 15 y 20), y se calcularon los valores de las constantes de velocidad de adsorción y desorción.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 8.4.

**Tabla 8.4. Datos de las constantes cinéticas y de equilibrio obtenidos mediante estimación de parámetros para el proceso en columna monolítica (Apéndice A).**

Ciclo	n=1	n=5	n=10	n=15	n=20	Media	Desv. estándar
$k'_{a,global} / h^{-1}$	2.354	2.006	2.076	2.020	2.275	2.146	0.158
$k'_{d,global} / h^{-1}$	0.168	0.191	0.142	0.137	0.226	0.173	0.037
$K'_{eq,global}$	14.031	10.481	14.661	14.757	10.070	12.800	2.326

Estos resultados ponen de manifiesto que el equilibrio de adsorción de la BSA en el monolito está desplazado hacia la derecha, es decir, que predomina el proceso de adsorción, ya que el proceso de adsorción tiene casi 13 veces mayor velocidad que el de desorción.

Esto se debe a que el proceso es, en realidad, una quimisorción. En ella se produce una interacción química entre la proteína y el  $\text{Cu}^{2+}$  inmovilizado en la columna cromatográfica en forma de complejo de coordinación. Como consecuencia, es necesario introducir un agente competitivo para recuperar la proteína.

### 8.3.3 Comparación entre ambos soportes.

Después de evaluar de forma independiente la velocidad intrínseca de adsorción mediante un proceso Batch y la velocidad de adsorción del proceso global mediante la adsorción en columna, se realiza la comparación entre ambos.

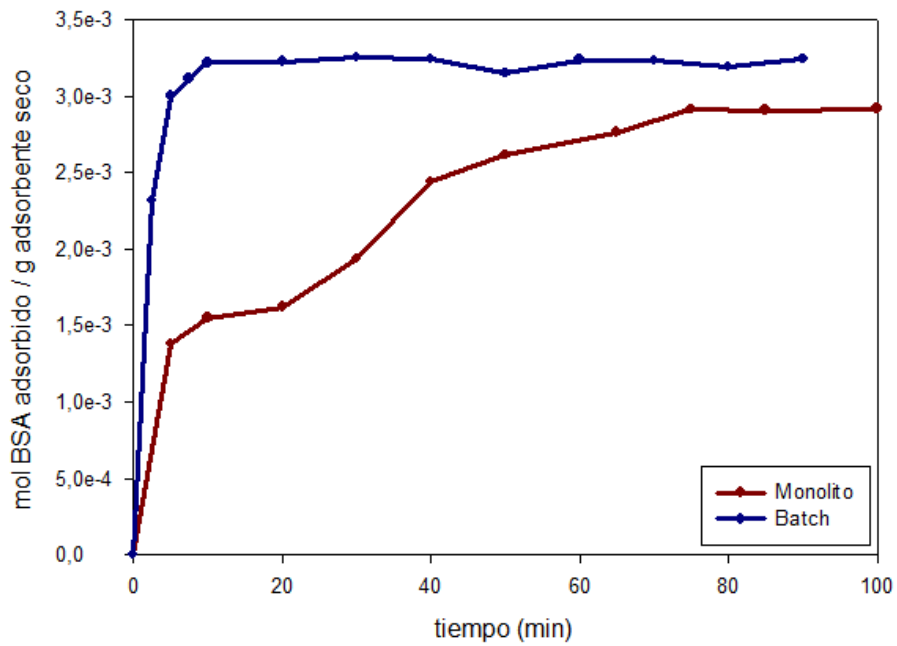
Para poder comparar el comportamiento de adsorción de ambos soportes (monolito y monolito puelverizado), se determinó la cantidad de BSA adsorbida por peso de soporte seco.

Los resultados se muestran en las Tabla 8.5, Tabla 8.6, Tabla 8.7 y Figura 8.12:

**Tabla 8.5. Resumen de las condiciones empleadas para la determinación de la velocidad de adsorción en el Monolito y en el Batch.**

	<b>Monolito</b>	<b>Batch</b>
Volumen disolución	50 mL	12 mL
Concentración disolución	0.7 mg/mL	0.7 mg/mL
Cantidad de soporte seco	0.16 g	0.0384 g
Relación mL disolución/g soporte seco	312.5 mL/g	312.5 mL/g





**Figura 8.12.** Moles de BSA adsorbidos por gramo de adsorbente seco para la adsorción de BSA en un Monolito (línea roja) y un Batch (línea azul), en las mismas condiciones (Tabla 8.5).

**Tabla 8.6. Resumen de los datos experimentales obtenidos en la determinación de la cinética de adsorción en el Monolito.**

<b>tiempo (min)</b>	<b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>mg BSA en disolución</b>	<b>mg BSA adsorbidos</b>	<b>Moles BSA adsorbido</b>	<b>mol BSA adsorbido / g adsorbente seco</b>
0	0.679	33.961	0.000	0.00	0.00
5	0.388	19.384	14.577	$2.21 \cdot 10^{-4}$	$1.38 \cdot 10^{-3}$
10	0.352	17.612	16.349	$2.48 \cdot 10^{-4}$	$1.55 \cdot 10^{-3}$
20	0.336	16.818	17.143	$2.60 \cdot 10^{-4}$	$1.62 \cdot 10^{-3}$
30	0.270	13.497	20.464	$3.10 \cdot 10^{-4}$	$1.94 \cdot 10^{-3}$
40	0.163	8.167	25.794	$3.91 \cdot 10^{-4}$	$2.44 \cdot 10^{-3}$
50	0.126	6.298	27.661	$4.19 \cdot 10^{-4}$	$2.62 \cdot 10^{-3}$
65	0.095	4.774	29.187	$4.42 \cdot 10^{-4}$	$2.76 \cdot 10^{-3}$
75	0.063	3.146	30.815	$4.67 \cdot 10^{-4}$	$2.92 \cdot 10^{-3}$
85	0.065	3.241	30.720	$4.65 \cdot 10^{-4}$	$2.91 \cdot 10^{-3}$
100	0.063	3.138	30.823	$4.67 \cdot 10^{-4}$	$2.92 \cdot 10^{-3}$

**Tabla 8.7. Resumen de los datos experimentales obtenidos en la determinación de la cinética de adsorción en Batch.**

<b>tiempo (min)</b>	<b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>mg BSA en disolución</b>	<b>mg BSA adsorbidos</b>	<b>Moles BSA adsorbido</b>	<b>mol BSA adsorbido / g adsorbente seco</b>
0	0.692	8.304	0.000	0.00	0.00
2.5	0.202	2.424	5.880	$8.91 \cdot 10^{-5}$	$2.32 \cdot 10^{-3}$
5	0.058	0.696	7.608	$1.15 \cdot 10^{-4}$	$3.00 \cdot 10^{-3}$
7.5	0.034	0.408	7.896	$1.20 \cdot 10^{-4}$	$3.12 \cdot 10^{-3}$
10	0.012	0.144	8.160	$1.24 \cdot 10^{-4}$	$3.22 \cdot 10^{-3}$
20	0.010	0.120	8.184	$1.24 \cdot 10^{-4}$	$3.23 \cdot 10^{-3}$
30	0.005	0.060	8.244	$1.25 \cdot 10^{-4}$	$3.25 \cdot 10^{-3}$
40	0.007	0.084	8.220	$1.25 \cdot 10^{-4}$	$3.24 \cdot 10^{-3}$
50	0.026	0.312	7.992	$1.21 \cdot 10^{-4}$	$3.15 \cdot 10^{-3}$
60	0.008	0.096	8.208	$1.24 \cdot 10^{-4}$	$3.24 \cdot 10^{-3}$
70	0.009	0.108	8.196	$1.24 \cdot 10^{-4}$	$3.23 \cdot 10^{-3}$
80	0.018	0.216	8.088	$1.23 \cdot 10^{-4}$	$3.19 \cdot 10^{-3}$
90	0.007	0.084	8.220	$1.25 \cdot 10^{-4}$	$3.24 \cdot 10^{-3}$

Como se observa en la Tabla 8.5, Tabla 8.6 , Tabla 8.7 y Figura 8.12, ambos soportes adsorben prácticamente la misma cantidad de BSA, por lo que los procesos son comparables.

Sin embargo, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio es mayor en el caso del Monolito, como muestra la Figura 8.12 y las constantes cinéticas que se resumen en la Tabla 8.8.

**Tabla 8.8. Datos de las constantes cinéticas y de equilibrio obtenidos mediante estimación de parámetros para el proceso en Batch (intrínseco) y en columna monolítica (global) (Apéndice A).**

Constante	Batch	Monolito
$k'_a / \text{h}^{-1}$	28.84	2.146
$k'_d / \text{h}^{-1}$	0.32	0.173
$K'_{eq}$	90.13	12.800

Como se observa en la Tabla 8.8, la constante cinética en el proceso en Batch más de 10 veces superior al valor obtenido en el caso de la adsorción en el monolito.

Por tanto, parece que la cinética de adsorción no es la etapa limitante en el proceso de adsorción de proteína en el interior del monolito.

Como consecuencia, es necesario determinar la etapa limitante del proceso global mediante el cálculo de los coeficientes de transferencia de materia.

## **8.4 TRANSFERENCIA DE MATERIA EN EL INTERIOR DEL MONOLITO.**

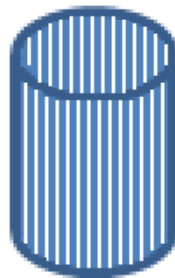
Una vez que se ha demostrado que la cinética de adsorción no es la etapa limitante del proceso de adsorción global, es necesario identificar qué etapa controla dicho proceso.

Para ello, se determinan los parámetros de transferencia de materia interna y externa con el fin de averiguar qué etapa es más importante en el proceso de estudio.

### **8.4.1 Modelo del monolito.**

En primer lugar, es necesario simplificar el modelo del monolito para poder obtener de forma más sencilla los coeficientes de transferencia de materia, ya que su naturaleza estocástica dificulta considerablemente estos cálculos.

Para ello, se considera que este monolito se ajusta a un modelo de canales paralelos [211], es decir, se considera que sólo existen canales, cilíndricos y paralelos entre sí (Figura 8.13).



**Figura 8.13. Esquema del monolito que se ajusta al modelo de canales paralelos.**

Además, se considera que todos estos canales cilíndricos tienen las mismas dimensiones en cuanto a diámetro y longitud.

Teniendo en cuenta esta aproximación y los parámetros calculados previamente (Tabla 8.9), se determinan los parámetros que van a ser necesarios en los cálculos de la transferencia de materia (Tabla 8.10).

**Tabla 8.9. Parámetros del monolito obtenidos anteriormente.**

Parámetro	Valor	Unidades
Diámetro medio del canal ( $d_{canal}$ )	68.63	$\mu\text{m}$
Porosidad ( $\varepsilon$ )	33.79	%
Área disponible para la adsorción ( $A_{mon}$ )	779.53	$\text{cm}^2$
Pseudoconstante cinética intrínseca ( $k'_{a,int}$ )	$8.011 \cdot 10^{-3}$	$\text{s}^{-1}$

Para calcular los parámetros necesarios para el modelo de transferencia de materia, que se explican en las secciones sucesivas, se realizarán las siguientes consideraciones:

- El área superficial del monolito equivale a la suma del área lateral de los cilindros que forman los canales.

Como no se conoce el número ni la longitud de canales, se determina la longitud total que tendría un único canal que tenga la misma área lateral que el monolito,

$L_{Total}$  :

$$A_{mon} = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot L_{Total} \quad (8.16)$$

$$779.53 \text{cm}^2 = 2 \cdot \pi \cdot \frac{68.63 \mu\text{m}}{2} \cdot L_{Total} \quad (8.17)$$

$$779.53 \text{ cm}^2 \cdot \left( \frac{10^4 \mu\text{m}}{1 \text{ cm}} \right)^2 = 2 \cdot \pi \cdot \frac{68.63 \mu\text{m}}{2} \cdot L_{Total} \quad (8.18)$$

$$L_{Total} = 3.62 \cdot 10^8 \mu\text{m} \quad (8.19)$$

- Si se calcula esta longitud total que tendría un único canal teniendo en cuenta el volumen total de huecos que hay en el monolito,  $V_{huecos\ mon}$ , se obtiene prácticamente el mismo resultado, lo que demuestra que esta estimación del área superficial del monolito es correcta:

$$V_{huecos\ mon} = V_{mon} \cdot \varepsilon \quad (8.20)$$

$$V_{huecos\ mon} = 4 \text{ cm}^3 \cdot 0.3379 = 1.3516 \text{ cm}^3 \quad (8.21)$$

$$V_{huecos\ mon} = 1.3516 \cdot 10^{12} \mu\text{m}^3 \quad (8.22)$$

$$V_{huecos\ mon} = \pi \cdot r^2 \cdot L_{Tot} = \pi \cdot \left( \frac{68.63 \mu\text{m}}{2} \right)^2 \cdot L_{Tot} \quad (8.23)$$

$$L_{Tot} = 3.654 \cdot 10^8 \mu\text{m} \quad (8.24)$$

- Se calcula el número de canales aproximados suponiendo que todos los canales son verticales. Así, dividiendo el área transversal de la fracción hueca total del monolito,  $A_{transv\ hueco}$ , entre el área transversal de cada canal,  $A_{transv\ canal}$ , nos dará una aproximación del número de canales que hay en el monolito:

$$A_{transv\ hueco} = A_{transv} \cdot \varepsilon \quad (8.25)$$

$$A_{transv\ hueco} = 2.011 \cdot 10^8 \mu\text{m}^2 \cdot 0.3379 = 6.7939 \cdot 10^7 \mu\text{m}^2 \quad (8.26)$$

$$A_{transv\ canal} = \pi \cdot r^2 = \pi \cdot \left( \frac{68.63 \mu m}{2} \right)^2 = 3.70 \cdot 10^3 \mu m^2 \quad (8.27)$$

$$n_{canal} = \frac{A_{transv\ hueco}}{A_{transv\ canal}} = \frac{6.7939 \cdot 10^7 \mu m^2}{3.70 \cdot 10^3 \mu m^2} = 1.84 \cdot 10^4 \text{ canales} \quad (8.28)$$

- Una vez se conocen el número de canales aproximados y la longitud total del canal necesaria para que el área superficial del monolito sea la de los canales, se obtiene la longitud de cada canal,  $L_{canal}$  :

$$L_{canal} = L_{Total} / n_{canal} = 3.654 \cdot 10^8 \mu m / 1.84 \cdot 10^4 \text{ canales} \quad (8.29)$$

$$L_{canal} = 1.986 \cdot 10^4 \mu m / canal \quad (8.30)$$

De esta forma, se conocen los parámetros necesarios para calcular los parámetros de transferencia de materia.

**Tabla 8.10. Parámetros calculados utilizando las Ecuaciones (8.16) - (8.30).**

Parámetro	Valor	Unidades
Longitud media del canal del monolito ( $L_{canal}$ )	$1.986 \cdot 10^{-2}$	m
Número de canales ( $n_{canal}$ )	$1.84 \cdot 10^4$	canales

Una vez calculados los parámetros necesarios para el cálculo de los coeficientes de transferencia de materia, se procede al desarrollo del modelo de transferencia de materia externa e interna.



### 8.4.2 Transferencia de materia externa.

Para obtener el valor del coeficiente global de transferencia externa,  $K_f \cdot a$ , se utiliza la correlación de Tronconi [212] para un monolito utilizado en catálisis:

$$Sh = \beta + 8.827 \left( \frac{1000}{Gz} \right)^{-0.545} \cdot \exp \left( \frac{-48.2}{Gz} \right) \quad (8.31)$$

Donde  $\beta$  adopta diferentes valores según la geometría del canal: 3.657 para canales circulares, 2.976 para canales cuadrados y 2.47 para canales triangulares.

Definiéndose:

$$Sh = \frac{K_f L_{canal}}{D_{BSA}} \quad (8.32)$$

$$Gz = \frac{Re_{canal} \cdot Sc \cdot d_{canal}}{L_{canal}} \quad (8.33)$$

$$Sc = \frac{\mu}{\rho \cdot D_{BSA}} \quad (8.34)$$

$$Re_{canal} = \frac{d_{canal} \cdot v \cdot \rho}{\mu} \quad (8.35)$$

Siendo:

$Sh$ : Número de Sherwood [=] adimensional

$Gz$ : Número de Graetz [=] adimensional

$K_L$ : Coeficiente global de transferencia de materia film [=] m/s

$L_{canal}$  : Longitud del canal [=] m

$d_{canal}$  : Diámetro del canal [=] m

$D_{BSA}$  : Difusividad de la proteína en PBS [=] m<sup>2</sup>/s

$Re_{canal}$  : Número de Reynolds del canal [=] adimensional

$Sc$  : Número de Schmidt [=] adimensional

$v$  : Velocidad del fluido a través del canal [=] m/s

$\rho$  : Densidad del fluido que atraviesa el canal [=] kg/m<sup>3</sup>

$\mu$  : Viscosidad del fluido que atraviesa el canal [=] kg/ m·s

El valor de la difusividad de la BSA en PBS se consideró similar al valor en agua a 20°C, con un valor de  $6.84 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  [213].

El valor del coeficiente global de transferencia externo,  $K_f \cdot a$ , así como las variables necesarias para su obtención se resumen en la Tabla8.11.

**Tabla8.11. Resumen de los parámetros que intervienen en el cálculo del coeficiente de transferencia de materia interna.**

Parámetro	Valor	Unidades
$\rho$	1003.6	kg/m <sup>3</sup>
$\mu$	0.001	kg/ m·s
$d_{canal}$	$6.86 \cdot 10^{-5}$	m
$L_{canal}$	$1.99 \cdot 10^{-2}$	m
$D_{BSA}$	$6.84 \cdot 10^{-11}$	m <sup>2</sup> /s

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 8.12.

**Tabla 8.12. Resumen de los valores obtenidos en el cálculo del coeficiente de transferencia de materia interna.**

<b>Q (cm<sup>3</sup>/min)</b>	<b>Re</b>	<b>Gz</b>	<b>Sh</b>	<b>K<sub>f</sub> (m/s)</b>	<b>K<sub>f</sub>·a (s<sup>-1</sup>)</b>
0.5	8.45·10 <sup>-3</sup>	0.426	3.66	1.26·10 <sup>-8</sup>	0.001
1	1.69·10 <sup>-2</sup>	0.851	3.66	1.26·10 <sup>-8</sup>	0.001
1.25	2.11·10 <sup>-2</sup>	1.06	3.66	1.26·10 <sup>-8</sup>	0.001
1.5	2.54·10 <sup>-2</sup>	1.28	3.66	1.26·10 <sup>-8</sup>	0.001
2	3.38·10 <sup>-2</sup>	1.70	3.66	1.26·10 <sup>-8</sup>	0.001
3	5.07·10 <sup>-2</sup>	2.55	3.66	1.26·10 <sup>-8</sup>	0.001
4	6.76·10 <sup>-2</sup>	3.40	3.66	1.26·10 <sup>-8</sup>	0.001

El área específica, *a*, necesaria para el cálculo del coeficiente de transferencia de materia global, *K<sub>f</sub>*, se calcula mediante la Ecuación (8.36).

$$a = \frac{A_{poros}}{V_{poros}} = \frac{2 \cdot \pi \cdot r \cdot L}{\pi \cdot r^2 \cdot L} = \frac{2}{r} \quad (8.36)$$

Por tanto, el coeficiente de transferencia de materia externo tiene el mismo valor para el intervalo de caudales estudiados (0.5-4 mL/min).

### 8.4.3 Transferencia de materia interna.

Para calcular la transferencia de materia interna en el interior del monolito se utilizó la definición del módulo de Thiele ( $\Phi$ ) y del factor de eficacia ( $\eta$ ) propuesto por Kalluri y col [207, 214], que se muestran en las Ecuaciones (8.37) y (8.38).

$$\eta = \frac{\tanh(\Phi)}{\Phi} \quad (8.37)$$

$$\Phi = t_{canal} \sqrt{\frac{k'_{a,int}}{D_{ef,BSA}}} \quad (8.38)$$

Siendo:

$\eta$  : Factor de efectividad [=] adimensional

$\Phi$  : Módulo de Thiele [=] adimensional

$t_{canal}$  : Espesor entre los canales del monolito [=] m

$k'_{a,int}$  : Constante de adsorción intrínseca [=] 1/s

$D_{ef,BSA}$  : Difusividad efectiva de la BSA en los canales del monolito [=] m<sup>2</sup>/s

Al tratarse de una disolución líquida con un tamaño de canal relativamente grande, la difusividad de Knudsen se puede considerar despreciable [207].

Teniendo en cuenta modelo de poros al azar [207], la difusividad efectiva de la BSA,  $D_{ef,BSA}$ , se calcula utilizando la Ecuación (8.39).

$$D_{ef,BSA} = D_{BSA} \cdot \varepsilon^2 \quad (8.39)$$

Sustituyendo, se obtiene:

$$D_{ef,BSA} = 6.84 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s} \cdot 0.34^2 = 7.91 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}. \quad (8.40)$$

La constante intrínseca de velocidad de adsorción,  $k'_{a,int}$ , se determinó mediante los experimentos de adsorción en Batch utilizando soporte monolítico pulverizado ya que la difusión en el interior de los poros es lo suficientemente pequeña como para poder considerarla despreciable.

El factor de efectividad,  $\eta$ , relaciona la velocidad de difusión con la velocidad de reacción.

Puesto que el valor del espesor no es homogéneo, se consideró un intervalo de espesores entre 10 y 100  $\mu\text{m}$ , ya que son los valores medios observados en las imágenes obtenidas mediante microscopía ESEM (ver Capítulo 4).

Por tanto, se calculó el valor del módulo de Thiele,  $\Phi$ , y el factor de eficacia,  $\eta$ , para cada valor de espesor.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 8.13.

**Tabla 8.13. Resumen de los parámetros que intervienen en el cálculo del factor de eficacia interno.**

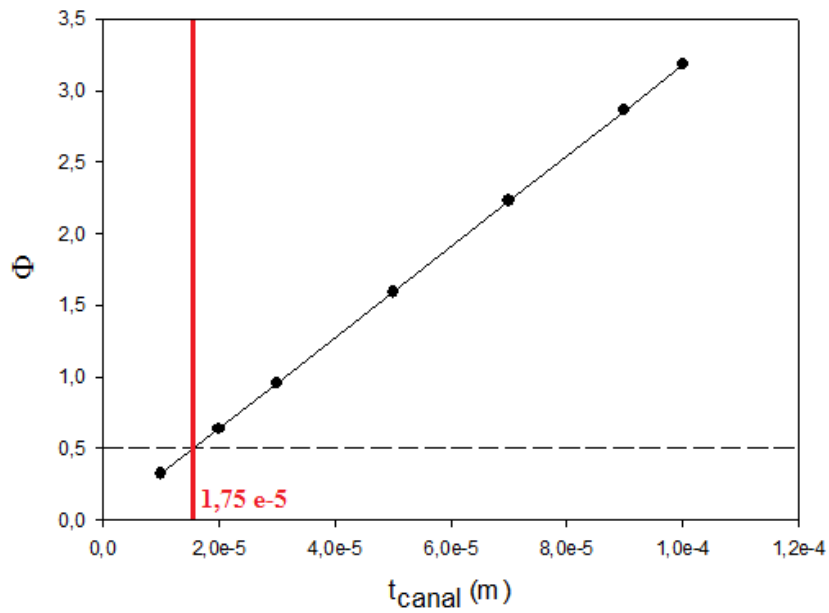
$t_{canal}$ (m)	$\Phi$	$\tanh(\Phi)$	$\eta$
$1.00 \cdot 10^{-5}$	0.318	0.308	0.968
$2.00 \cdot 10^{-5}$	0.637	0.563	0.884
$3.00 \cdot 10^{-5}$	0.955	0.742	0.777
$5.00 \cdot 10^{-5}$	1.591	0.920	0.578
$7.00 \cdot 10^{-5}$	2.228	0.977	0.439
$9.00 \cdot 10^{-5}$	2.865	0.994	0.347
$1.00 \cdot 10^{-4}$	3.183	0.997	0.313

Como se observa en la Tabla 8.13, al aumentar el espesor, aumenta el módulo de Thiele, y disminuye el factor de efectividad.

Atendiendo al valor del factor de efectividad, que es la relación entre la velocidad de reacción intrínseca y la velocidad de difusión, cuando el espesor es de  $10 \mu\text{m}$  su valor es prácticamente igual a 1, lo que indica que no hay limitaciones por difusión.

Sin embargo, al aumentar el espesor de la pared del monolito, el valor del factor de efectividad disminuye como consecuencia de que la transferencia interna se vuelve cada vez más importante, limitando la velocidad global del proceso.

Teniendo en cuenta que, para valores del módulo de Thiele  $\Phi > 0.5$  el fenómeno de difusión se considera limitante despreciable [207], y teniendo en cuenta la Figura 8.14 se obtiene que para espesores mayores de  $1.75 \cdot 10^{-5}$  m, la difusión es el mecanismo limitante en el transporte de materia interno.



**Figura 8.14. Representación del módulo de Thiele ( $\Phi$ ) frente al espesor de canal ( $t_{\text{canal}}$ , m). La línea discontinua (- -) marca el valor del módulo de Thiele a partir del cual la difusividad es el mecanismo limitante en el transporte interno, la línea roja (- -) marca el espesor a partir del cual la difusividad es el mecanismo limitante.**

#### 8.4.4 Etapa limitante del proceso global.

Para determinar la etapa limitante del proceso global se aplica la Ecuación (8.41) [207].

$$\frac{1}{k_0} = \frac{1}{\eta k'_{a,\text{int}}} + \frac{1}{k_L \cdot a} + \frac{1}{k'_{a,\text{int}}} \quad (8.41)$$

*Resistencia de la transferencia de materia global*     
 *Resistencia de la transferencia de materia interna*     
 *Resistencia de la transferencia de materia externa*     
 *Resistencia de la cinética*

Siendo:

$k_0$ : Constante del proceso total de transferencia de materia [=]  $s^{-1}$

$k'_a$ : Constante de adsorción intrínseca [=]  $s^{-1}$

$\eta$ : Factor de efectividad del transporte interno [=] adimensional

$k_L \cdot a$ : Coeficiente global de transferencia de materia [=]  $s^{-1}$

Los resultados obtenidos de cada parámetro que interviene en el proceso global de adsorción de BSA en la superficie del monolito mediante cromatografía IMAC se recogen en la Tabla 8.14:

**Tabla 8.14. Resumen de los parámetros relacionados con la transferencia de materia.**

Parámetro	Valor	Unidades
$K_L \cdot a$	0.001	$s^{-1}$
$k'_{a,int}$	$8.011 \cdot 10^{-3}$	$s^{-1}$
$k'_{a,global}$	$5.96 \cdot 10^{-4}$	$s^{-1}$
$\eta$	0.313-0.968	-

Sustituyendo en la Ecuación (8.41) con el valor de  $K_L \cdot a$ , se obtiene la Ecuación (8.42):

$$\frac{1}{k_0} = \frac{1}{0.313 \cdot 8.011 \cdot 10^{-3} s^{-1}} + \frac{1}{10^{-3} s^{-1}} + \frac{1}{8.011 \cdot 10^{-3} s^{-1}} \quad (8.42)$$

$$\frac{1}{k_0} = 398.81 s + 1000 s + 124.83 s = 1523.64 s \quad (8.43)$$



Para comprobar si este resultado es válido, considerando el resultado como aceptable, con un error del 10 %:

$$\frac{1}{k_0} = \frac{1}{5.96 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}} = 1677.85 \text{ s} \quad (8.44)$$

Por tanto, se puede concluir que el valor obtenido para el factor de eficacia interno, así como para el coeficiente de transferencia de materia externo.

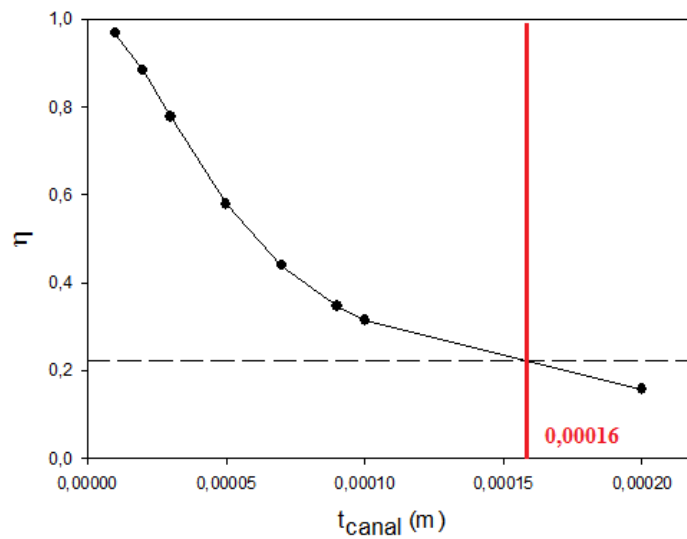
Además, teniendo en cuenta estos resultados es posible calcular el espesor efectivo que presenta el monolito, a partir de la Ecuación (8.41) y sustituyendo los datos de las constantes cinéticas de la Tabla 8.14:

$$\frac{1}{5.96 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}} = \frac{1}{\eta \cdot 8.011 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}} + \frac{1}{10^{-3} \text{ s}^{-1}} + \frac{1}{8.011 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}} \quad (8.45)$$

$$1677.85 \text{ s} = \frac{1}{\eta} 124.83 \text{ s} + 1000 \text{ s} + 124.83 \text{ s} \quad (8.46)$$

$$\eta = 0.223 \quad (8.47)$$

El valor real del espesor de pared del monolito se obtiene representando el valor del coeficiente de efectividad frente al espesor de pared del monolito (Figura 8.15).



**Figura 8.15. Factor de efectividad del transporte interno frente al espesor de pared del monolito.**

Como se observa en la Figura 8.15, el valor del espesor de pared del monolito obtenido es de 0.00016 m.

Además, es importante señalar que en este caso no hay ningún fenómeno limitante, y la resistencia global del proceso es la suma de las contribuciones de cada etapa: transferencia interna, transferencia externa y cinética.

## 8.5 CONCLUSIONES.

- Mediante el programa informático *gPROMS* se han determinado las constantes cinéticas y de equilibrio del proceso de adsorción de BSA en el monolito mediante cromatografía IMAC.
- Se ha propuesto un modelo para determinar los parámetros que cuantifican la transferencia de materia interna y externa.

- La resistencia de materia del proceso global es consecuencia de la suma de las resistencias de todo el proceso: transferencia de materia externa, transferencia de materia interna y proceso de adsorción.



## **Capítulo 9.**

**Estancia de investigación en el grupo  
BSEL, del Imperial College**



Este capítulo resume el trabajo realizado durante mi estancia de investigación en el grupo BSEL, del Imperial College de Londres.

El prestigioso grupo BSEL (Biological Systems Engineering Laboratory) es pionero en biotecnología, y trabaja en varias líneas de investigación:

- Cultivo y diferenciación de células madre.
- Tratamiento para la leucemia mieloide aguda.
- *Scaffolds* como soporte de cultivos celulares.
- Farmacocinética y sistemas de liberación de fármacos.
- Simulación, modelización y optimización de la producción de anticuerpos monoclonales.

Dentro de estas líneas de investigación, trabajé en el campo de la simulación y optimización de cultivos celulares para la producción de anticuerpos monoclonales.

En el Apéndice A se explica de forma más detallada las opciones y comandos utilizados en la optimización dinámica utilizados con la plataforma *gPROMS*<sup>®</sup>, y en el Apéndice B se adjunta la publicación que ha resultado de dicha estancia de investigación.

## **9.1 ANTECEDENTES EN LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (mAb) Y SU OPTIMIZACIÓN EN EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN BSEL [215].**

Los sistemas de cultivos celulares de mamíferos son ampliamente utilizados en la producción de compuestos biológicos, como anticuerpos monoclonales (mAb).

En general, los cultivos celulares se realizan en reactores fed-batch, mientras que los procesos de separación son procesos en lote, en reactores batch.

Sin embargo, en la actualidad, se tiende a buscar un proceso continuo que mejore las propiedades del bioproducto que se quiere obtener, además de mejorar los rendimientos del proceso. Para ello, es necesario asegurar que el bioproceso es monitorizado y controlado de forma adecuada y eficiente con el fin de conseguir que, tanto la calidad del producto como su rendimiento, sean máximos y estables.

Los modelos matemáticos que describen estos procesos son, en general, altamente complejos y necesitan gran potencia computacional para ser simulados. Además, las no-linealidades presentes en las ecuaciones que conforman el modelo podrían hacer que los estudios de optimización o control no se puedan realizar.

Sin embargo, antes de la experimentación *in-silico*, es necesario asegurar que el proceso computacional se puede desarrollar sin interrupciones, y que las herramientas necesarias funcionen de forma adecuada.

El grupo de investigación BSEL utiliza la estructura PAROC (PARAMetric Optimization and Control) y la plataforma de software mostrada en la Figura 9.1 para el diseño y la comprobación de controladores avanzados [216].

### **9.1.1 Esquema de trabajo PAROC.**

PAROC es un esquema de trabajo que permite la ejecución y el diseño de estudios de optimización avanzada y de control basados en modelos matemáticos dinámicos de alta fidelidad.

Este esquema consta de cuatro etapas diferentes: a) análisis y modelado de alta fidelidad, b) aproximación del modelo, c) control del modelo y d) validación del sistema de control o “*closed loop*”.



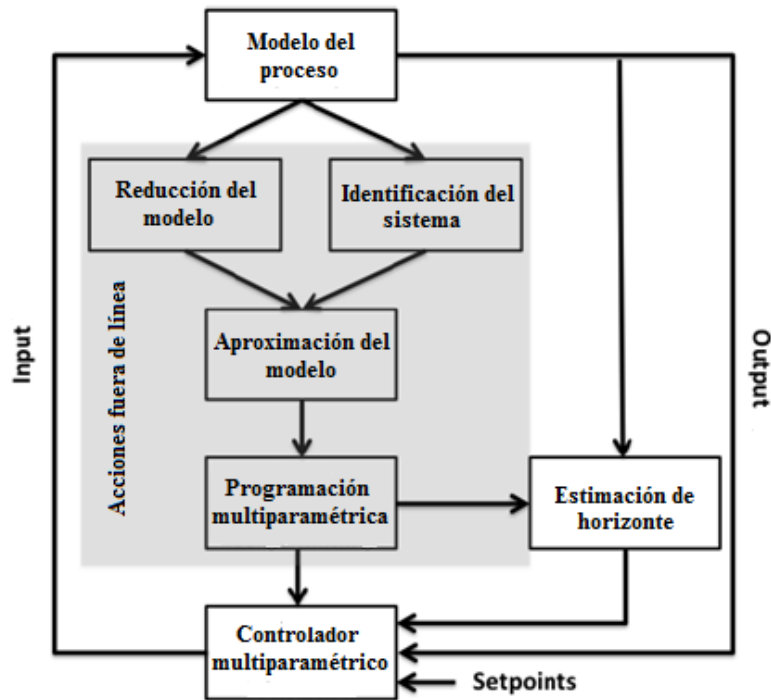


Figura 9.1. Esquema general PAROC [216].

### 9.1.1.1 Análisis y modelado de alta fidelidad .

En primer lugar se analiza el sistema objeto de estudio en busca de los modelos matemáticos que lo definen, ya que los modelos matemáticos son fundamentales en la experimentación *in-silico*.

Siguiendo el procedimiento sugerido por Kiparissides y col. [217], la primera etapa de PAROC consiste en la formulación y validación de un modelo dinámico riguroso que cumpla los principios fundamentales de la ciencia.

Una vez que se conoce el modelo matemático del proceso que se quiere estudiar, se evalúa el impacto de la incertidumbre de cada parámetro en la variable de salida, mediante un *Análisis de Sensibilidad Global (Global Sensivity Analysis, GSA)* y se estiman los parámetros más importantes utilizando datos experimentales (*Parameter Estimation, PE*).

Además, se evalúa la predictibilidad del modelo, y éste se utiliza para realizar tanto simulaciones del sistema bucle abierto como estudios de optimización.

Todo ello se lleva a cabo utilizando gPROMS<sup>®</sup> ModelBuilder [218] para la simulación y optimización del modelo, mientras que GSA y PE se ejecutan utilizando gPROMS<sup>®</sup> ModelBuilder en conjunción con MATLAB<sup>®</sup>, mediante la interfaz gO:MATLAB.

### 9.1.1.2 Aproximación del modelo.

Generalmente, los modelos obtenidos en la etapa anterior están formados por gran cantidad de ecuaciones diferenciales parciales u ordinarias, así como ecuaciones algebraicas que contienen términos no lineales, lo que provoca que las simulaciones tengan un alto coste computacional.

Por este motivo, es necesario simplificar el modelo inicial y reemplazarlo por un sistema lineal que permita realizar los estudios de control necesarios de forma satisfactoria [217, 219].

El esquema PAROC sugiere que esta aproximación del modelo se realice mediante una identificación de sistema o mediante técnicas de reducción del modelo.

La principal diferencia entre estos dos métodos es que las técnicas de reducción de modelo están basadas en métodos que disminuyen la complejidad del modelo mientras se mantiene la interpretación física de sus entidades, mientras que en la identificación del sistema se basa en métodos estadísticos que generan representaciones lineales sin significado físico.

Sin embargo, ambos métodos permiten el diseño de modelos lineales (espacio de estados) adecuados para la formulación y resolución del problema de control en etapas posteriores.

La aproximación del modelo se realiza mediante identificación del sistema, utilizando la herramienta de *Identificación de Sistema* de MATLAB<sup>®</sup>. Para ello, se dan diferentes valores a las variables de entrada y se monitorizan las respuestas de las variables de

interés. Con los resultados de las distorsiones obtenidas, se identifican las variables más importantes y se diseñan los modelos simplificados.

### **9.1.1.3 Control del modelo.**

El control del modelo aproximado se realiza mediante la utilización del modelo de espacio de estados lineal.

En este caso, el esquema PAROC sugiere el desarrollo de controladores avanzados basados en técnicas de programación multiparamétrica. Estas técnicas multiparamétricas (Mp-MPC) combina las ventajas del Control Predictivo por Modelo (*Model Predictive Control*, MPC) con la capacidad de resolver el problema de optimización fuera de línea, lo que mejora el controlador durante la operación en línea.

En comparación con otras estrategias de control (como el control PID), las técnicas multiparamétricas se basan en el modelo y pueden predecir el comportamiento del sistema en el futuro. Además, el controlador puede informar de distorsiones cruciales para la calidad del producto en este tipo de sistemas.

El proceso de control se resuelve utilizando la herramienta POP de MATLAB®.

### **9.1.1.4 Validación del sistema de control o “closed loop”.**

Una vez se obtiene la solución del problema de control, se comprueba el diseño de los controladores obtenidos mediante la simulación del proceso *in-silico*. Además, se realiza la optimización del mismo, corroborando que la solución óptima es la que muestra el controlador, lo que indica que el modelo está bien simplificado y el controlador está bien diseñado.

Para esta validación se utiliza gPROMS® ModelBuilder para la simulación del modelo junto con MATLAB®, utilizando la interfaz gO:MATLAB.

### 9.1.2 Modelos de generación de anticuerpos monoclonales (mAb) a partir de cultivos celulares.

Generalmente, la producción de mAb se divide en dos etapas:

- Upstream: cultivo de las células que fabrican los mAb.
- Downstream: separación y purificación de los mAb.

La etapa de upstream se realizó utilizando células GS-NSO para la formación de anticuerpos quiméricos IgG4. Este proceso es el que estudié en mi estancia de investigación.

Para la generación de anticuerpos monoclonales IgG4 se utilizaron células de línea celular de mamífero GS-NSO, en un biorreactor. Para ello, se cultivaron estas células durante 168h (7 días) y se estudió y modelizó la concentración de Glucosa y cuatro aminoácidos clave: Aspartato, Arginina, Asparagina y Glutamato. Estos nutrientes son utilizados por las células a través de diferentes rutas de biosíntesis, producción de energía y ensamblado del mAb (Figura 9.2).

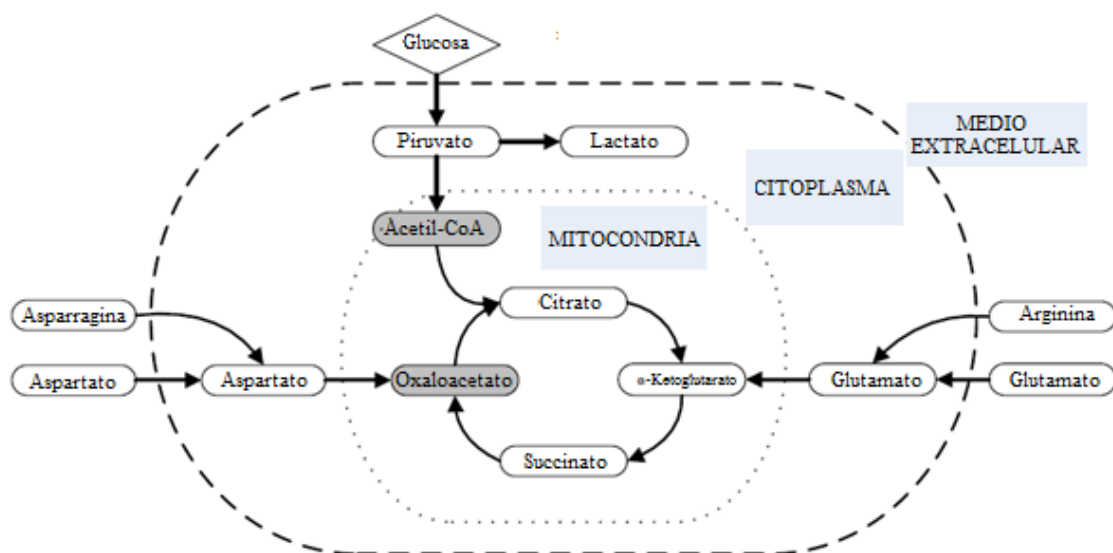


Figura 9.2. Relación de compuestos considerando las rutas metabólicas básicas [7].

En particular, la Glucosa es el carbohidrato más importante que participa en varias rutas metabólicas, como:

- La ruta de la pentosa fosfato (PPP) para la producción de precursores de ADN.
- Ruta anaeróbica o glicólisis para la producción de energía.
- Ruta aeróbica, donde se oxida completamente mediante el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA).

El Glutamato es un compuesto clave en el metabolismo celular, ya que es la única fuente de glutamina [219, 220]. En cultivos GS-NSO, el consumo de glutamato es preferido sobre el consumo de glucosa y, por tanto, el agotamiento de glutamato provoca una disminución de la velocidad de crecimiento celular. De todas formas, las células pueden seguir creciendo utilizando otros aminoácidos como arginina, cuyo catabolismo produce glutamato.

El aspartato es un aminoácido fundamental para la producción de energía (mediante el ciclo TCA) y, cuando éste se agota, la asparragina se convierte en aspartato a través de la reacción catalizada de la asparraginasa, para compensar la escasez de aspartato [221].

## **9.2 TRABAJO REALIZADO EN LA ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN.**

El trabajo realizado se divide en tres bloques o elementos diferenciados: una primera optimización dinámica de un modelo obtenido a partir de datos externos al grupo de investigación, la modificación de dicho modelo incluyendo las cinéticas de generación de agregados y fragmentos, y una última optimización dinámica de un modelo desarrollado íntegramente en el grupo de investigación BSEL.

### 9.2.1 Optimización dinámica de un modelo creado a partir de datos externos al grupo de investigación.

En primer lugar, para aprender el funcionamiento de la plataforma gPROMS<sup>®</sup>, se realizó una optimización dinámica del proceso. Para ello se utilizaron datos experimentales externos al grupo de investigación, junto con un modelo matemático de las rutas metabólicas de células GS-NSO desarrollado por el grupo de investigación BSEL a partir de datos experimentales externos (grupo de Morbidelli).

Este modelo matemático, por petición del grupo de investigación de origen BSEL, no pueden ser revelados. Sin embargo, y para tener una idea del tipo de modelo utilizado, éste es similar al modelo utilizado en la sección 9.2.3 que se muestra en las Ecuaciones (9.1)- (9.22).

**Tabla 9.1. Modelo matemático que describe el sistema upstream.**

$\frac{dV}{dt} = F_{in} - F_{out}$	(9.1)
$\frac{dVX_v}{dt} = VX_v(\mu - \mu_d) - F_{out} X_v$	(9.2)
$\frac{dVX_d}{dt} = VX_v \mu_d - F_{out} X_d$	(9.3)
$\mu = \mu_{max} \left( \frac{[GLC]}{K_{glc} + [GLC]} \right) \left( \frac{[GLU]}{K_{glu} + [GLU]} + \frac{[ARG]}{K_{arg} + [ARG]} \right) \left( \frac{[ASP]}{K_{asp} + [ASP]} + \frac{[ASN]}{K_{asn} + [ASN]} \right)$	(9.4)
$\mu_d = \mu_{d,max} \left( \frac{K_{glc,lim}}{K_{glc,lim} + [GLC]} \right) \left( \frac{K_{glu,lim}}{K_{glu,lim} + [GLU]} + \frac{K_{arg,lim}}{K_{arg,lim} + [ARG]} \right) \left( \frac{K_{asp,lim}}{K_{asp,lim} + [ASP]} + \frac{K_{asn,lim}}{K_{asn,lim} + [ASN]} \right)$	(9.5)
$\frac{d(V[GLC])}{dt} = -VX_v(Q_{x,glc} + Q_{glyc,glc} + Q_{ica,glc}) + F_{in}[GLC]_{in} - F_{out}[GLC]$	(9.6)
$Q_{x,glc} = \frac{\mu}{Y_{x,glc}}$	(9.7)

**Tabla 9.1. Modelo matemático que describe el sistema upstream.**

$Q_{glyc,glc} = (1 - Q_{MET}) \left( \frac{\mu}{Y_{glyc,glc}} + m_{glyc,glc} \right)$	(9.8)
$Q_{MET} = \frac{K_{MET}}{K_{MET} + [GLU]}$	(9.9)
$Q_{ica,glc} = \frac{\mu}{Y_{ica,glc}} + m_{ica,glc}$	(9.10)
$\frac{d(V[LAC])}{dt} = VX_v \cdot 2 \cdot Q_{glyc,glc} - F_{out} [LAC]$	(9.11)
$\frac{d(V[GLU])}{dt} = VX_v (Q_{glu,arg} - Q_{x,glu} - Q_{ica,glu}) + F_{in} [GLU]_{in} - F_{out} [GLU]$	(9.12)
$Q_{glu,arg} = C_{arg} Q_{ica,glu}$	(9.13)
$Q_{x,glu} = \frac{\mu}{Y_{x,glu}}$	(9.14)
$Q_{ica,glu} = \frac{\mu}{Y_{ica,glu}} + m_{ica,glu}$	(9.15)
$\frac{d(V[ARG])}{dt} = -VX_v (Q_{glu,arg} + Q_{x,arg}) + F_{in} [ARG]_{in} - F_{out} [ARG]$	(9.16)
$\frac{d(V[ASP])}{dt} = VX_v (Q_{asp,asn} - Q_{x,asp} + Q_{ica,asp}) + F_{in} [ASP]_{in} - F_{out} [ASP]$	(9.17)
$Q_{asp,asn} = C_{asn} Q_{ica,glu}$	(9.18)
$Q_{x,asp} = \frac{\mu}{Y_{x,asp}}$	(9.19)
$Q_{ica,asp} = C_{asp} Q_{ica,glu}$	(9.20)
$\frac{d(V[ASN])}{dt} = -VX_v (Q_{asp,asn} + Q_{x,asn}) + F_{IN} [ASN]_{in} - F_{out} [ASN]$	(9.21)
$\frac{d(V[mAb])}{dt} = VX_v m_{mAb,x}$	(9.22)

Siendo:

$V$  : Volumen del Reactor [=] L

$F_{in}$  : Caudal de entrada al Reactor [=] L/h

$F_{out}$  : Caudal de salida del Reactor [=] L/h

$X_v$  : Concentración de células viables [=] células/L

$X_d$  : Concentración de células muertas [=] células/L

$\mu$  : velocidad de crecimiento de las células [=]  $h^{-1}$

$\mu_{max}$  : velocidad de crecimiento máximo de las células [=]  $h^{-1}$

$\mu_d$  : velocidad de muerte celular [=]  $h^{-1}$

$\mu_{d,max}$  : velocidad máxima de muerte celular [=]  $h^{-1}$

$[GLC]$  : Concentración de Glucosa [=] mM

$[GLC]_{in}$  : Concentración de Glucosa en la corriente de entrada [=] mM

$[GLU]$  : Concentración de Glutamato [=] mM

$[GLU]_{in}$  : Concentración de Glutamato en la corriente de entrada [=] mM

$[ARG]$  : Concentración de Arginina [=] mM

$[ARG]_{in}$  : Concentración de Arginina en la corriente de entrada [=] mM

$[ASP]$  : Concentración de Aspartato [=] mM

$[ASP]_{in}$  : Concentración de Aspartato en la corriente de entrada [=] mM

$[ASN]$  : Concentración de Asparragina [=] mM

$[ASN]_{in}$  : Concentración de Asparragina en la corriente de entrada [=] mM

$[LAC]$  : Concentración de Lactato [=] mM

$[mAb]$  : Concentración de mAb [=] mg/L



$K_{glc}$  : Constante de saturación del crecimiento basado en el metabolismo de Glucosa [=] mM

$K_{glu}$  : Constante de saturación del crecimiento basado en el metabolismo de Glutamato [=] mM

$K_{arg}$  : Constante de saturación del crecimiento basado en el metabolismo de Arginina [=] mM

$K_{asp}$  : Constante de saturación del crecimiento basado en el metabolismo de Aspartato [=] mM

$K_{asn}$  : Constante de saturación del crecimiento basado en el metabolismo de Asparragina [=] mM

$K_{glc,lim}$  : Constante de saturación de la muerte celular por la ausencia de Glucosa [=] mM

$K_{glu,lim}$  : Constante de saturación de la muerte celular por la ausencia de Glutamato [=] mM

$K_{arg,lim}$  : Constante de saturación de la muerte celular por la ausencia de Arginina [=] mM

$K_{asp,lim}$  : Constante de saturación de la muerte celular por la ausencia de Aspartato [=] mM

$K_{asn,lim}$  : Constante de saturación de la muerte celular por la ausencia de Asparragina [=] mM

$K_{MET}$  : Constante de saturación del consumo preferencial de Glutamato [=] mM

$Q_{x,glc}$  : Consumo específico de Glucosa para la producción de biomasa [=]  
mmol/(célula·h)

$Q_{x,glu}$  : Consumo específico de Glutamato para la producción de biomasa [=]  
mmol/(célula·h)

$Q_{x,arg}$  : Consumo específico de Arginina para la producción de biomasa [=]  
mmol/(célula·h)

$Q_{x,asp}$  : Consumo específico de Aspartato para la producción de biomasa [=]  
mmol/(célula·h)

$Q_{x,asn}$  : Consumo específico de Asparragina para la producción de biomasa [=]  
mmol/(célula·h)

$Q_{glyc,glc}$  : Consumo específico de Glucosa para la glicólisis [=] mmol/(célula·h)

$Q_{tca,glc}$  : Consumo específico de Glucosa para el ciclo tca [=] mmol/(célula·h)

$Q_{tca,glu}$  : Consumo específico de Glutamato para el ciclo tca [=] mmol/(célula·h)

$Q_{tca,asp}$  : Consumo específico de Aspartato para el ciclo tca [=] mmol/(célula·h)

$Q_{glu,arg}$  : Consumo específico de Arginina para la producción de Glutamato[=  
mmol/(célula·h)

$Q_{asp,asn}$  : Consumo específico de Asparragina para la producción de Aspartato [=]  
mmol/(célula·h)

$Q_{MET}$  : Efecto de la concentración de Glutamato en el consumo de Glucosa para la  
glicólisis [=] mmol/(célula·h)

$Y_{x,glc}$  : Rendimiento de la formación de biomasa a partir de Glucosa [=]  
célula/mmol

$Y_{x,glu}$  : Rendimiento de la formación de biomasa a partir de Glutamato [=]  
célula/mmol

$Y_{x,asp}$  : Rendimiento de la formación de biomasa a partir de Aspartato [=]  
célula/mmol

$Y_{glyc,glc}$  : Rendimiento de la glicólisis a partir de Glucosa [=] célula/mmol

$Y_{tca,glc}$  : Rendimiento del ciclo tca a partir de Glucosa [=] célula/mmol

$Y_{tca,glu}$  : Rendimiento del ciclo tca a partir de Glutamato [=] célula/mmol

$m_{glyc,glc}$  : Término de mantenimiento de la glicólisis a partir de Glucosa [=]  
mmol/(célula·h)

$m_{tca,glc}$  : Término de mantenimiento del ciclo tca a partir de Glucosa [=]  
mmol/(célula·h)

$m_{tca,glu}$  : Término de mantenimiento del ciclo tca a partir de Glutamato [=]  
mmol/(célula·h)

$C_{arg}$  : Constante de proporcionalidad que relaciona el consumo de Glutamato con  
la transformación de Arginina [=] adimensional

$C_{asn}$  : Constante de proporcionalidad que relaciona el consumo de Glutamato con  
la transformación de Asparragina [=] adimensional

$C_{asp}$  : Constante de proporcionalidad que relaciona el consumo de Glutamato con  
el consumo de Aspartato [=] adimensional

$m_{mAb,x}$  : Producción de mAb [=] mg/(célula·h)

Como se observa en las Ecuaciones (9.1)- (9.22), en este tipo de modelo se tiene en cuenta:

- Balances de materia de células viables, células muertas, mAb.
- Cinéticas de crecimiento y muerte celular (Ec. Monod).
- Balances de nutrientes y metabolitos.

Una vez se han modelizado los datos experimentales y se ha validado que este modelo matemático se ajusta a la realidad del sistema, **mi trabajo consistió en realizar una optimización dinámica del proceso**, donde:

- La variable a maximizar es la concentración de mAb.
- La variable de control es el caudal de entrada al reactor fed-batch,  $F_{in}$ . Se aplicaron diferentes estrategias, como se explicará a continuación.
- Se aplica una restricción al volumen de un  $\pm 10\%$  del volumen inicial.

Teniendo en cuenta este sistema, se realizó la optimización dinámica evaluando la variable de control ( $F_{in}$ ) para diferentes estrategias de optimización. Para ello, se evaluó la influencia de la definición de diferentes intervalos de tiempo, y se diseñaron diferentes controladores (invariante, constante o lineal). Además, se fijaron restricciones del volumen en puntos interiores o exclusivamente en el punto final.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 9.2.

**Tabla 9.2. Concentración de mAb obtenido (mg/L), utilizando diferentes estrategias de optimización.**

[mAb] (mg/L)	CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4	CASO 9	CASO 10	CASO 11
a.1	92.78638	92.55962	92.50674	92.48246	92.90469	93.15057	93.4578
a.2	92.44672	92.44933	92.45103	92.44942	92.44833	92.45139	92.45084
b.1	131.0176	131.3185	131.3871	131.4128	130.8729	130.5538	130.1326
b.2	131.0176	131.3185	131.3871	131.4128	130.8729	130.5538	130.1326
c.1	131.1776	131.3672	131.4138	131.4277	131.0846	130.8985	130.6328
c.2	131.1776	131.3672	131.4138	131.4277	131.0846	130.8985	130.6326

- a.  $F_{in}$  invariante con el tiempo
- b.  $F_{in}$  constante en cada intervalo
- c.  $F_{in}$  lineal en cada intervalo
  - 1. Volumen como restricción en puntos interiores
  - 2. Volumen como restricción en el punto final

CASO 1:  $F_{in}$  / 6h

CASO 2:  $F_{in}$  / 2h

CASO 3:  $F_{in}$  / 1 h

CASO 4:  $F_{in}$  / 40 min

CASO 5\*:  $F_{in}$  / 30 min

CASO 6\*:  $F_{in}$  / 10 min

CASO 7\*:  $F_{in}$  / 5 min

CASO 8\*:  $F_{in}$  / 1 min

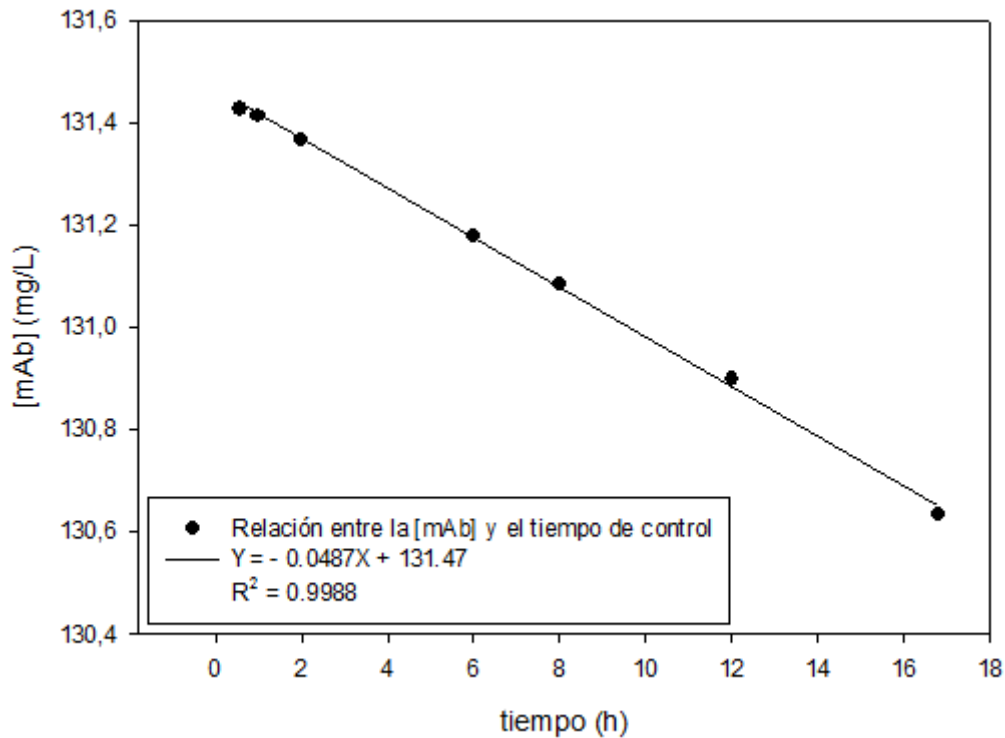
CASO 9:  $F_{in}$  variable (21 intervalos: límite superior  $F_{in}$  8 L/h)

CASO 10:  $F_{in}$  variable (14 intervalos: límite superior  $F_{in}$  12 L/h)

CASO 11:  $F_{in}$  variable (10 intervalos: límite superior  $F_{in}$  16.8 L/h)

\*: No es posible resolver el problema en los casos de  $F_{in}$  constante y lineal en cada intervalo para tiempos de evaluación de la variable de control inferiores a 40 min.

Además, se determinó la relación entre la concentración de mAb producida y el tiempo de evaluación de la variable de control empleada (Figura 9.3).



**Figura 9.3. Relación entre la concentración de mAb producida y el tiempo de control empleado en la optimización.**

Por tanto, se obtiene que la producción máxima de mAb es 131.4138 mg/L, para un tiempo de control de 40 min. Se puede concluir que cuanto menor es el tiempo de control, mayor es la cantidad de mAb producido.

### **9.2.2 Modificación del modelo incluyendo los términos de la cinética de formación de agregados y fragmentos.**

En el proceso de producción de anticuerpos monoclonales se forman, además, otras especies no deseadas: agregados y fragmentos.

Los agregados se generan por interacción entre proteínas o, en este caso, entre IgG4 mediante un mecanismo de oligomerización. Por otra parte, los fragmentos son secciones del mAb que no se han unido en su totalidad. Para poder utilizar el mAb con fines terapéuticos es imprescindible la purificación del mismo, que se realiza mediante cromatografía, generalmente por cromatografía de afinidad con Proteína A.

Por ello, es necesario conocer la cantidad de agregados y fragmentos que hay en el cultivo, para poder diseñar y controlar el proceso posterior de downstream.

En este caso, a partir del modelo anterior que determina la generación de mAb mediante el cultivo de células NSO en un reactor fed-bach, se realizó la modificación del modelo añadiendo términos de formación de agregados y fragmentos, y se realizó la optimización utilizando la estrategia más realista.

Para ello, se realizó una búsqueda bibliográfica para obtener los datos necesarios, a partir de los cuales es posible calcular las constantes cinéticas de formación de agregados y fragmentos.

Según bibliografía, la cinética de formación de agregados puede considerarse como una cinética de segundo orden, mientras que en el caso de la formación de fragmentos, la cinética es de primer orden [222, 223]:

$$\frac{d[Aggr]}{dt} = k_{Aggr} [mAb_{Total}]^2 \quad (9.23)$$

$$\frac{d[Frag]}{dt} = k_{Frag} [mAb_{Total}] \quad (9.24)$$

Y calculando las constantes de formación de agregados y fragmentos, se obtiene:

$$k_{Aggr} = 1.3392 \cdot 10^{-7} L / mg \cdot h \quad (9.25)$$

$$k_{Frag} = 1.0298 \cdot 10^{-3} h^{-1} \quad (9.26)$$

Además, se optimizó este modelo teniendo en cuenta las variables reales del proceso: Volumen limitado en todo el proceso, variable de control ( $F_{in}$ ) constante en

cada intervalo propuesto, corriente de salida correspondiente a la toma de muestra, de 1 ml cada 6h.

Se han utilizado diferentes límites superiores y suposiciones iniciales de la variable de control ( $F_{in}$ ).

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 9.3:

**Tabla 9.3. Concentración de mAb obtenido (mg/L) utilizando diferentes estrategias de optimización.**

mAb (mg/ml)	Suposición inicial = 0 L/h Límite superior= 0.001 L/h	Suposición inicial = 0.001 L/h Límite superior = 0.001 L/h	Suposición inicial = 0 L/h Límite superior = 10 L/h
Fin / 6h	139.1879	139.3038	140.0834
Fin / 2h	138.7578	139.3097	140.1472
Fin / 1h	138.7112	139.2374	140.2002
Fin / 40 min	138.9012	139.4268	140.1488
Fin variable (21 intervalos)	138.6236	NO RESUELTO	138.9953
Fin variable (14 intervalos)	139.0851	139.4823	140.2102
Fin variable (20 intervalos)	139.6859	139.8907	140.1996

Por tanto, el resultado óptimo se obtiene en el caso de 14 intervalos variables, en el que el valor inicial estimado es 0 L/h y el límite superior ( $F_{in}$  máximo) es 10 L/h, con pulsos constantes y manteniendo el volumen entre 0.18-0.22 L en todo el proceso.



### 9.2.3 Optimización dinámica y “cierre del ciclo” de un modelo creado a partir de datos experimentales del grupo de investigación BSEL.

En este caso, el grupo de investigación BSEL obtuvo los datos experimentales, linealizó el modelo, realizó y diseñó la estrategia de control. Por último, mi trabajo consistió en realizar la optimización dinámica que demostró que el modelado y la estrategia de control se habían hecho de forma óptima. Es decir, se aplicó PAROC en toda su esencia.

El modelo linealizado consta de 22 ecuaciones y 22 incógnitas (Tabla 9.1.), y se realizó la optimización dinámica del modelo a partir de la estrategia más realista (Tabla 9.4).

**Tabla 9.1. Modelo matemático que describe el sistema upstream.**

$\frac{dV}{dt} = F_{in} - F_{out}$	(9.1)
$\frac{dVX_v}{dt} = VX_v (\mu - \mu_d) - F_{out} X_v$	(9.2)
$\frac{dVX_d}{dt} = VX_v \mu_d - F_{out} X_d$	(9.3)
$\mu = \mu_{max} \left( \frac{[GLC]}{K_{glc} + [GLC]} \right) \left( \frac{[GLU]}{K_{glu} + [GLU]} + \frac{[ARG]}{K_{arg} + [ARG]} \right) \left( \frac{[ASP]}{K_{asp} + [ASP]} + \frac{[ASN]}{K_{asn} + [ASN]} \right)$	(9.4)
$\mu_d = \mu_{d,max} \left( \frac{K_{glc,lim}}{K_{glc,lim} + [GLC]} \right) \left( \frac{K_{glu,lim}}{K_{glu,lim} + [GLU]} + \frac{K_{arg,lim}}{K_{arg,lim} + [ARG]} \right) \left( \frac{K_{asp,lim}}{K_{asp,lim} + [ASP]} + \frac{K_{asn,lim}}{K_{asn,lim} + [ASN]} \right)$	(9.5)
$\frac{d(V[GLC])}{dt} = -VX_v (Q_{x,glc} + Q_{glyc,glc} + Q_{ica,glc}) + F_{in} [GLC]_{in} - F_{out} [GLC]$	(9.6)
$Q_{x,glc} = \frac{\mu}{Y_{x,glc}}$	(9.7)

Tabla 9.1. Modelo matemático que describe el sistema upstream.

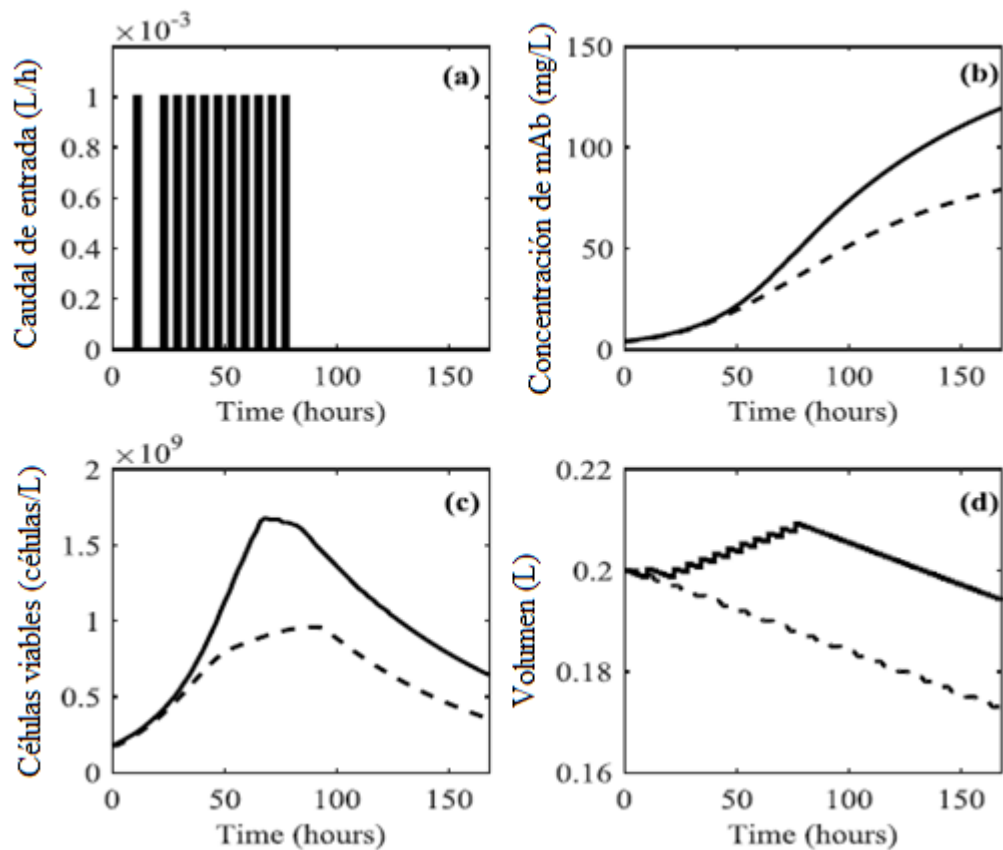
$Q_{glyc,glc} = (1 - Q_{MET}) \left( \frac{\mu}{Y_{glyc,glc}} + m_{glyc,glc} \right)$	(9.8)
$Q_{MET} = \frac{K_{MET}}{K_{MET} + [GLU]}$	(9.9)
$Q_{ica,glc} = \frac{\mu}{Y_{ica,glc}} + m_{ica,glc}$	(9.10)
$\frac{d(V[LAC])}{dt} = VX_v \cdot 2 \cdot Q_{glyc,glc} - F_{out} [LAC]$	(9.11)
$\frac{d(V[GLU])}{dt} = VX_v (Q_{glu,arg} - Q_{x,glu} - Q_{ica,glu}) + F_{in} [GLU]_{in} - F_{out} [GLU]$	(9.12)
$Q_{glu,arg} = C_{arg} Q_{ica,glu}$	(9.13)
$Q_{x,glu} = \frac{\mu}{Y_{x,glu}}$	(9.14)
$Q_{ica,glu} = \frac{\mu}{Y_{ica,glu}} + m_{ica,glu}$	(9.15)
$\frac{d(V[ARG])}{dt} = -VX_v (Q_{glu,arg} + Q_{x,arg}) + F_{in} [ARG]_{in} - F_{out} [ARG]$	(9.16)
$\frac{d(V[ASP])}{dt} = VX_v (Q_{asp,asn} - Q_{x,asp} + Q_{ica,asp}) + F_{in} [ASP]_{in} - F_{out} [ASP]$	(9.17)
$Q_{asp,asn} = C_{asn} Q_{ica,glu}$	(9.18)
$Q_{x,asp} = \frac{\mu}{Y_{x,asp}}$	(9.19)
$Q_{ica,asp} = C_{asp} Q_{ica,glu}$	(9.20)
$\frac{d(V[ASN])}{dt} = -VX_v (Q_{asp,asn} + Q_{x,asn}) + F_{IN} [ASN]_{in} - F_{out} [ASN]$	(9.21)
$\frac{d(V[mAb])}{dt} = VX_v m_{mAb,x}$	(9.22)

**Tabla 9.4. Formulación de la optimización dinámica ejecutada para la maximización de la productividad del sistema de cultivo celular GS-NSO.**

Función objetivo	<b>max [mAb]</b>
<i>Sujeto a</i>	
Modelo del proceso:	$x_i(t) = f_i(X_j(t), u(t), t),$ $i, j = 1 \dots 10$
Variable de control:	$u(t) = F_{in}(t)$
Restricciones:	$0.9 \times V_0 \leq V \leq 1.1 \times V_0$
	$F_{LB} \leq F_{in} \leq F_{UB}$
Condiciones iniciales:	
$V_0 = 0.2 L$	$X_{V,0} = 1.78 \times 10^8$ células/L
$[mAb]_0 = 4.06$ mg/L	$X_{D,0} = 4.4 \times 10^7$ células/L
$[GLC]_0 = 19.8$ mM	$[GLU]_0 = 1.03$ mM
$[ASP]_0 = 0.45$ mM	$[ASN]_0 = 1.03$ mM
$[ARG]_0 = 0.99$ mM	$[LAC]_0 = 0.73$ mM
Cantidad total retirada por la toma de muestra:	$F_{out,tot} = 28$ mL

Se propuso una estrategia de evaluación de la variable de control cada 2h, una salida para toma de muestra de 1ml cada 6h, con un tiempo total de proceso de 168h.

Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 9.4.



**Figura 9.4. Resultados de la simulación después de realizar la optimización dinámica para un cultivo durante 168h (a) estrategia de alimentación óptima, (b) concentración de mAb en el reactor batch (- -) y fed-batch (-), (c) población de células en el reactor batch (- -) y fed-batch (-) y (d) volumen del cultivo en el reactor batch (- -) y fed-batch (-).**

Los datos obtenidos concuerdan con la estrategia del controlador propuesta (realizada con la plataforma go:MatLab), lo que demuestra que es la óptima [7].

Mi trabajo consistió en la simulación y optimización del modelo de producción de anticuerpos monoclonales con el fin de validar que el modelo estaba bien simplificado y linealizado y, el sistema de control, bien diseñado.

### 9.3 CONCLUSIONES.

- A la hora de realizar la modelización y el control de un modelo dinámico complejo, el esquema PAROC proporciona una estrategia que simplifica el modelo y facilita el control del proceso.
- Es posible obtener un modelo simplificado de la producción de mAb mediante el cultivo de células GS-NSO considerando 6 aminoácidos básicos, que se ajusta de forma satisfactoria a los resultados experimentales obtenidos y con el que se puede trabajar *in-silico*.
- La herramienta de optimización gPROMS<sup>®</sup> permite realizar la optimización dinámica de un sistema con diferentes estrategias de alimentación y restricciones en el controlador.
- Se ha introducido un modelo de agregados y fragmentos que servirá a la hora de diseñar el proceso de captura o *downstream*.
- Los datos obtenidos mediante optimización dinámica demuestran que la estrategia de control aplicada es la óptima y que funciona convenientemente.



## **Capítulo 10.**

### **Conclusiones**





De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, a continuación se enumeran las conclusiones más importantes:

- Se ha **desarrollado un soporte monolítico macroporoso** con propiedades que hacen que sea **adecuado para su utilización en cromatografía de afinidad**: una elevada área superficial, alta porosidad, buena resistencia mecánica que facilita su operación con una velocidad elevada sin generar problemas de pérdida de carga.

Además, ha sido activado y modificado químicamente para ser utilizado como soporte en **cromatografía IMAC**, y ha demostrado **interaccionar de forma altamente específica con** las biomoléculas estudiadas, ya que no se produce retención de biomolécula en el monolito (tanto activado como sin activar) cuando no hay presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ .

- La **caracterización del monolito** se realizó mediante métodos de procesado de imagen utilizando *ImageJ*. Estos resultados se compararon con los obtenidos aplicando otros métodos utilizados en bibliografía, manifestando que **el método de procesado de imagen es válido para la determinación de estos parámetros**.
- Se ha **validado su utilización como soporte cromatográfico** en procesos de adsorción-elución de la proteína tipo **BSA** mediante **cromatografía IMAC**.

Este monolito ha sido **reutilizado hasta 20 ciclos sin ser regenerado** y con unos **rendimientos constantes**, tanto de adsorción como de elución, y el tiempo necesario para ambos procesos permanece constante a lo largo de los 20 ciclos.

Además, se ha observado que **al aumentar el caudal de elución se mejora el rendimiento de elución** ya que se mejora la transferencia de materia, y el equilibrio de elución se desplaza hacia la enzima libre.

- Además, este monolito se ha utilizado para purificar la enzima Catalasa, durante hasta **14 ciclos** sin necesidad de regenerar el soporte y con unos rendimientos de adsorción y elución constantes. Sin embargo, teniendo en cuenta factores económicos, a partir del ciclo 14 es más rentable regenerar la columna y volver a cargar el ion metálico.

El tiempo necesario para el proceso de adsorción aumenta con el número de reutilización, lo que se podría deber a que **algunos centros activos no se encuentren disponibles por la presencia de moléculas de enzima que no se han eluido de forma exitosa, o a la presencia de imidazol que no ha sido retirado de forma efectiva.**

Además, al igual que en el caso de la BSA, al **aumentar el caudal de elución se recupera mayor cantidad de proteína**, como consecuencia de que se mejora la transferencia de materia, y el equilibrio de elución se desplaza hacia la enzima libre.

La Catalasa presenta una pérdida de actividad tras el proceso cromatográfico, que viene dada por varios efectos tales como el pH, la fuerza iónica (I), la presencia de imidazol, y el efecto del proceso cromatográfico que podría ser consecuencia de la presencia del  $\text{Cu}^{2+}$  que interacciona con la enzima.

Cuando la Catalasa se pone en contacto con iones  $\text{Cu}^{2+}$ , se podría producir un intercambio entre el  $\text{Fe}^{3+}$  que forma parte del grupo Hemo, y el  $\text{Cu}^{2+}$ , lo que originaría que la estructura cuaternaria de la Catalasa se modificase. La Catalasa presenta una estructura con cuatro subunidades idénticas unidas por un grupo Hemo. Si este grupo Hemo se desestabiliza, es probable que la enzima se divida en sus subunidades, hecho que se ha comprobado con el Western-Blott.

- Como consecuencia de lo mencionado previamente, **la Catalasa no es una enzima apropiada para su purificación mediante cromatografía IMAC** cuando se pretende utilizar en etapas posteriores, ya que en el proceso de elución

su estructura se ve dañada de forma importante, separándose en subunidades. Sin embargo, una alternativa interesante es la **inmovilización de Catalasa**, ya que mejora los parámetros de la cinética enzimática [160, 187, 188, 194-196] respecto a los valores de la enzima libre.

- Se ha demostrado que el **ligando** es **estable** a lo largo de todo el proceso, al menos durante 20 ciclos, y **no hay pérdida** cuantificable del mismo, lo que elimina la mayor desventaja de este método cromatográfico.
- La **pérdida de carga** generada por este monolito presenta valores muy bajos teniendo en cuenta las dimensiones del soporte cromatográfico y el flujo volumétrico empleado.
- Se estudió la **isoterma de adsorción de la BSA**, obteniéndose que las condiciones de trabajo son de disolución diluída y zona lineal de la isoterma de Langmuir.
- **Se determinó la transferencia de materia en el proceso de adsorción**, obteniéndose los datos de resistencia a la transferencia externa, interna y cinética, concluyéndose que no hay una etapa limitante sino que la resistencia global es consecuencia de las tres resistencias donde ninguna puede ser despreciada.
- Mediante el presente trabajo se ha demostrado la viabilidad de este monolito como soporte cromatográfico para cromatografía IMAC, fácilmente escalable y con propiedades y rendimientos mejorados y apropiados para su utilización en cromatografía preparativa.



## **Capítulo 11.**

## **Bibliografía**



1. Hearn, M. T., and Acosta, D. (2001) Applications of novel affinity cassette methods: use of peptide fusion handles for the purification of recombinant proteins, *Journal of Molecular Recognition* 14, 323-369.
2. Berg, J., Tymoczko, J., y Stryer, L. (2002) Biochemistry, Fifth ed., W.H. Freeman, New York.
3. Schustolla, D., Deckwer, W. D., Schügerl, K., y Hustedt, H. (1992) Enzyme purification by immobilized metal ion affinity partitioning-application to D-hydroxyisocaproate dehydrogenase, *Bioseparation* 3, 167-175.
4. Joong Kwon, Y., y Hatti-Kaul, R. (1999) Protein separation using metal ion-bound particles in aqueous two-phase system, *Biotechnology Techniques* 13, 145-148.
5. Van Dam, M. E., Wuenschell, G. E., y Arnold, F. H. (1989) Metal affinity precipitation of proteins, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 11, 492-502.
6. Jungbauer, A. (2005) Chromatographic media for bioseparation, *Journal of Chromatography A* 1065, 3-12.
7. Acikara, O. z. B., Çitoğlu, G. l. i. S., Özbilgin, S., y Ergene, B. i. (2013) Affinity Chromatography and Importance in Drug Discovery, In *Column Chromatography* (Martin, D. F., and Martin, B. B., Eds.), pp 59-98, InTech, Rijeka.
8. Spross, J., y Sinz, A. (2011) Monolithic media for applications in affinity chromatography, *Journal of Separation Science* 34, 1958-1973.
9. Hage, D. S., Anguizola, J. A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., Pfaunmiller, E., Vargas, J., y Zheng, X. (2012) Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 69, 93-105.
10. Ayyar, B. V., Arora, S., Murphy, C., y O'Kennedy, R. (2012) Affinity chromatography as a tool for antibody purification, *Methods* 56, 116-129.
11. Hage, D. S. (1999) Affinity chromatography: a review of clinical applications, *Clinical Chemistry* 45, 593-615.

12. Magdeldin, S., Moser, A. (2012) Affinity Chromatography: Principles and Applications In *Affinity Chromatography* ((Ed.), D. S. M., Ed.).
13. Ueda, E. K. M., Gout, P. W., y Morganti, L. (2003) Current and prospective applications of metal ion–protein binding, *Journal of Chromatography A* 988, 1-23.
14. Černigoj, U., Vidic, U., Nemeč, B., y col. (2016) Characterization of methacrylate chromatographic monoliths bearing affinity ligands, *Journal of Chromatography A* 1464, 72-78.
15. Porath, J., Carlsson, J. A. N., Olsson, I., y Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature* 258, 598-599.
16. Chaga, G. S. (2001) Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 49, 313-334.
17. Arnold, F. H. (1991) Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing, *Nature Biotechnology* 9, 151-156.
18. Porath, J. (1992) Immobilized metal ion affinity chromatography, *Protein expression and purification* 3, 263-281.
19. Porath, J. (1988) IMAC—Immobilized metal ion affinity based chromatography, *Trends in Analytical Chemistry* 7, 254-259.
20. Graslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., y Col. (2008) Protein production and purification, *Nature methods* 5, 135-146.
21. Yip, T. T., Nakagawa, Y., y Porath, J. (1989) Evaluation of the interaction of peptides with Cu(II), Ni(II), and Zn(II) by high-performance immobilized metal ion affinity chromatography, *Analytical biochemistry* 183, 159-171.
22. Ghosh, R. (2002) Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges, *Journal of Chromatography A* 952, 13-27.
23. Hermanson, G. T., Mallia, A. K., y Smith, P. K. (1992) *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press.



- 
24. Nordborg, A., y Hilder, E. F. (2009) Recent advances in polymer monoliths for ion-exchange chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394, 71-84.
  25. Guiochon, G. (2007) Monolithic columns in high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1168, 101-168.
  26. Mallik, R., y Hage, D. S. (2006) Affinity monolith chromatography, *Journal of Separation Science* 29, 1686-1704.
  27. Kalashnikova, I., Ivanova, N., y Tennikova, T. (2007) Macroporous monolithic layers as efficient 3-D microarrays for quantitative detection of virus-like particles, *Analytical chemistry* 79, 5173-5180.
  28. Larsson, P. O. (1984) High-performance liquid affinity chromatography, *Methods in enzymology* 104, 212-223.
  29. Wu, Y., Abraham, D., y Carta, G. (2016) Comparison of perfusion media and monoliths for protein and virus-like particle chromatography, *Journal of Chromatography A* 1447, 72-81.
  30. Pfaunmiller, E. L., Paulemond, M. L., Dupper, C. M., y Hage, D. S. (2013) Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405, 2133-2145.
  31. Tetala, K. K. R., Skrzypek, K., Levisson, M., y Stamatialis, D. F. (2013) A metal ion charged mixed matrix membrane for selective adsorption of hemoglobin, *Separation and Purification Technology* 115, 20-26.
  32. Júnior, W. F. d. S., Cano, R., Totola, A. H., Carvalho, L. M. d., Cerri, M. O., Coimbra, J. S. d. R., Carvalho, G. G. P. d., y Carvalho, B. M. A. d. (2015) Adsorption of immunoglobulin Y in supermacroporous continuous cryogel with immobilized Cu<sup>2+</sup> ions, *Journal of Chromatography A* 1395, 16-22.
  33. González-Ortega, O., Porath, J., y Guzmán, R. (2012) Adsorption of peptides and small proteins with control access polymer permeation to affinity binding sites. Part I: Polymer permeation-immobilized metal ion affinity chromatography separation

adsorbents with polyethylene glycol and immobilized metal ions, *Journal of Chromatography A* 1227, 115-125.

34. Vereshchagina, T. A., Fedorchak, M. A., Sharonova, O. M., Fomenko, E. V., Shishkina, N. N., Zhizhaev, A. M., Kudryavtsev, A. N., Frank, L. A., y Anshits, A. G. (2016) Ni<sup>2+</sup>-zeolite/ferrosphere and Ni<sup>2+</sup>-silica/ferrosphere beads for magnetic affinity separation of histidine-tagged proteins, *Dalton Transactions* 45, 1582-1592.

35. Zhu, J., y Sun, G. (2014) Facile Fabrication of Hydrophilic Nanofibrous Membranes with an Immobilized Metal–Chelate Affinity Complex for Selective Protein Separation, *ACS Applied Materials & Interfaces* 6, 925-932.

36. Pavan, G. L., Bresolin, I. T. L., Borsoi-Ribeiro, M., Vijayalakshmi, M., y Bueno, S. M. A. (2014) The effect of NaCl on the adsorption of human IgG onto CM-Asp–PEVA hollow fiber membrane-immobilized nickel and cobalt metal ions, *Adsorption* 20, 677-688.

37. Borsoi-Ribeiro, M., Bresolin, I. T., Vijayalakshmi, M., y Bueno, S. M. (2013) Behavior of human immunoglobulin G adsorption onto immobilized Cu(II) affinity hollow-fiber membranes, *Journal of Molecular Recognition* 26, 514-520.

38. Vega, M. A., Martín del Valle, E. M., Cerro, R. L., y Galán, M. A. (2014) Productivity Model for Separation of Proteins Using Ceramic Monoliths As a Stationary Phase, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 53, 15456-15466.

39. Larsson, P. O. (1998) Super porous polysaccharide gels, US5723601.

40. Lloyd, L. L., y Kennedy, J. F. (1999) *Handbook of HPLC* – Vol. 78, Marcel Dekker Inc., New York, USA.

41. Ioannidis, N., Bowen, J., Pacek, A., and Zhang, Z. (2012) Manufacturing of agarose-based chromatographic adsorbents – Effect of ionic strength and cooling conditions on particle structure and mechanical strength, *Journal of Colloid and Interface Science* 367, 153-160.

42. Gustavsson, P.-E., y Larsson, P.-O. (1999) Continuous superporous agarose beds for chromatography and electrophoresis<sup>1</sup>, *Journal of Chromatography A* 832, 29-39.

- 
43. Gustavsson, P.-E., y Larsson, P.-O. (2001) Continuous superporous agarose beds in radial flow columns, *Journal of Chromatography A* 925, 69-78.
44. Gustavsson, P.-E., Mosbach, K., Nilsson, K., y Larsson, P.-O. (1997) Superporous agarose as an affinity chromatography support, *Journal of Chromatography A* 776, 197-203.
45. Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., y col. (2009) Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review, *Methods in enzymology* 463, 439-473.
46. Bolanos-Garcia, V. M., y Davies, O. R. (2006) Structural analysis and classification of native proteins from E. coli commonly co-purified by immobilized metal affinity chromatography, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1760, 1304-1313.
47. Block, H., Kubicek, J., Labahn, J., Roth, U., y Schafer, F. (2008) Production and comprehensive quality control of recombinant human Interleukin-1beta: a case study for a process development strategy, *Protein expression and purification* 57, 244-254.
48. Lewinson, O., Lee, A. T., y Rees, D. C. (2008) The funnel approach to the pre-crystallization production of membrane proteins, *Journal of Molecular Biology* 377, 62-73.
49. Gaberc-Porekar, V., and Menart, V. (2001) Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 49, 335-360.
50. Wang, W. (1999) Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals, *International journal of pharmaceutics* 185, 129-188.
51. Gaberc-Porekar, V., Menart, V., Jevševar, S., Videnšek, A., y Štalc, A. (1999) Histidines in affinity tags and surface clusters for immobilized metal-ion affinity chromatography of trimeric tumor necrosis factor  $\alpha$ , *Journal of Chromatography A* 852, 117-128.
52. Vega, M., Elviro, M., Valle, E.-M. M. d., Cerro, R., y Galán, M. Á. (2017) Kinetic and Mass Transfer Model for Separation of Protein Using Ceramic Monoliths as a Stationary Phase, *Chemical Engineering Communications*.

53. Vega Moreno, M. A. (2013) Desarrollo de nuevos sistemas para el cambio de escala en cromatografía de afinidad, Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca.
54. Carta, G., y Jungbauer, A. (2010) Downstream Processing of Biotechnology Products, In *Protein Chromatography*, pp 1-55, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
55. Voet, D., y Voet, J. G. (2006) *Bioquímica*, Ed. Médica Panamericana.
56. Hage, D. S. (2015) Affinity Separations☆, In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier.
57. Arora, S., Saxena, V., y Ayyar, B. V. (2016) Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification, *Methods*.
58. Jackson, A. J., Xuan, H., y Hage, D. S. (2010) Entrapment of proteins in glycogen-capped and hydrazide-activated supports, *Analytical biochemistry* 404, 106-108.
59. Avnir, D., Coradin, T., Lev, O., y Livage, J. (2006) Recent bio-applications of sol-gel materials, *Journal of Materials Chemistry* 16, 1013-1030.
60. Haginaka, J. (2008) Monodispersed, molecularly imprinted polymers as affinity-based chromatography media, *Journal of Chromatography B* 866, 3-13.
61. Hearon, J. Z. (1948) The configuration of cobaltodihistidine and oxy-bis (cobaltodihistidine), *Journal of the National Cancer Institute* 9, 1-11.
62. Sulkowski, E. (1985) Purification of proteins by IMAC, *Trends in Biotechnology* 3, 1-7.
63. Hochuli, E., Dobeli, H., y Schacher, A. (1987) New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues, *Journal of chromatography* 411, 177-184.
64. Hochuli, E., Bannwarth, W., Dobeli, H., Gentz, R., y Stuber, D. (1988) Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent, *Nature Biotechnology* 6, 1321-1325.

- 
65. Wong, J. W., Albright, R. L., y Wang, N.-H. L. (1991) Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) Chemistry and Bioseparation Applications, *Separation and Purification Methods* 20, 49-106.
66. Porath, J. (1978) Explorations into the field of charge-transfer adsorption, *Journal of Chromatography A* 159, 13-24.
67. Borrebaeck, C. A. K., Lönnnerdal, B., y Etzler, M. E. (1981) Metal chelate affinity chromatography of the Dolichos biflorus seed lectin and its subunits, *FEBS Letters* 130, 194-196.
68. Coulet, P. R., Carlsson, J., y Porath, J. (1981) Immobilization of enzymes on metal-chelate regenerable carriers, *Biotechnology and Bioengineering* 23, 663-668.
69. Lönnnerdal, B., y Keen, C. (1982) Metal chelate affinity chromatography of proteins, *Journal of Applied Biochemistry* 4, 203-208.
70. Small, D. A. P., Atkinson, T., y Lowe, C. R. (1983) High performance metal chelate chromatography A2 In *Affinity Chromatography and Biological Recognition* (Wilchek, M., and Parikh, I., Eds.), pp 267-268, Academic Press.
71. Porath, J., y Belew, M. (1983) IMA-Chromatography (Immobilized Ion Affinity Chromatography): Reflections of Methodological development, In *Affinity Chromatography and Biological Recognition* (Wilchek, M., and Parikh, I., Eds.), pp 173-189, Academic Press.
72. Porath, J., y Olin, B. (1983) Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions, *Biochemistry* 22, 1621-1630.
73. Muszynska, G., Andersson, L., y Porath, J. (1986) Selective adsorption of phosphoproteins on gel-immobilized ferric chelate, *Biochemistry* 25, 6850-6853.
74. Kato, Y., Nakamura, K., y Hashimoto, T. (1986) High-performance metal chelate affinity chromatography of proteins, *Journal of Chromatography A* 354, 511-517.

75. Muszyńska, G., Zhao, Y. J., y Porath, J. (1986) Carboxypeptidase a: a model for studying the interaction of proteins with immobilized metal ions, *Journal of Inorganic Biochemistry* 26, 127-135.
76. Corradini, D., El Rassi, Z., Horváth, C., Guerra, G., y Horne, W. (1988) Combined lectin-affinity and metal-interaction chromatography for the separation of glycoproteins by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 458, 1-11.
77. El Rassi, Z., y Horváth, C. (1986) Metal chelate-interaction chromatography of proteins with iminodiacetic acid-bonded stationary phases on silica support, *Journal of Chromatography A* 359, 241-253.
78. Hutchens, T. W., y Porath, J. O. (1987) Protein recognition of immobilized ligands: promotion of selective adsorption, *Clinical Chemistry* 33, 1502-1508.
79. Belew, M., Yip, T.-T., Andersson, L., y Porath, J. (1987) Interaction of proteins with immobilized Cu<sup>2+</sup>: Quantitation of adsorption capacity, adsorption isotherms and equilibrium constants by frontal analysis, *Journal of Chromatography A* 403, 197-206.
80. Belew, M., Yip, T. T., Andersson, L., y Ehrnström, R. (1987) High-performance analytical applications of immobilized metal ion affinity chromatography, *Analytical biochemistry* 164, 457-465.
81. Krishnan, S., Vijayalakshmi, M. A., y Geahel, I. (1987) Semi-preparative-scale isolation of carboxypeptidase iso-enzymes from *Aspergillus niger* by a single metal chelate affinity chromatographic step, *Journal of Chromatography A* 397, 339-346.
82. Hutchens, T. W., y Yip, T.-T. (1990) Protein interactions with immobilized transition metal ions: Quantitative evaluations of variations in affinity and binding capacity, *Analytical biochemistry* 191, 160-168.
83. Hara, T., Tsukagoshi, K., y Yoshida, T. (1988) The Determination of a Small Amount of Biological Constituent by the Use of Chemiluminescence. XIII. High Sensitive Metal Chelate Affinity Chromatography, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 61, 2779-2783.

- 
84. Al-Mashikhi, S. A., y Nakai, S. (1988) Separation of Immunoglobulin and Transferrin from Blood Serum and Plasma by Metal Chelate Interaction Chromatography, *Journal of Dairy Science* 71, 1756-1763.
85. Al-Mashikhi, S. A., Li-Chan, E., y Nakai, S. (1988) Separation of Immunoglobulins and Lactoferrin from Cheese Whey by Chelating Chromatography, *Journal of Dairy Science* 71, 1747-1755.
86. Chaga, G., Andersson, L., Ersson, B., y Porath, J. (1989) Purification of Two Muscle Enzymes by Chromatography on Immobilized Ferric Ions, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 11, 424-431.
87. Hemdan, E. S., Zhao, Y. J., Sulkowski, E., y Porath, J. (1989) Surface topography of histidine residues: a facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 1811-1815.
88. Sulkowski, E. (1989) The saga of IMAC and MIT, *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 10, 170-175.
89. Chicz, R. M., y Regnier, F. E. (1989) Immobilized-metal affinity and hydroxyapatite chromatography of genetically engineered subtilisin, *Analytical chemistry* 61, 1742-1749.
90. Utsumi, J., Yamamoto-Terasawa, I., Yamazaki, S., y Shimizu, H. (1989) Elimination of contaminating Escherichia coli peptides in the purification of Escherichia coli-derived recombinant human interferon- $\beta$ 1 by zinc chelate affinity chromatography, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 490, 193-197.
91. Hutchens, T. W., y Yip, T.-T. (1990) Differential interaction of peptides and protein surface structures with free metal ions and surface-immobilized metal ions, *Journal of Chromatography A* 500, 531-542.
92. Boyer, R. F., Generous, S. M., Nieuwenhuis, T. J., y Ettinger, R. A. (1990) Selective adsorption of apoferritin on immobilized Fe(III): demonstration of Fe(III) binding sites, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 12, 79-84.

93. Suh, S.-S., y Arnold, F. H. (1990) A mathematical model for metal affinity protein partitioning, *Biotechnology and Bioengineering* 35, 682-690.
94. Porath, J. (1992) Immobilized metal ion affinity chromatography, *Protein expression and purification* 3, 263-281.
95. Winzerling, J. J., Berna, P., y Porath, J. (1992) How to use immobilized metal ion affinity chromatography, *Methods* 4, 4-13.
96. Pearson, R. G. (1973) *Hard and soft acids and bases*, Vol. 2, Van Nostrand Reinhold.
97. Sundberg, R. J., y Martin, R. B. (1974) Interactions of histidine and other imidazole derivatives with transition metal ions in chemical and biological systems, *Chemical Reviews* 74, 471-517.
98. Smith, M. C., Furman, T. C., y Pidgeon, C. (1987) Immobilized iminodiacetic acid metal peptide complexes. Identification of chelating peptide purification handles for recombinant proteins, *Inorganic Chemistry* 26, 1965-1969.
99. Schneider, R. P., Zürcher, F., Egli, T., y Hamer, G. (1989) Ion chromatography method for iminodiacetic acid determination in biological matrices in the presence of nitrilotriacetic acid, *Journal of Chromatography A* 462, 293-301.
100. Klapper, M. H. (1977) The independent distribution of amino acid near neighbor pairs into polypeptides, *Biochemical and biophysical research communications* 78, 1018-1024.
101. Prasanna Rajasekar, R., y Vijayalakshmi Mookambeswaran, A. (2010) Immobilized metal-ion affinity systems for recovery and structure–function studies of proteins at molecular, supramolecular, and cellular levels, In *Pure and Applied Chemistry*, p 39.
102. Figueroa, A., Corradini, C., Feibush, B., y Karger, B. L. (1986) High-performance immobilized-metal affinity chromatography of proteins on iminodiacetic acid silica-based bonded phases, *Journal of chromatography* 371, 335-352.



- 
103. el Rassi, Z., y Horvath, C. (1986) Metal chelate-interaction chromatography of proteins with iminodiacetic acid-bonded stationary phases on silica support, *Journal of chromatography* 359, 241-253.
104. Hofmeister, F. (1888) Zur lehre von der wirkung der salze, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 25, 1-30.
105. Sulkowski, E. (1996) Immobilized metal-ion affinity chromatography: Imidazole proton pump and chromatographic sequelae. I. Proton pump, *Journal of Molecular Recognition* 9, 389-393.
106. Sulkowski, E. (1996) Immobilized metal-ion affinity chromatography: Imidazole proton pump and chromatographic sequelae. II. Chromatographic sequelae, *Journal of Molecular Recognition* 9, 494-498.
107. Laboureau, E., y Vijayalakshmi, M. (1997) Concerning the separation of mammalian cells in immobilized metal ion affinity partitioning systems: a matter of selectivity, *Journal of Molecular Recognition* 10, 262-268.
108. Haupt, K., Roy, F., y Vijayalakshmi, M. A. (1996) Immobilized Metal Ion Affinity Capillary Electrophoresis of Proteins—A Model for Affinity Capillary Electrophoresis Using Soluble Polymer-Supported Ligands, *Analytical biochemistry* 234, 149-154.
109. Baek, W.-O., Haupt, K., Colin, C., y Vijayalakshmi, M. A. (1996) Immobilized metal ion affinity gel electrophoresis: Quantification of protein affinity to transition metal chelates, *Electrophoresis* 17, 489-492.
110. Sulkowski, E., Vastola, K., Oleszek, D., y Von Muenchhausen, W. (1982) Surface topography of interferons: a probe by metal chelate chromatography, In *Analytical Chemistry Symposium Series*, pp 313-322.
111. Min, C., y Verdine, G. L. (1996) Immobilized Metal Affinity Chromatography of DNA, *Nucleic Acids Research* 24, 3806-3810.

112. Smith, T. H., LaTour, J. V., Bochkariov, D., Chaga, G., y Nelson, P. S. (1999) Bifunctional Phosphoramidite Reagents for the Introduction of Histidyl and Dihistidyl Residues into Oligonucleotides, *Bioconjugate Chemistry* 10, 647-652.
113. Lee, Y.-M., Venkataraman, K., Hwang, S.-I., Han, D. K., y Hla, T. (2007) A novel method to quantify sphingosine 1-phosphate by immobilized metal affinity chromatography (IMAC), *Prostaglandins & other lipid mediators* 84, 154-162.
114. Takeda, N., Matsuoka, T., y Gotoh, M. (2010) Potentiality of IMAC as Sample Pretreatment Tool in Food Analysis for Veterinary Drugs, *Chromatographia* 72, 127-131.
115. Dam, M., Wuenschell, G., y Arnold, F. (1989) Metal affinity precipitation of proteins, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 11, 492-502.
116. Felix, K., Fakelman, F., Hartmann, D., Giese, N. A., Gaida, M. M., Schnolzer, M., Flad, T., Buchler, M. W., y Werner, J. (2011) Identification of serum proteins involved in pancreatic cancer cachexia, *Life sciences* 88, 218-225.
117. Wu, C., Wang, Z., Liu, L., Zhao, P., Wang, W., Yao, D., Shi, B., Lu, J., Liao, P., Yang, Y., y Zhu, L. (2009) Surface enhanced laser desorption/ionization profiling: New diagnostic method of HBV-related hepatocellular carcinoma, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 24, 55-62.
118. Peterka, M., Jarc, M., Banjac, M., Frankovič, V., Benčina, K., Merhar, M., Gaberc-Porekar, V., Menart, V., Štrancar, A., y Podgornik, A. (2006) Characterisation of metal–chelate methacrylate monoliths, *Journal of Chromatography A* 1109, 80-85.
119. Axen, R., Porath, J., y Ernback, S. (1967) Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides, *Nature* 214, 1302-1304.
120. Turková, J., y Turkova, J. (1993) Bioaffinity Chromatography in *Journal of Chromatography Library*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
121. Štamberg, J. (1988) Bead Cellulose, *Separation and Purification Methods* 17, 155-183.

- 
122. Jedliński, Z., y Paprotny, J. (1967) Synthesis and polymerization studies of some N-alkylolacrylamides. III. Polymerization of 2-methacrylamido-2-methylpropanediol-1,3 and 2-methacrylamido-2-methylpropanol-1, *Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry* 5, 2957-2960.
123. Verdoliva, A., Pannone, F., Rossi, M., Catello, S., y Manfredi, V. (2002) Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and protein G, *Journal of Immunological Methods* 271, 77-88.
124. Klein, E., Eichholz, E., y Yeager, D. H. (1994) Affinity membranes prepared from hydrophilic coatings on microporous polysulfone hollow fibers, *Journal of Membrane Science* 90, 69-80.
125. Staak, C., Salchow, F., Clausen, P. H., y Luge, E. (1996) Polystyrene as an affinity chromatography matrix for the purification of antibodies, *Journal of Immunological Methods* 194, 141-146.
126. Wichterle, O., and Lim, D. (1960) Hydrophilic Gels for Biological Use, *Nature* 185, 117-118.
127. Roberts, M. W. H., Ongkudon, C. M., Forde, G. M., y Danquah, M. K. (2009) Versatility of polymethacrylate monoliths for chromatographic purification of biomolecules, *Journal of Separation Science* 32, 2485-2494.
128. Unger, K. (1979) Porous Silica (Journal of Chromatography Library, Vol. 16), Elsevier, Amsterdam.
129. Xi, F., y Wu, J. (2004) Macroporous chitosan layer coated on non-porous silica gel as a support for metal chelate affinity chromatographic adsorbent, *Journal of Chromatography A* 1057, 41-47.
130. Schuster, M., Wasserbauer, E., Neubauer, A., y Jungbauer, A. (2000) High speed immuno-affinity chromatography on supports with gigapores and porous glass, *Bioseparation* 9, 259-268.

131. Serafica, G. C., Belfort, G., y Pimbley, J. (1994) Protein fractionation using fast flow immobilized metal chelate affinity membranes, *Biotechnology and Bioengineering* 43, 21-36.
132. Li, Y., y Garth Spencer, H. (1992) Selective protein separations using Formed-In-Place anion exchange membranes, *Journal of Biotechnology* 26, 203-211.
133. Josic, D., y Clifton, J. G. (2007) Use of monolithic supports in proteomics technology, *Journal of Chromatography A* 1144, 2-13.
134. Jungbauer, A., y Hahn, R. (2004) Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology, *Journal of Separation Science* 27, 767-778.
135. Wang, P. G. (2010) *Monolithic chromatography and its modern applications*, ILM publications.
136. Guiseley, K. B. (1989) Chemical and physical properties of algal polysaccharides used for cell immobilization, *Enzyme and Microbial Technology* 11, 706-716.
137. Normand, V., Lootens, D. L., Amici, E., Plucknett, K. P., y Aymard, P. (2000) New insight into agarose gel mechanical properties, *Biomacromolecules* 1, 730-738.
138. Pines, E., y Prins, W. (1973) Structure-property relations of thermoreversible macromolecular hydrogels, *Macromolecules* 6, 888-895.
139. Muñoz, J., Alfaro, M., y Zapata, I. (2007) Avances en la formulación de emulsiones, *Grasas Aceites* 58, 64-73.
140. Herma, H. (1985) Encyclopedia of emulsion technology. Vol. 1. Basic Theory. Hg. von P. BECHER. ISBN 0-8247-1876-3. New York/Basel: Marcel Dekker Inc. 1983. XIV, 725 S, *Acta Polymerica* 36, 400-400.
141. Evans, D., y Wennerstrom, H. (1994) The colloid domain, where physics, chemistry and biology meet, Wiley-VCH, New York.

142. McClements, D. J. (2004) Protein-stabilized emulsions, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 9, 305-313.
143. Rampon, V., Brossard, C., Mouhous-Riou, N., y col. (2004) The nature of the apolar phase influences the structure of the protein emulsifier in oil-in-water emulsions stabilized by bovine serum albumin.: a front-surface fluorescence study, *Advances in Colloid and Interface Science* 108, 87-94.
144. Laboratorios Conda (2014) D-5 Agarose Manual. Recuperado de: <http://www.condalab.com/pdf/D5agarose.pdf>
145. Gustavsson, P. E., y Son, P. O. (2003) Chapter 6 Monolithic Polysaccharide Materials, In *Journal of Chromatography Library*, pp 121-141.
146. Muñoz, J., y Alfaro, M. (2000) Rheological and phase behaviour of amphiphilic lipids, *Grasas y aceites* 51, 6-25.
147. Friberg, S. (2001) A Few Examples of the Importance of Phase Diagrams for the Properties and Behavior of Emulsions en Sjöblom J.(Ed) *Encyclopedic Handbook of Emulsion Technology*, 47-58, Marcel Dekker. New York.
148. Aveyard, R. (1988) *Emulsions and solubilization*, Vol. 42, John Wiley & Sons, Ltd.
149. St Angelo, A. (1989) A Brief Introduction to Food Emulsions and Emulsifiers en Charalambous G. and Doxastakis, G, *Food emulsifiers*, 1-8.
150. Friberg, S. (1997) Emulsion stability en Friberg SE y Larsson K (Eds.) *Food Emulsions* 3rd Ed, 1-56, Marcel Dekker, New York.
151. Aranberri, I., Binks, B., Clint, J., y Fletcher, P. (2006) Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos, *Revista Iberoamericana de polímeros* 7, 211-231.
152. Rasband, W. (2012) ImageJ: Image processing and analysis in Java, *Astrophysics Source Code Library* 1, 06013.

153. Schneider, C. A., Rasband, W. S., y Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nature Methods* 9, 671-675.
154. West, J. L., y Cameron, I. D. (2006) Using the medical image processing package, ImageJ, for astronomy, *arXiv preprint astro-ph/0611686*.
155. Majorek, K. A., Porebski, P. J., Dayal, A., Zimmerman, M. D., Jablonska, K., Stewart, A. J., Chruszcz, M., y Minor, W. (2012) Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins, *Molecular Immunology* 52, 174-182.
156. Carter, D. C., y Ho, J. X. (1994) Structure of serum albumin, *Advances in protein chemistry* 45, 153-203.
157. De Wolf, F. A., y Brett, G. M. (2000) Ligand-binding proteins: their potential for application in systems for controlled delivery and uptake of ligands, *Pharmacological Reviews* 52, 207-236.
158. Huang, B. X., Kim, H.-Y., y Dass, C. (2004) Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 15, 1237-1247.
159. Alfonso-Prieto, M., Biarnés, X., Vidossich, P., y Rovira, C. (2009) The molecular mechanism of the catalase reaction, *Journal of the American Chemical Society* 131, 11751-11761.
160. Sarı, M., Akgöl, S., Karataş, M., y Denizli, A. (2006) Reversible Immobilization of Catalase by Metal Chelate Affinity Interaction on Magnetic Beads, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 45, 3036-3043.
161. Kirkman, H. N., y Gaetani, G. F. (1984) Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 4343-4347.
162. Montavon, P., Kukic, K. R., y Bortlik, K. (2007) A simple method to measure effective catalase activities: optimization, validation, and application in green coffee, *Analytical biochemistry* 360, 207-215.

- 
163. Chance, B., y Maehly, A. C. (1955) [136] Assay of catalases and peroxidases, *Methods in enzymology* 2, 764-775.
164. Grigoras, A. G. (2017) Catalase immobilization—A review, *Biochemical Engineering Journal* 117, Part B, 1-20.
165. Maj, M., Loewen, P., y Nicholls, P. (1998) E. coli HPII catalase interaction with high spin ligands: formate and fluoride as active site probes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1384, 209-222.
166. Chaga, G. S., Medin, A. S., Chaga, S. G., y Prath, J. O. (1992) Isolation and characterization of catalase from *Penicillium chrysogenum*, *Journal of Chromatography A* 604, 177-183.
167. Emini, E. A., Hughes, J. V., Perlow, D. S., y Boger, J. (1985) Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide, *Journal of virology* 55, 836-839.
168. Hilger, C., Grigioni, F., De Beaufort, C., Michel, G., Freilinger, J., y Hentges, F. (2001) Differential binding of IgG and IgA antibodies to antigenic determinants of bovine serum albumin, *Clinical and experimental immunology* 123, 387-394.
169. Uniprot (2016) UniprotKB, BSA. Base de datos con información relativa a la proteína BSA. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/P02769>.
170. IEDB Analysys Resource (2016) Antibody Epitope Prediction. Recuperado de: <http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/>.
171. Srinivasan, P., Kumar, S. P., Karthikeyan, M., Jeyakanthan, J., Jasrai, Y. T., Pandya, H. A., Rawal, R. M., y Patel, S. K. (2011) Epitope-Based Immunoinformatics and Molecular Docking Studies of Nucleocapsid Protein and Ovarian Tumor Domain of Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Virus, *Frontiers in Genetics* 2, 72.
172. IEDB Analysys Resource (2016) Catalase Antibody Epitope Prediction. Recuperado de: <http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/>.

173. Akram, M., Bhat, I. A., Anwar, S., y Ahmad, A. (2016) Biophysical perspective of the binding of ester-functionalized gemini surfactants with catalase, *International Journal of Biological Macromolecules* 88, 614-623.
174. Murthy, M. R., Reid, T. J., Sicignano, A., Tanaka, N., y Rossmann, M. G. (1981) Structure of beef liver catalase, *Journal of Molecular Biology* 152, 465IN1487-486499.
175. Wang, L., Shen, S., He, X., Yun, J., Yao, K., y Yao, S.-J. (2008) Adsorption and elution behaviors of bovine serum albumin in metal-chelated affinity cryogel beds, *Biochemical Engineering Journal* 42, 237-242.
176. Ferreira, C. M., Pinto, I. S., Soares, E. V., y Soares, H. M. (2015) (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions—a review, *RSC Advances* 5, 30989-31003.
177. Ragsdale, S. (2010) Metal-carbon bonds in enzymes and cofactors, NIH Public Access.
178. Ogura, Y., y Yamazaki, I. (1983) Steady-state kinetics of the catalase reaction in the presence of cyanide, *The Journal of Biochemistry* 94, 403-408.
179. Damodaram, K. J. P., Aurade, R. M., Ayyasamy, A., y Kempraj, V. (2016) Isolation and characterization of catalase isoforms from the mango stone weevil, *Sternochetus mangiferae*, *Journal of Asia-Pacific Entomology* 19, 239-245.
180. Bandyopadhyay, S., y Mukherjee, G. (2003) Fac-mer equilibria of coordinated iminodiacetate (IDA<sup>2-</sup>) in ternary CuII (ida)(H<sup>-</sup> 1B)<sup>-</sup> complex formation (B=imidazole, benzimidazole) in aqueous solution, *Journal of Chemical Sciences* 115, 249-261.
181. Whitaker, J. R., y Granum, P. E. (1980) An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm, *Analytical Biochemistry* 109, 156-159.



- 
182. Beers, R. F., Jr., y Sizer, I. W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *The Journal of Biological Chemistry* 195, 133-140.
183. Li, Y., y Schellhorn, H. E. (2007) Rapid Kinetic Microassay for Catalase Activity, *Journal of Biomolecular Techniques* 18, 185-187.
184. Ochoa-Herrera, V., León, G., Banihani, Q., Field, J. A., y Sierra-Alvarez, R. (2011) Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems, *Science of The Total Environment* 412–413, 380-385.
185. Brewer, G. J. (2010) Risks of Copper and Iron Toxicity during Aging in Humans, *Chemical Research in Toxicology* 23, 319-326.
186. Rahman, M. S., y Islam, M. R. (2009) Effects of pH on isotherms modeling for Cu(II) ions adsorption using maple wood sawdust, *Chemical Engineering Journal* 149, 273-280.
187. Çetinus, Ş. A., Şahin, E., y Saraydin, D. (2009) Preparation of Cu(II) adsorbed chitosan beads for catalase immobilization, *Food Chemistry* 114, 962-969.
188. Tüzmen, N., Kalburcu, T., y Denizli, A. (2012) Immobilization of catalase via adsorption onto metal-chelated affinity cryogels, *Process Biochemistry* 47, 26-33.
189. Dainiak, M. B., Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Hatti-Kaul, R., y Mattiasson, B. (2005) Cell chromatography: Separation of different microbial cells using IMAC supermacroporous monolithic columns, *Biotechnology progress* 21, 644-649.
190. Aydemir, T., y Kuru, K. (2003) Purification and partial characterization of catalase from chicken erythrocytes and the effect of various inhibitors on enzyme activity, *Turkish Journal of Chemistry* 27, 85-98.
191. Uygun, D. A., Uygun, M., Akgöl, S., y Denizli, A. (2015) Reversible adsorption of catalase onto Fe<sup>3+</sup> chelated poly (AAm-GMA)-IDA cryogels, *Materials Science and Engineering: C* 50, 379-385.

192. Yang, L., Jia, L., Zou, H., y Zhang, Y. (1999) Immobilized iminodiacetic acid (IDA)-type Cu<sup>2+</sup>-chelating membrane affinity chromatography for purification of bovine liver catalase, *Biomedical Chromatography* 13, 229-234.
193. Yang, Q., y DePierre, J. W. (1998) Rapid One-Step Isolation of Mouse Liver Catalase by Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography, *Protein expression and purification* 12, 277-283.
194. Akgöl, S., y Denizli, A. (2004) Novel metal-chelate affinity sorbents for reversible use in catalase adsorption, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 28, 7-14.
195. Akgöl, S., Kaçar, Y., Özkara, S., Yavuz, H., Denizli, A., y Arica, M. Y. (2001) Immobilization of catalase via adsorption onto l-histidine grafted functional pHEMA based membrane, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 15, 197-206.
196. Çorman, M. E., Öztürk, N., Tüzmen, N., Akgöl, S., y Denizli, A. (2010) Magnetic polymeric nanospheres as an immobilized metal affinity chromatography (IMAC) support for catalase, *Biochemical Engineering Journal* 49, 159-164.
197. Michaelis, L., y Menten, M. L. (1913) Die kinetik der invertinwirkung, *Biochem. z* 49, 352.
198. Haldane, J. (1930) Enzymes longmans, *Green and Co, UK*.
199. Chang, R. (2005) *Physical chemistry for the biosciences*, University Science Books.
200. Lineweaver, H., y Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants, *Journal of the American Chemical Society* 56, 658-666.
201. Díaz, M., y Díaz, M. (2012) *Ingeniería de Bioprocesos*.
202. Cleland, W. W. (1963) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects* 67, 173-187.

- 
203. Kandukuri, S. S., Noor, A., Ranjini, S. S., y Vijayalakshmi, M. (2012) Purification and characterization of catalase from sprouted black gram (*Vigna mungo*) seeds, *Journal of Chromatography B* 889, 50-54.
204. Scott, W. W. (1939) *Standard Methods Of Chemical Analysis Vol-1-2*, D van Nostrand; New York.
205. Mahmood, T., y Yang, P.-C. (2012) Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting, *North American Journal of Medical Sciences* 4, 429-434.
206. Singh, S. M., y Sivalingam, P. M. (1982) In vitro study on the interactive effects of heavy metals on catalase activity of *Sarotherodon mossambicus* (Peters), *Journal of Fish Biology* 20, 683-688.
207. Smith, J. (1987) Ingeniería de la cinética química, compañía editorial continental, SA de.
208. Hlady, V., Buijs, J., y Jennissen, H. P. (1999) Methods for Studying Protein Adsorption, *Methods in Enzymology* 309, 402-429.
209. Vadgama, P. (2005) *Surfaces and Interfaces for Biomaterials*, CRC Press.
210. Arévalo, E., Rendueles, M., Fernández, A., y Díaz, M. (2000) Equilibrium and simulation of the operation for the adsorption of albumin proteins in an iminodiacetic-Cu bounded ion exchange resin (IMAC), *Separation and Purification Technology* 18, 217-225.
211. Wheeler, A. (1955) Catalysis. Vol. 2. , In *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific Edition)* (Emmett, P. H., Ed.), p 320, Elsevier.
212. Tronconi, E. (1997) Interaction between chemical kinetics and transport phenomena in monolithic catalysts, *Catalysis Today* 34, 421-427.
213. Liu, M.-K., Li, P., y Giddings, J. C. (1993) Rapid protein separation and diffusion coefficient measurement by frit inlet flow field-flow fractionation, *Protein Science* 2, 1520-1531.

214. Kalluri, R. R., Cahela, D. R., y Tatarchuk, B. J. (2009) Comparative heterogeneous contacting efficiency in fixed bed reactors: Opportunities for new microstructured systems, *Applied Catalysis B: Environmental* 90, 507-515.
215. Papathanasiou, M. M., Quiroga-Campano, A. L., Steinebach, F., Elviro, M., Mantalaris, A., y Pistikopoulos, E. N. (2017) Advanced model-based control strategies for the intensification of upstream and downstream processing in mAb production, *Biotechnology Progress*.
216. Pistikopoulos, E. N., Diangelakis, N. A., Oberdieck, R., Papathanasiou, M. M., Nascu, I., y Sun, M. (2015) PAROC—An integrated framework and software platform for the optimisation and advanced model-based control of process systems, *Chemical Engineering Science* 136, 115-138.
217. Kiparissides, A., Koutinas, M., Kontoravdi, C., Mantalaris, A., y Pistikopoulos, E. N. (2011) ‘Closing the loop’ in biological systems modeling—from the in silico to the in vitro, *Automatica* 47, 1147-1155.
218. Acikara, Ö. B., Ergene, B., Çitoğlu, G. S., y Özbilgin, S. (2013) *Affinity Chromatography and Importance in Drug Discovery*, INTECH Open Access Publisher.
219. Campano, A. Q., Papathanasiou, M. M., Pistikopoulos, E. N., y Mantalaris, A. (2016) A Predictive Model for Energy Metabolism and ATP Balance in Mammalian Cells: Towards the Energy-Based Optimization of mAb Production, In *Computer Aided Chemical Engineering* (Zdravko, K., and Miloš, B., Eds.), pp 1581-1586, Elsevier.
220. Papathanasiou, M. M., Quiroga-Campano, A. L., Oberdieck, R., Mantalaris, A., y Pistikopoulos, E. N. (2016) Development of advanced computational tools for the intensification of monoclonal antibody production, In *Computer Aided Chemical Engineering* (Zdravko, K., and Miloš, B., Eds.), pp 1659-1664, Elsevier.
221. Xu, P., Dai, X. P., Graf, E., Martel, R., y Russell, R. (2014) Effects of glutamine and asparagine on recombinant antibody production using CHO-GS cell lines, *Biotechnology Progress* 30, 1457-1468.

222. Vázquez-Rey, M., y Lang, D. A. (2011) Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes, *Biotechnology and Bioengineering* 108, 1494-1508.
223. Vlasak, J., y Ionescu, R. (2011) Fragmentation of monoclonal antibodies, In *MAbs*, pp 253-263, Taylor & Francis.
224. PSE, gPROMS ModelBuilder (R) (2017) In Process Systems Enterprise.
225. Zamarreño, C., Martín, M., y Romo, L. (2014) Introduction to gPROMS for Chemical Engineering, In *Introduction to Software for Chemical Engineers*, pp 367-453, CRC Press.



## **Apéndice A.**

### **Introducción a gPROMS<sup>®</sup>**





Este apéndice muestra una breve introducción a la plataforma gPROMS, utilizada en los capítulos 8 y 9, y detalla los comandos y órdenes utilizados en ellos.

## A.1 INTRODUCCIÓN A gPROMS®.

gPROMS® es una plataforma desarrollada por la empresa Process Systems Enterprise, creada en el Departamento de Ingeniería Química del Imperial College (Londres) [218].

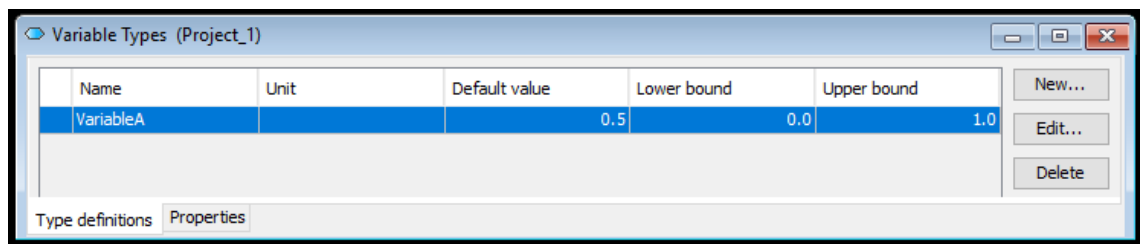
Esta potente herramienta se utiliza para el modelado de sistemas, diseño y optimización de procesos y equipos, simulaciones y estimación de parámetros, entre muchas otras aplicaciones [224].

Además, es capaz de trabajar en conjunto con otras plataformas como Excel MatLab o Simulink [225], lo que hace que su utilidad se vea incrementada enormemente, como se mostró en el Capítulo 9.

Las etapas necesarias para construir un modelo, realizar una simulación o introducir datos experimentales para realizar una *Estimación de Parámetros* se resumen a continuación.

### A.1.1 Tipos de variables.

En primer lugar, es necesario definir el tipo de variable que se va a emplear en el proceso, así como sus unidades, el valor inicial esperado, y los límites de su valor numérico mínimo y máximo (Figura A.1).



**Figura A.1. Ventana en la que se deben introducir los tipos de variables que se van a utilizar en el proceso.**

Después de introducir los tipos de variables que van a ser utilizados (temperatura, presión, flujo másico, flujo volumétrico, composición,...) se procede a definir el modelo.

### A.1.2 Modelos.

A continuación se definirá el modelo o los modelos que van a ser utilizados en el proceso. Se pueden crear tantos modelos como se deseen.

Al crear un nuevo modelo (Model1) y abrir la pestaña de *lenguaje gPROMS*, aparece una ventana con una plantilla de las posibles opciones que pueden utilizarse (Figura A.2) .

```

1 # PARAMETER
2 # ParameterName AS INTEGER || REAL || LOGICAL || VariableType < DEFAULT Value >
3 # ParameterName AS ARRAY ( Size < , ... > ) OF INTEGER || REAL || LOGICAL || VariableType < DEFAULT Value >
4 # ParameterName AS FOREIGN_OBJECT < "ForeignObjectClass" > < DEFAULT "ForeignObjectValue" >
5 # ParameterName AS ORDERED_SET < DEFAULT { "Name" < , ... > } >
6
7
8 # DISTRIBUTION_DOMAIN
9 # DomainName AS [ LowerBound : UpperBound ]
10 # DomainName AS ARRAY ( Size < , ... > ) OF [ LowerBound : UpperBound ]
11
12
13 # UNIT
14 # UnitName AS UnitModelName
15 # UnitName AS ARRAY ( Size || OrderedSet < , ... > ) OF UnitModelName
16
17
18 # PORT
19 # PortName AS ConnectionType < DIRECTION_INLET || DIRECTION_OUTLET || DIRECTION_BIDIRECTIONAL >
20 # PortName AS ARRAY ( Size || OrderedSet < , ... > ) OF ConnectionType < DIRECTION_INLET || DIRECTION_OUTLET || DIRECTION_BIDIRECTIONAL >
21
22
23 # VARIABLE
24 # VariableName AS VariableType
25 # VariableName AS ARRAY ( Size || OrderedSet < , ... > ) OF VariableType

```

**Figura A.2.** Ventana que surge al crear un nuevo modelo, donde aparece una plantilla con algunas opciones importantes (desactivadas), que sirven como guía para crear un modelo.

Las opciones más importantes en el modelo son las siguientes: *parámetros*, *variables*, *condiciones de contorno* y *ecuaciones*, que se detallarán a continuación.

### A.1.2.1 Parámetros.

En esta sección se declaran las constantes del modelo (parámetros). Es importante tener en cuenta que estas constantes permanecerán invariables en todas las aplicaciones en las que se utilice este modelo, y que los valores de estos parámetros no van a poder ser simulados, optimizados, ni estimados mediante *Estimación de Parámetros*.

En primer lugar, es necesario definir el tipo de constante: real, entero, escalar, o vectorial.

Además, estos valores deben ser conocidos, por lo que se puede introducir el valor en el proceso (*SET*), o introducirlo en este momento añadiendo la declaración *default*.

### **A.1.2.2 Variables.**

Como su propio nombre indica, en esta sección se introducen las variables que intervienen en el modelo. Estas variables, a diferencia de los parámetros, pueden ser conocidas, ser calculadas mediante simulación o *Estimación de Parámetros*, o ser optimizadas.

En primer lugar, se define el tipo de variable (que debe estar previamente definida en la opción *tipos de variable*, explicado en el apartado A.1.1).

Es importante aclarar que en gPROMS todas las variables son función del tiempo, y además, pueden ser función de variables espaciales.

Para asignar un valor a una variable, se utiliza la sección *asignar* del proceso.

### **A.1.2.3 Condiciones de contorno.**

Cuando en el modelo hay alguna ecuación diferencial espacial, es necesario definir las condiciones de contorno correspondientes.

### **A.1.2.4 Ecuaciones.**

Las ecuaciones se declaran sin tener en cuenta ningún orden, ya que todas las ecuaciones se resuelven al mismo tiempo.

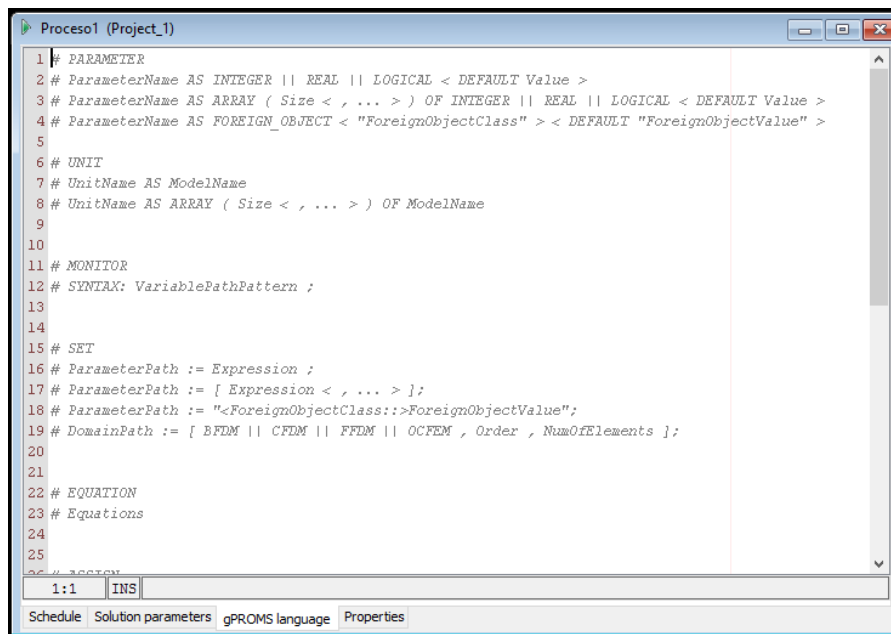
Todas las variables y parámetros que forman parte de una ecuación deben haber sido enumeradas previamente.

Cuando se quiere definir la variación de una variable respecto al tiempo,  $\frac{d}{dt}$ , se utiliza el símbolo \$.

### A.1.3 Procesos.

Una vez que se han definido el modelo y las variables que intervienen en él, se crea un *proceso*, en el que se van a introducir las condiciones con las que se resuelve el modelo descrito previamente.

Al igual que en el caso anterior, al crear un proceso se abre una nueva ventana con una plantilla de algunas de las opciones más importantes (Figura A.3).



```

1 # PARAMETER
2 # ParameterName AS INTEGER || REAL || LOGICAL < DEFAULT Value >
3 # ParameterName AS ARRAY ( Size < , ... > ) OF INTEGER || REAL || LOGICAL < DEFAULT Value >
4 # ParameterName AS FOREIGN_OBJECT < "ForeignObjectClass" > < DEFAULT "ForeignObjectValue" >
5
6 # UNIT
7 # UnitName AS ModelName
8 # UnitName AS ARRAY ( Size < , ... > ) OF ModelName
9
10
11 # MONITOR
12 # SYNTAX: VariablePathPattern ;
13
14
15 # SET
16 # ParameterPath := Expression ;
17 # ParameterPath := [ Expression < , ... > ];
18 # ParameterPath := "<ForeignObjectClass:>ForeignObjectValue";
19 # DomainPath := [ BFDM || CFDM || FFDM || OCFEM , Order , NumOfElements ];
20
21
22 # EQUATION
23 # Equations
24
25
26 # SECTION
  
```

1:1 INS

Schedule Solution parameters gPROMS language Properties

**Figura A.3.** Ventana que surge al crear un nuevo proceso, donde aparece una plantilla con algunas opciones importantes (desactivadas), que sirven como guía para crear un proceso.

Las opciones más importantes son: *unidad, asignar, inicial y horario*.

#### A.1.3.1 Unidad.

En primer lugar, es necesario definir la unidad con la que se está trabajando. De esta forma, es posible dividir el modelo en equipos o zonas diferentes, donde cada parámetro o variable tendrá un valor distinto.

### **A.1.3.2 Asignar.**

En esta sección se introducen los valores de las variables que son conocidos previamente.

### **A.1.3.3 Inicial.**

Es necesario introducir las condiciones iniciales cuando se trabaja con ecuaciones diferenciales respecto al tiempo (cálculos dinámicos).

### **A.1.3.4 Horario.**

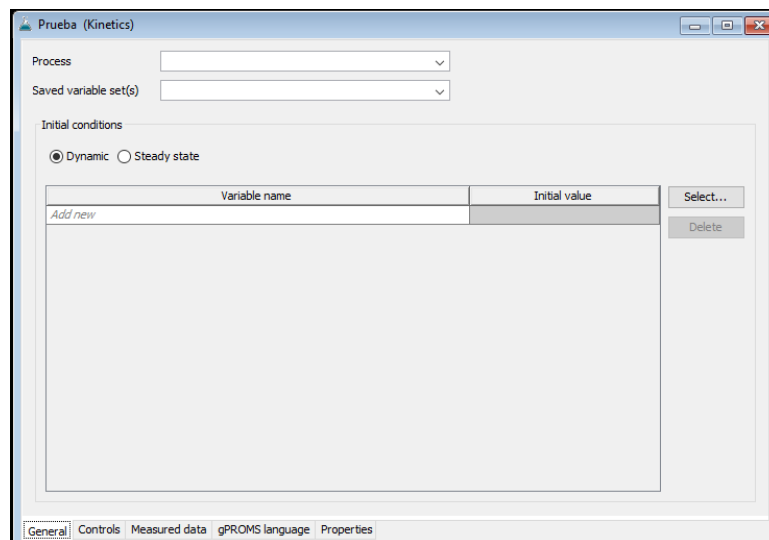
Esta opción es muy útil para definir resoluciones dinámicas, para utilizar bucles, cambiar el valor de alguna variable durante la resolución,...

Esta acción es ignorada en algunas aplicaciones como en la *Estimación de Parámetros*.

## **A.1.4 Experimentos.**

Es posible introducir los valores experimentales con el fin de validar un modelo, determinar el valor de alguna variable (*Estimación de Parámetros*), o definir los experimentos que deben realizarse.

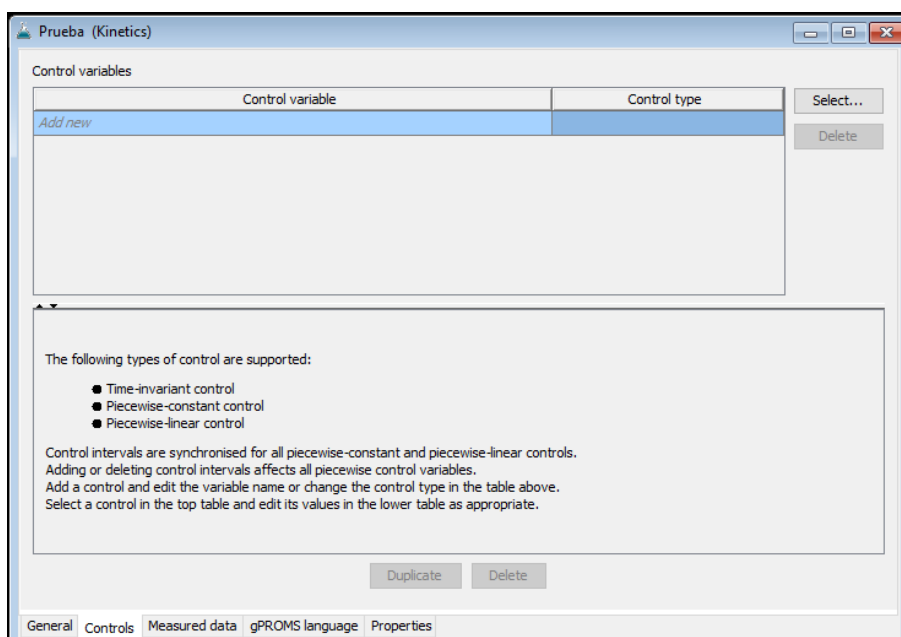
Para ello, se abre la ventana correspondiente (Figura A.4) y se introducen los datos experimentales que corresponden a alguna variable, así como el proceso con el que se quiere trabajar, y el controlador, en caso de que haya alguno.



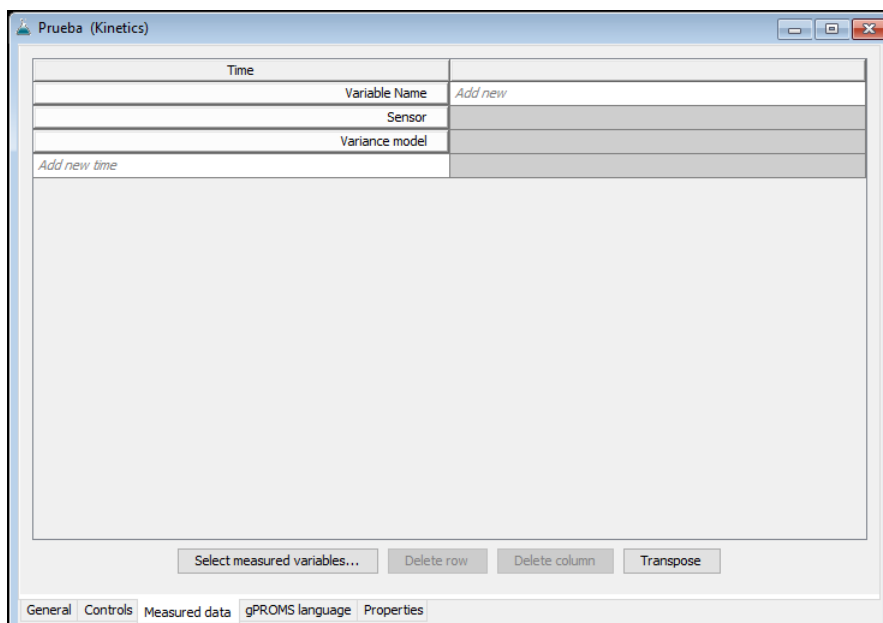
**Figura A.4. Ventana que surge al crear un nuevo experimento, donde aparece una plantilla con algunas opciones importantes que sirven como guía para crear un experimento (I).**

En la casilla *proceso*, se introduce el nombre del proceso que se va a utilizar.

Se selecciona si las condiciones iniciales son dinámicas o estáticas, y se introduce el nombre de la variable. Para ello, es necesario especificar el nombre de la unidad con la que se quiere trabajar.



**Figura A.5.** Ventana que surge al crear un nuevo experimento, donde aparece una plantilla con algunas opciones importantes que sirven como guía para crear un experimento (II).



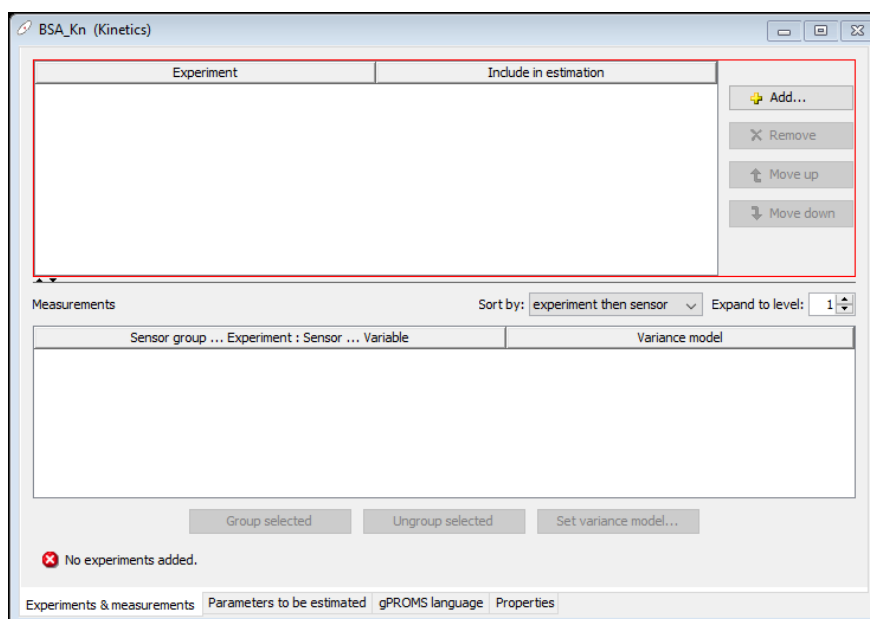
**Figura A.6.** Ventana que surge al crear un nuevo experimento, donde aparece una plantilla con algunas opciones importantes que sirven como guía para crear un experimento (III).



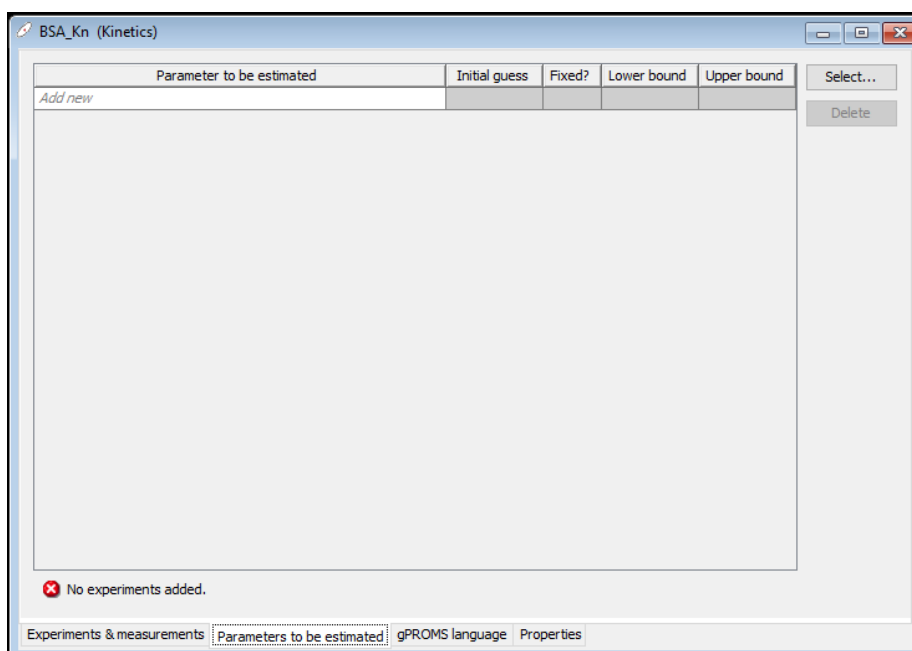
### A.1.5 Estimación de Parámetros.

Esta opción se utiliza en el caso de que se quiera estimar el valor de algún parámetro a partir de datos experimentales que hayan sido introducidos previamente en algún experimento.

Al crear una nueva *Estimación de Parámetros* se abre una ventana como en Figura A.7.



**Figura A.7.** Ventana que surge al crear una nueva estimación de parámetro, donde aparece una plantilla con algunas opciones importantes que sirven como guía.



**Figura A.8.** Ventana que surge al crear una nueva estimación de parámetro, donde aparece una plantilla con algunas opciones importantes que sirven como guía.

Para poder utilizarlo, se debe introducir el experimento con el que se quiere trabajar, el sensor utilizado, la varianza, y los parámetros que quieren ser estimados.

### A.1.6 Optimización.

Una de las aplicaciones fundamentales de este programa es la optimización de procesos. Para ello, se crea una ventana de optimización, y se introduce el *proceso* con el que se quiere trabajar, la variable a optimizar, y los controladores que van a utilizarse.

Es esencial definir el tipo de controlador, así como el intervalo de tiempo en el que trabaja.

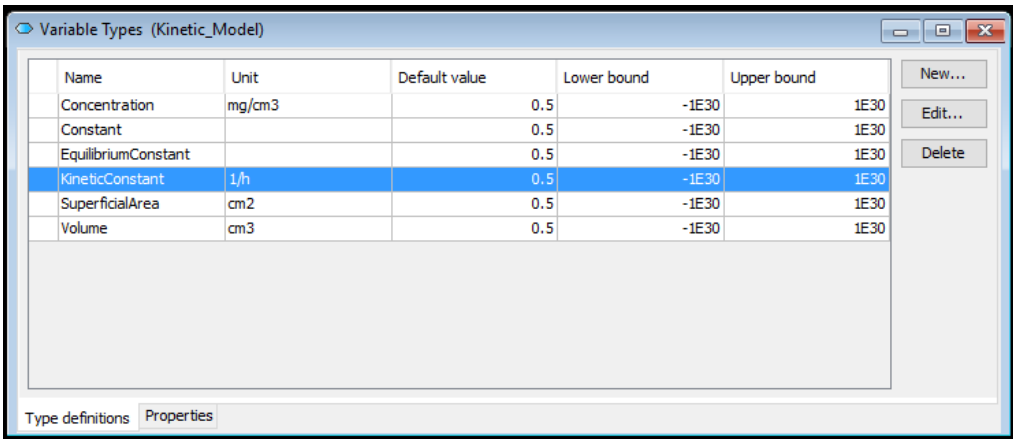
## A.2 MODELO CINÉTICO:

Se creó este modelo con el fin de determinar las constantes cinéticas a partir de los datos experimentales obtenidos utilizando para ello la herramienta de *Estimación de Parámetros*.

Los pasos seguidos se muestran a continuación:

### A.2.1 Variables.

En primer lugar, se crean los tipos de variables (Figura A.9):



Name	Unit	Default value	Lower bound	Upper bound
Concentration	mg/cm3	0.5	-1E30	1E30
Constant		0.5	-1E30	1E30
EquilibriumConstant		0.5	-1E30	1E30
<b>KineticConstant</b>	<b>1/h</b>	<b>0.5</b>	<b>-1E30</b>	<b>1E30</b>
SuperficialArea	cm2	0.5	-1E30	1E30
Volume	cm3	0.5	-1E30	1E30

Figura A.9. Tipos de variables creadas para la estimación de parámetros de las constantes cinéticas.

### A.2.2 Modelos.

A continuación se muestra y se describe el modelo que se va a emplear, BSA\_KM\_1, donde se distinguen varios apartados (Figura A.10):

```

1 VARIABLE
2 Ka AS KineticConstant      #Adsorption kinetic pseudoconstant [1/h]
3 Kd AS KineticConstant      #Desorption kinetic constant [1/h]
4 Keq AS EquilibriumConstant #Equilibrium pseudoconstant [-]
5
6 #PROTEIN CONCENTRATION
7 CP0 AS Concentration      #Initial Protein Concentration [mg/cm3]
8 CP AS Concentration       #Protein concentration [mg/cm3]
9 CPL AS Concentration      #Adsorbed Protein concentration [mg/cm3]
10
11 EQUATION
12
13 CPL=CP0-CP;              #Adsorbed Enzyme Concentration [mol/cm3]
14 $CP=-Ka*CP+kd*CPL;     #Kinetic equation
15 Keq=Ka/Kd;              #Equilibrium pseudoconstant expression [-]
16
17 |
    
```

**Figura A.10. Modelo creado para la determinación de las constantes cinéticas mediante estimación de parámetros.**

A continuación se describen las diferentes secciones de las que se compone el modelo creado.

### A.2.2.1 Parámetros.

En este caso no se definen parámetros ya que solo se consideran variables.

### A.2.2.2 Variables.

Como se indicó previamente, en este caso se definen las variables que pueden ser modificadas o las que se utilizarán en la estimación de parámetros u optimización.

Las variables definidas y sus propiedades se muestran en la Tabla A.1.

Tabla A.1. Resumen de las variables utilizadas en el modelo BSA\_KM\_1.

Variable	Tipo de variable	Unidades	Descripción
$k'_a$	Constante cinética	$h^{-1}$	Pseudoconstante cinética de adsorción global
$k_d$	Constante cinética	$h^{-1}$	Constante cinética de desorción global
$K'_{eq}$	Constante de equilibrio	-	Pseudoconstante de equilibrio global
$C_{p0}$	Concentración	$mg/cm^3$	Concentración de proteína inicial en el tanque agitado
$C_p$	Concentración	$mg/cm^3$	Concentración de proteína en el tanque agitado
$C_{PL}$	Concentración	$mg/cm^3$	Concentración de proteína adsorbida en el monolito

### A.2.2.3 Ecuaciones.

Las ecuaciones empleadas para la determinación de las constantes cinéticas se basan en el Capítulo 8, y se resumen en la Tabla A. 2.

**Tabla A. 2. Ecuaciones utilizadas en el modelo BSA\_KM\_1 para la determinación de las constantes cinéticas.**

$C_{PL}(t) = C_{P0} - C_P(t)$	(A.1)	Concentración de proteína adsorbida a lo largo del tiempo
$\frac{dC_P}{dt} = -k'_a \cdot C_P + k_d \cdot C_{PL}$	(A.2)	Velocidad de adsorción de la proteína en el tanque agitado
$K'_{eq} = \frac{k'_a}{k_d}$	(A.3)	Pseudoconstante de equilibrio

### A.2.3 Procesos.

Una vez se ha creado y definido el modelo con el que se realizará la estimación de parámetros, se crea el proceso BSA\_KP\_1, que se muestra en la Figura A.10.

```

1 UNIT
2 AKP_1 AS BSA_KM_1
3
4 ASSIGN
5 WITHIN AKP_1 DO
6 Ka:=2.3543; #Adsorption kinetic pseudoconstant [1/h]
7 Kd:=0.167789; #Desorption kinetic constant [1/h]
8
9 #PROTEIN CONCENTRATION
10 CPO:=0.679; #Initial Enzyme Concentration [mg/cm3]
11 END
12
13 INITIAL
14 WITHIN AKP_1 DO
15 CP:=0.679; #Initial Enzyme Concentration [mg/cm3]
16 END
17
18
19 #SCHEDULE
20 #This is ignored for parameter estimation
21 #CONTINUE FOR 200
22 |
23

```

22:1 INS

Schedule Solution parameters gPROMS language Properties

**Figura A.11. Proceso creado para la determinación de las constantes cinéticas mediante estimación de parámetros, basado en el modelo BSA\_KM\_1.**

Cada sección se explica a continuación:

### A.2.3.1 Unidad.

Define la unidad AKP\_1, que funciona basándose en el modelo BSA\_KM\_1, creado previamente.

### A.2.3.2 Asignar.

Se asignan los valores de las siguientes variables, para toda la unidad AKP\_1 (Tabla A. 3):

**Tabla A. 3. Resumen de las variables a las que se les asigna un valor en la unidad AKP\_1.**

Variable	Valor	Unidades	Descripción
$k'_a$	Constante cinética	$h^{-1}$	Constante cinética de adsorción
$k_d$	Constante cinética	$h^{-1}$	Constante cinética de desorción
$C_{p0}$	Variable en cada experimento	$mg/cm^3$	Concentración de proteína inicial en el tanque de agitación

### A.2.3.3 Inicial.

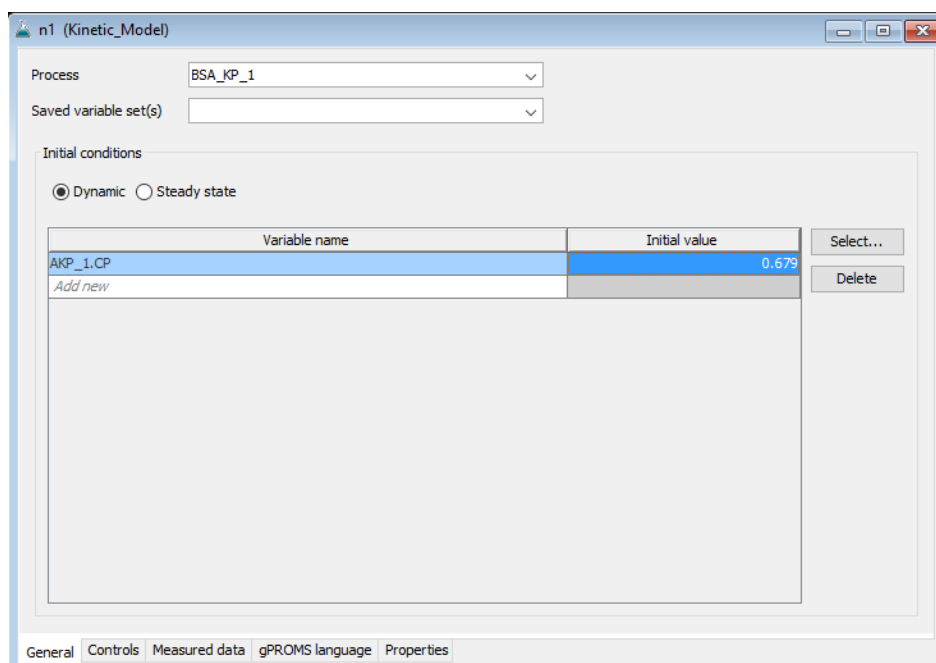
Es necesario definir las condiciones iniciales de la ecuación diferencial (Ecuación (A.2)), que en este caso es la concentración de proteína inicial.

### A.2.3.4 Esquema.

No se utiliza en la Estimación de Parámetros, ya que no la tiene en cuenta.

### A.2.4 Experimentos.

Para realizar la Estimación de Parámetros, se introducen los datos experimentales de los que se dispone, uno para cada conjunto de experimentos (Figura A.12).



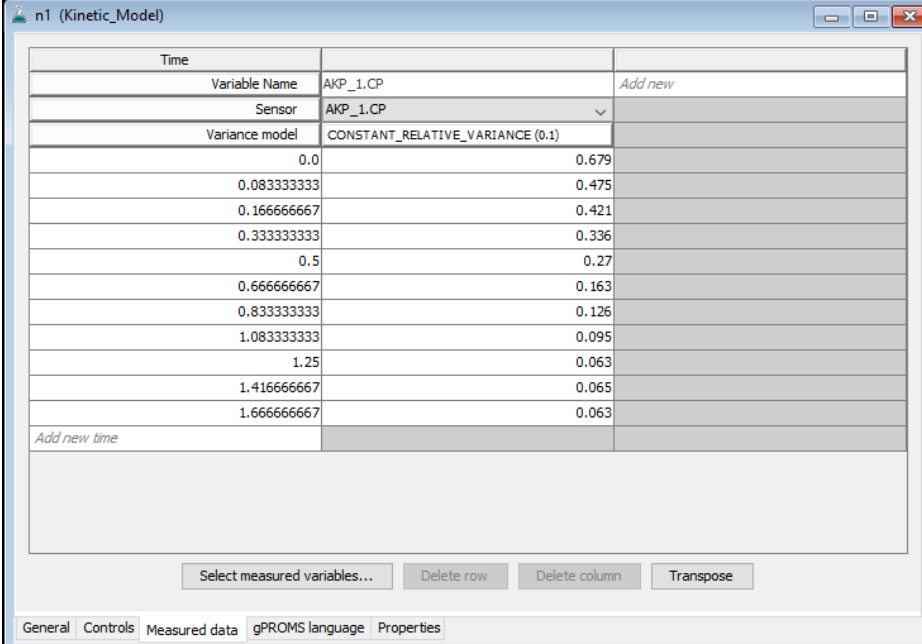
**Figura A.12. Proceso y variables relacionadas con los datos experimentales introducidos.**

En proceso, se introduce el nombre del proceso que se va a utilizar.

Se selecciona si las condiciones iniciales son dinámicas o estáticas, y se introduce el nombre de la variable. Para ello, es necesario especificar el nombre de la unidad con la que se quiere trabajar.



A continuación, se introducen los datos experimentales, en este caso la concentración de proteína en el tanque de agitación,  $C_p$ , a lo largo del tiempo (en h) (Figura A.13).



The screenshot shows a window titled 'n1 (Kinetic\_Model)' with a table of experimental data. The table has three columns: 'Time', 'Variable Name', and 'Sensor'. The 'Variable Name' is 'AKP\_1.CP' and the 'Sensor' is 'AKP\_1.CP'. The 'Variance model' is 'CONSTANT\_RELATIVE\_VARIANCE (0.1)'. The data points are as follows:

Time	Variable Name	Sensor	Variance model
0.0	AKP_1.CP	AKP_1.CP	CONSTANT_RELATIVE_VARIANCE (0.1)
0.083333333			0.679
0.166666667			0.475
0.25			0.421
0.333333333			0.336
0.416666667			0.27
0.5			0.163
0.583333333			0.126
0.666666667			0.095
0.75			0.063
0.833333333			0.065
0.916666667			0.063
1.0			

Below the table, there are buttons for 'Select measured variables...', 'Delete row', 'Delete column', and 'Transpose'. At the bottom, there are tabs for 'General', 'Controls', 'Measured data', 'gPROMS language', and 'Properties'.

**Figura A.13. Datos experimentales necesarios para la realización de la Estimación de Parámetros.**

Una vez se han introducido los datos experimentales, se puede realizar la *Estimación de Parámetros*.

### A.2.5 Estimación de Parámetros.

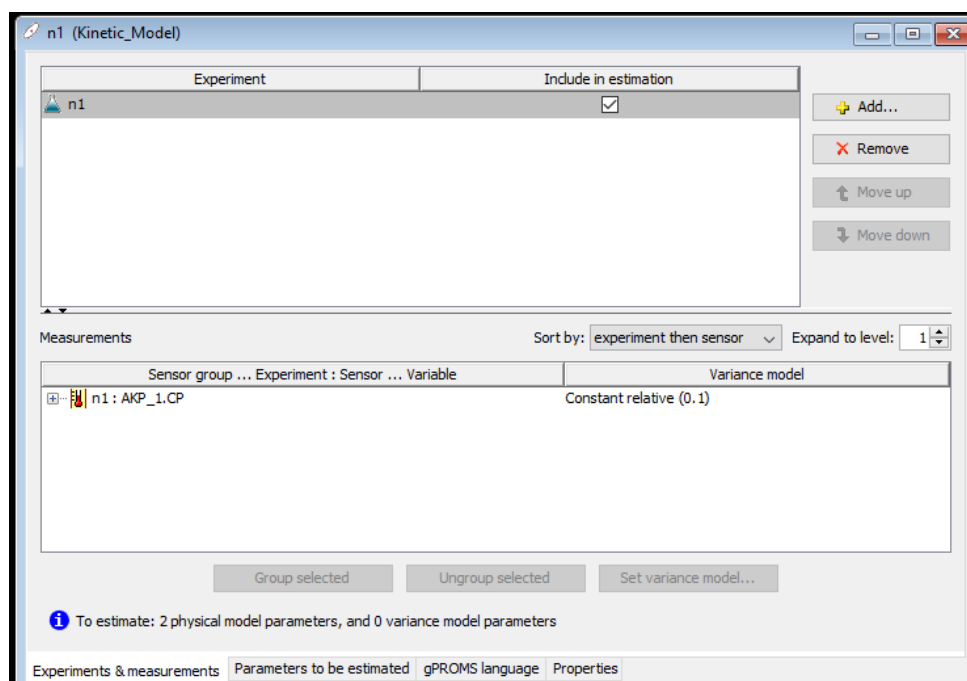
Mediante la Estimación de Parámetros se consigue obtener el valor de una o varias variables a partir de datos experimentales.

En este caso, se van a utilizar los datos de la concentración de proteína en el tanque de agitación a lo largo del tiempo,  $C_p$ , para obtener las constantes cinéticas,  $k'_a$  y  $k_d$ , en cada reutilización.

A continuación, se detallará el proceso seguido para la obtención de los parámetros en el primer ciclo. Este proceso es el mismo para el resto de ciclos.

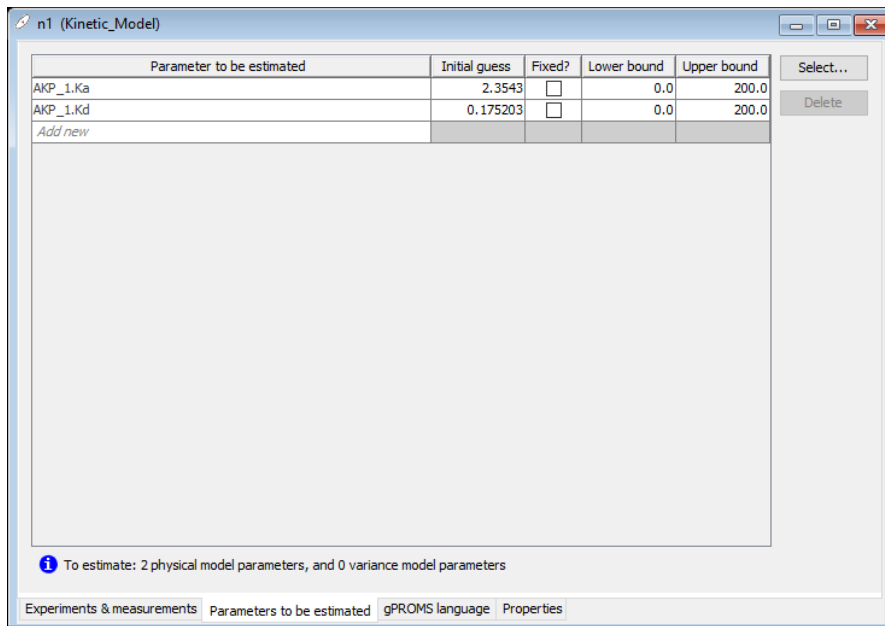
### A.2.5.1 Para el primer ciclo, $n=1$ .

En primer lugar, se selecciona el experimento con el que se quiere trabajar, y la variable que contiene ese experimento (Figura A.14).



**Figura A.14. Selección del experimento y del sensor en la Estimación de Parámetros.**

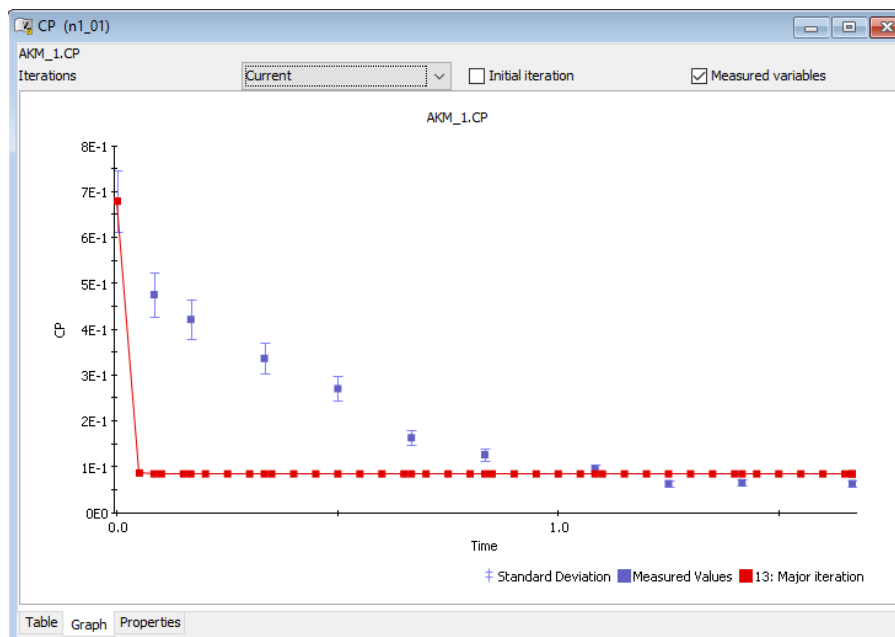
A continuación, se selecciona las variables de las cuales se quiere determinar su valor numérico (Figura A.15).



**Figura A.15. Selección de las variables que se quieren estimar.**

Una vez se ejecuta la *Estimación de Parámetros*, se obtienen unos valores de las constantes cinéticas, y la representación de los datos experimentales y los estimados con el valor de los parámetros obtenidos ( Figura A.16).

Además, se muestra un informe en el que se detalla los resultados de la *Estimación de Parámetros* realizada, y donde se muestran los valores de los parámetros obtenidos, y se evalúa si los datos experimentales se ajustan de forma satisfactoria al modelo propuesto.



**Figura A.16. Primera estimación de parámetros ( $k_a=0.0145$ ;  $k_d=0$ ), mal ajuste.**

Una vez se ha obtenido una primera estimación de los parámetros, se debe realizar el proceso hasta que el valor inicial sugerido y el final obtenido sean iguales (Figura A.17-Figura A.19).

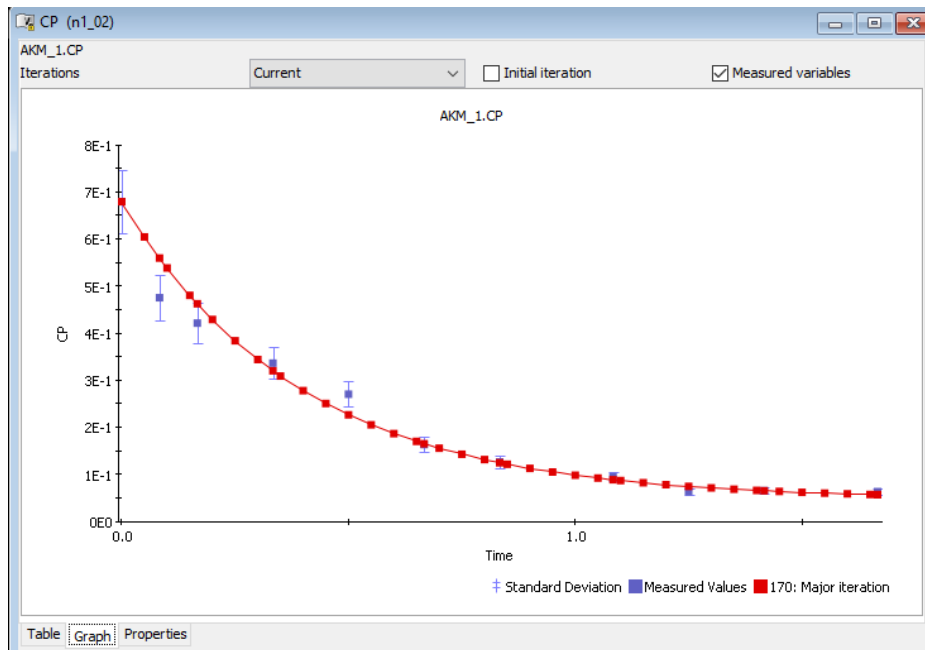


Figura A.17. Segunda estimación de parámetros ( $k_a=100.16$ ;  $k_d=14.1737$ ), buen ajuste.

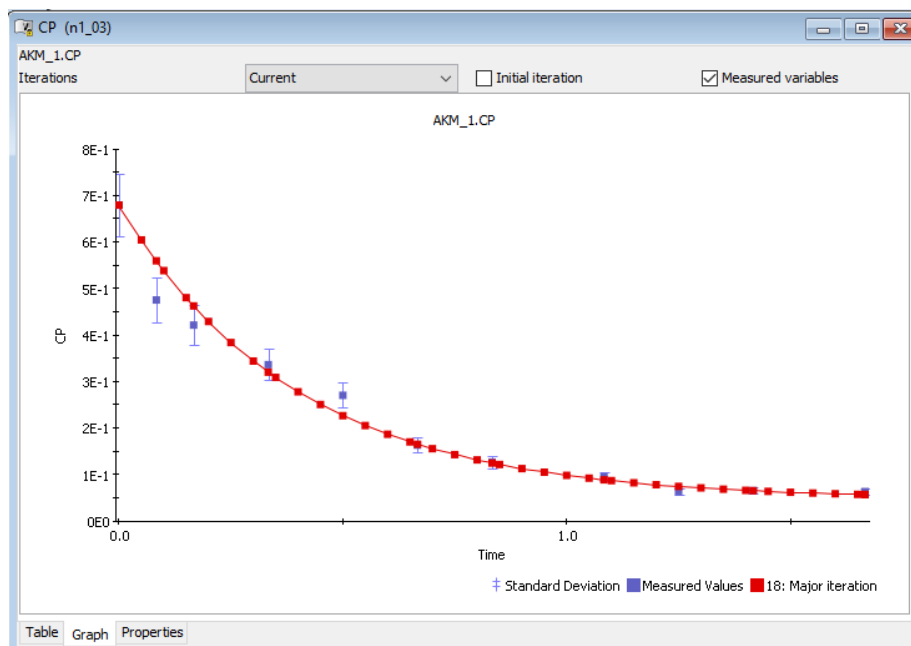


Figura A.18. Tercera estimación de parámetros ( $k_a=2.3469$ ;  $k_d=0.175203$ ), buen ajuste.

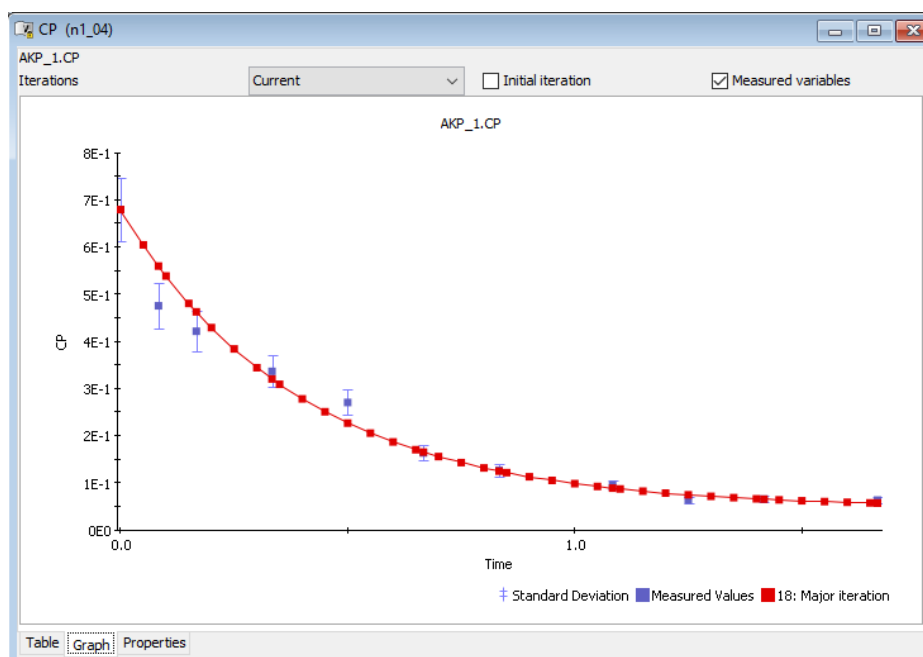


Figura A.19. Cuarta estimación de parámetros ( $k_a=2.3543$ ;  $k_d=0.175203$ ), buen ajuste.

Los resultados obtenidos para el primer ciclo se resumen en la Tabla A.4.

Tabla A.4. Resumen de los valores de las constantes cinéticas utilizadas en la estimación de parámetros.

Parámetro	inicial	1 <sup>a</sup> estimación	2 <sup>a</sup> estimación	3 <sup>a</sup> estimación	Valor final
$k'_a / h^{-1}$	0.0145	100.16	2.3469	2.3543	2.3469
$k_d / h^{-1}$	0	14.1737	0.175203	0.175203	0.175203

Una vez que se obtienen los valores de las constantes cinéticas, se calcula la constante de equilibrio, que puede hacerse utilizando el proceso BSA\_KP\_1, y añadiendo el esquema durante 2 h, o realizando el cálculo directamente.

Todos los ciclos se realizan de la misma forma, y los resultados se resumen en la Tabla A.5.

**Tabla A.5. Datos de las constantes cinéticas y de equilibrio obtenidos mediante estimación de parámetros.**

<b>Ciclo</b>	<b>n=1</b>	<b>n=5</b>	<b>n=10</b>	<b>n=15</b>	<b>n=20</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación estándar</b>
$k'_a / \text{h}^{-1}$	2,354	2,006	2,076	2,020	2,275	2,146	0,158
$k'_d / \text{h}^{-1}$	0,168	0,191	0,142	0,137	0,226	0,173	0,037
$K'_{eq}$	14,031	10,481	14,661	14,757	10,070	12,800	2,326

Este mismo proceso se realizó para la determinación de las constantes cinéticas intrínsecas, y los resultados obtenidos se resumen en la Tabla A.6.

**Tabla A.6. Datos de las constantes cinéticas y de equilibrio obtenidos mediante estimación de parámetros para el proceso en Batch y en columna monolítica.**

<b>Constante</b>	<b>Batch</b>	<b>Monolito</b>
$k'_a / \text{h}^{-1}$	28.84	2.146
$k'_d / \text{h}^{-1}$	0.32	0.173
$K'_{eq}$	90.13	12.800

### A.3 BALANCE DE MATERIA A CADA PUNTO DE LA INSTALACIÓN.

Se realizó un balance de materia a la instalación que se muestra en la Figura A.20.

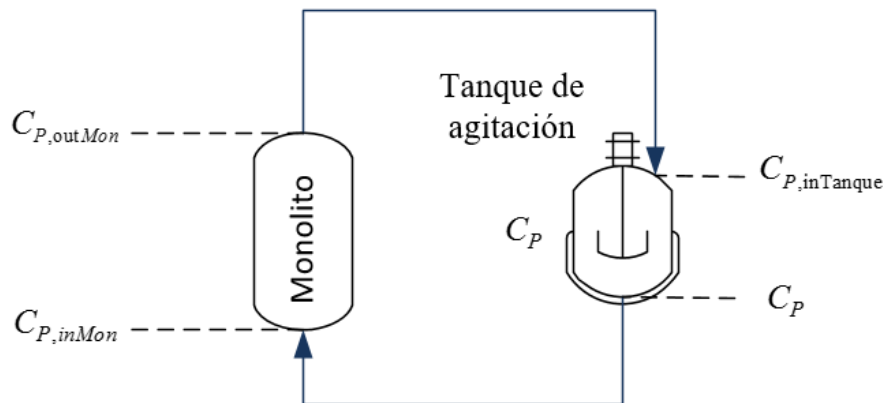


Figura A.20. Esquema de la instalación utilizada en el balance de materia.

Además, el monolito de 2 cm de longitud se dividió en 4 zonas equidistantes, para obtener la concentración de proteína en 4 alturas diferentes:  $z=0, 0.5, 1.0, 1.5$  y  $2.0$  (Figura A.25).

Para ello, se siguió el proceso que se explica a continuación:

#### A.3.1 Variables.

En primer lugar, se crean los tipos de variables necesarios para este caso.



Name	Unit	Default value	Lower bound	Upper bound
Concentration	mg/cm3	0.5	-1E30	1E30
Constant		0.5	-1E30	1E30
EquilibriumConstant		0.5	-1E30	1E30
KineticConstant	1/h	0.5	-1E30	1E30
SuperficialArea	cm2	0.5	-1E30	1E30
Volume	cm3	0.5	-1E30	1E30
flow_rate	cm3/min	0.5	-1E30	1E30

Figura A.21. Variables creadas para el balance de materia.

### A.3.2 Modelos.

Se describe el modelo que se va a emplear, MBM\_1, diferenciando varios apartados Figura A.22 y Figura A.23:

```

1 VARIABLE
2 #Volume
3 Vmon AS Volume      #Monolith volume [cm3]
4 V AS Volume        #Tank volume [cm3]
5
6 #Kinetic constants
7 Ka AS KineticConstant #Adsorption kinetic pseudoconstant [1/h]
8 Kd AS KineticConstant #Desorption kinetic constant [1/h]
9
10 #PROTEIN CONCENTRATIONS
11 CP0 AS Concentration #Initial Protein Concentration in Tank [mg/cm3]
12 CP AS Concentration  #Protein concentrationin Tank [mg/cm3]
13 CPL AS Concentration #Adsorbed Protein concentration [mg/cm3]
14
15 CPintank AS Concentration #Inlet Protein Concentration [mg/cm3]
16 CPinmon AS Concentration #Initial Protein Concentration [mg/cm3]
17 CPoutmon AS Concentration #Initial Protein Concentration [mg/cm3]
18
19 CPmon0 AS Concentration #Protein Concentration inside the monolith [mg/cm3]
20 CPmon1 AS Concentration #Protein Concentration inside the monolith [mg/cm3]
21 CPmon2 AS Concentration #Protein Concentration inside the monolith [mg/cm3]
22 CPmon3 AS Concentration #Protein Concentration inside the monolith [mg/cm3]
23 CPmon4 AS Concentration #Protein Concentration inside the monolith [mg/cm3]
24 |
25 #Flow Rate
26 Q AS flow_rate      #Flow rate throught the pipes [cm3/h]

```

Figura A.22. Modelo creado para el balance de materia, MBM\_1 (I).

```

19 CPmon0 AS Concentration #Protein Concentration inside the monolith [mg/cm3]
20 CPmon1 AS Concentration #Protein Concentration inside the monolith [mg/cm3]
21 CPmon2 AS Concentration #Protein Concentration inside the monolith [mg/cm3]
22 CPmon3 AS Concentration #Protein Concentration inside the monolith [mg/cm3]
23 CPmon4 AS Concentration #Protein Concentration inside the monolith [mg/cm3]
24
25 #Flow Rate
26 Q AS flow_rate #Flow rate through the pipes [cm3/h]
27
28 EQUATION
29 # Model equations
30 CPL=CPO-CP; #Adsorbed Enzyme Concentration [mg/cm3]
31 $CP=-Ka*CP+kd*CPL; #Kinetic equation
32
33 $CP=(Q/Vcstr)*(CPoutmon-CP);
34
35 #Definitions
36 CPoutmon=Cpincstr;
37 CPinmon=CP;
38
39 CPmon0=CPinmon-((CPinmon-CPoutmon)/4*0);
40 CPmon1=CPinmon-((CPinmon-CPoutmon)/4*1);
41 CPmon2=CPinmon-((CPinmon-CPoutmon)/4*2);
42 CPmon3=CPinmon-((CPinmon-CPoutmon)/4*3);
43 CPmon4=CPinmon-((CPinmon-CPoutmon)/4*4);
44
45
44:1 INS
Interface Specification Topology gPROMS language Properties
    
```

Figura A.23. Modelo creado para el balance de materia, MBM\_1 (II).

### A.3.2.1 Parámetros.

En este caso no se define ningún parámetro ya que se van a tratar como variables.

### A.3.2.2 Variables.

Como se indicó previamente, en este caso se definen las variables que pueden ser modificadas Tabla A. 7.

Tabla A. 7. Resumen de las variables utilizadas en el modelo MBM\_1.

Variable	Tipo de variable	Unidades	Descripción
$V_{\text{mon}}$	Volumen	$\text{cm}^3$	Volumen del monolito
$V$	Volumen	$\text{cm}^3$	Volumen del tanque agitado
$k'_a$	Constante cinética	$\text{h}^{-1}$	Pseudoconstante cinética de adsorción
$k_d$	Constante cinética	$\text{h}^{-1}$	Constante cinética de desorción
$C_{P0}$	Concentración	$\text{mg}/\text{cm}^3$	Concentración de proteína inicial en el tanque
$C_P$	Concentración	$\text{mg}/\text{cm}^3$	Concentración de proteína en el tanque agitado
$C_{PL}$	Concentración	$\text{mg}/\text{cm}^3$	Concentración de proteína adsorbida en el monolito
$C_{P,inTank}$	Concentración	$\text{mg}/\text{cm}^3$	Concentración de proteína a la entrada del tanque
$C_{P,inMon}$	Concentración	$\text{mg}/\text{cm}^3$	Concentración de proteína a la entrada del monolito
$C_{P,out,Mon}$	Concentración	$\text{mg}/\text{cm}^3$	Concentración de proteína a la salida del monolito
$C_{P,Mon0}$	Concentración	$\text{mg}/\text{cm}^3$	Concentración de proteína a $z=0$ del monolito
$C_{P,Mon1}$	Concentración	$\text{mg}/\text{cm}^3$	Concentración de proteína a $z=0.5$ del monolito
$C_{P,Mon2}$	Concentración	$\text{mg}/\text{cm}^3$	Concentración de proteína a $z=1.0$ del monolito
$C_{P,Mon3}$	Concentración	$\text{mg}/\text{cm}^3$	Concentración de proteína a $z=1.5$ del monolito
$C_{P,Mon4}$	Concentración	$\text{mg}/\text{cm}^3$	Concentración de proteína a $z=2.0$ del monolito
$Q$	Vel. de flujo	$\text{cm}^3/\text{h}$	Caudal volumétrico

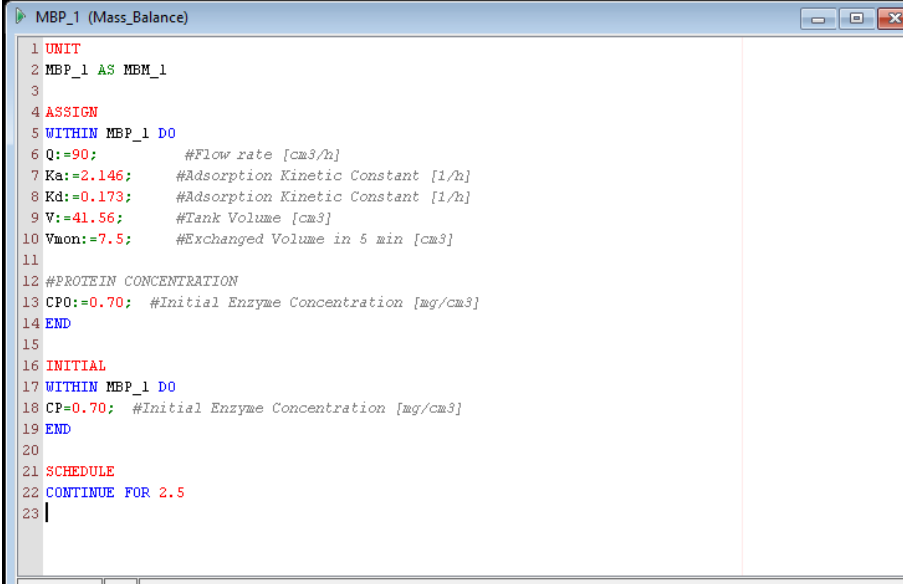
### A.3.2.3 Ecuaciones.

Las ecuaciones empleadas para la determinación de las constantes cinéticas se basan en el Capítulo 8, y se resumen en la Tabla A.8.

**Tabla A.8. Ecuaciones utilizadas en la determinación de las constantes cinéticas**

$C_{PL}(t) = C_{P0} - C_P(t)$	(A.4)	Concentración de proteína adsorbida a lo largo del tiempo
$\frac{dC_P}{dt} = -k'_a \cdot C_P + k_d \cdot C_{PL}$	(A.5)	Velocidad de adsorción de la proteína en el tanque agitado
$C_{P,inCSTR} = C_{P,outMon}$	(A.6)	La concentración de proteína que entra en el tanque agitado en un momento determinado es la misma que la que sale del monolito
$C_{P,inMon} = C_P$	(A.7)	La concentración de proteína que entra en monolito en un momento determinado es la misma que la concentración de proteína en el tanque agitado
$\frac{dC_P}{dt} = \frac{Q}{V_{CSTR}} [C_{P,outMon} - C_P]$	(A.8)	Balance de materia al tanque agitado (Capítulo 8)
$C_{P,Mon,i} = C_{P,inMon} - \frac{(C_{P,inMon} - C_{P,outMon})}{4} \cdot i$	(A.9)	Concentración de proteína a 4 alturas diferentes del monolito

### A.3.3 Procesos.



```
1 UNIT
2 MBP_1 AS MBM_1
3
4 ASSIGN
5 WITHIN MBP_1 DO
6 Q:=90; #Flow rate [cm3/h]
7 Ka:=-2.146; #Adsorption Kinetic Constant [1/h]
8 Kd:=0.173; #Adsorption Kinetic Constant [1/h]
9 V:=41.56; #Tank Volume [cm3]
10 Vmon:=7.5; #Exchanged Volume in 5 min [cm3]
11
12 #PROTEIN CONCENTRATION
13 CP0:=0.70; #Initial Enzyme Concentration [mg/cm3]
14 END
15
16 INITIAL
17 WITHIN MBP_1 DO
18 CP=0.70; #Initial Enzyme Concentration [mg/cm3]
19 END
20
21 SCHEDULE
22 CONTINUE FOR 2.5
23 |
```

Figura A.24. Proceso creado para el balance de materia, basado en el modelo MBM\_1.

#### A.3.3.1 Unidad.

Se define que el proceso MBP\_1 funciona con el modelo MBM\_1, creado previamente.

#### A.3.3.2 Asignar.

Se asignan que, para toda la unidad MBP:

**Tabla A. 9. Variables de las que se conocen su valor.**

<b>Variable</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidades</b>	<b>Descripción</b>
$V_{\text{mon}}$	7.5	$\text{cm}^3$	Volumen del monolito
$V$	41.56	$\text{cm}^3$	Volumen del tanque agitado
$k'_a$	2.146	$\text{h}^{-1}$	Pseudoconstante cinética de adsorción global
$k_d$	0.173	$\text{h}^{-1}$	Constante cinética de desorción global
$C_{p0}$	0.70	$\text{mol}/\text{cm}^3$	Concentración de proteína inicial en el tanque agitado
$Q$	90	$\text{cm}^3/\text{h}$	Caudal volumétrico

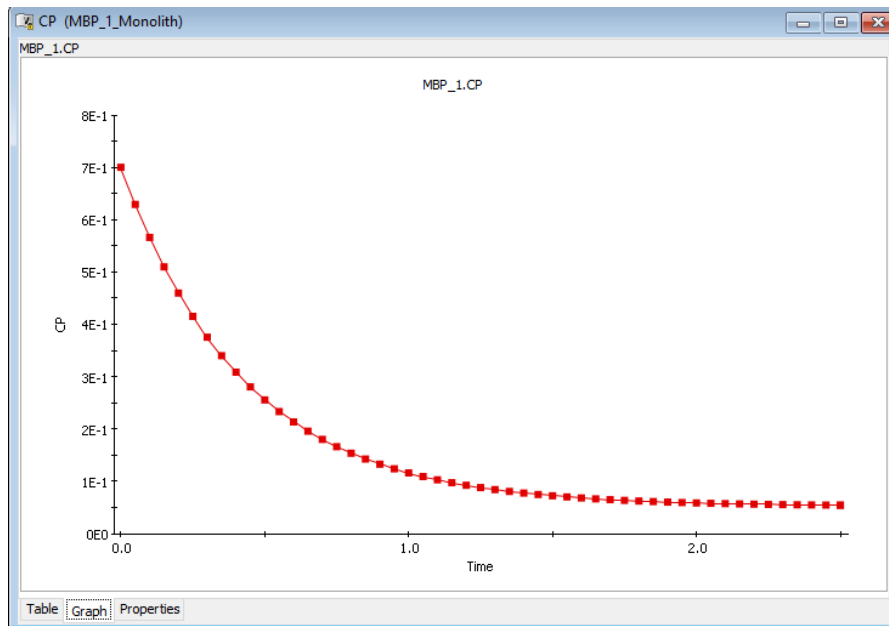
### **A.3.3.3 Inicial.**

Es necesario definir las condiciones iniciales de la ecuación diferencial (Ecuación(A.5)), que en este caso es la concentración de proteína inicial.

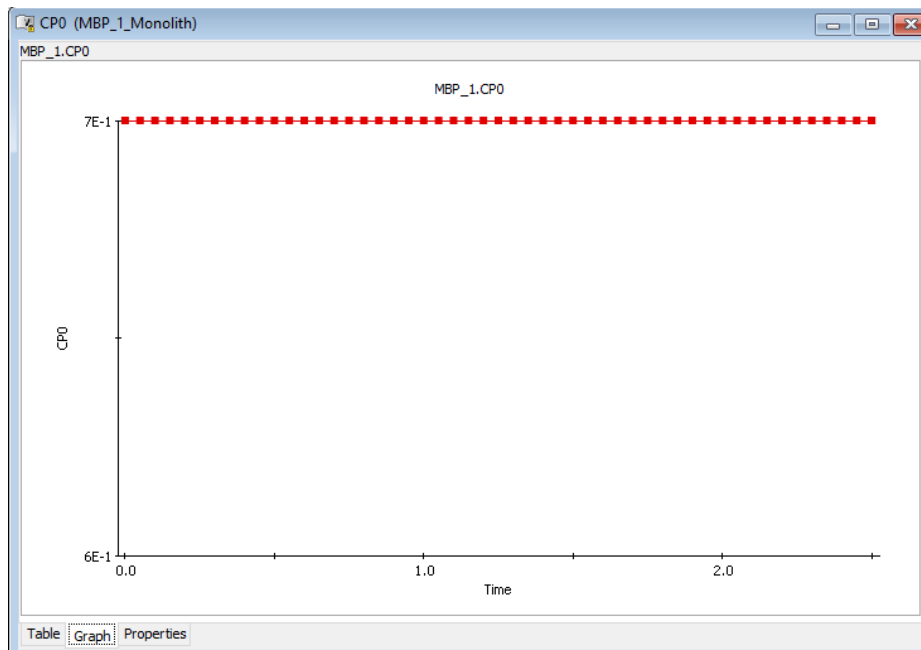
### **A.3.3.4 Esquema.**

Se realiza la simulación hasta 2.5h.

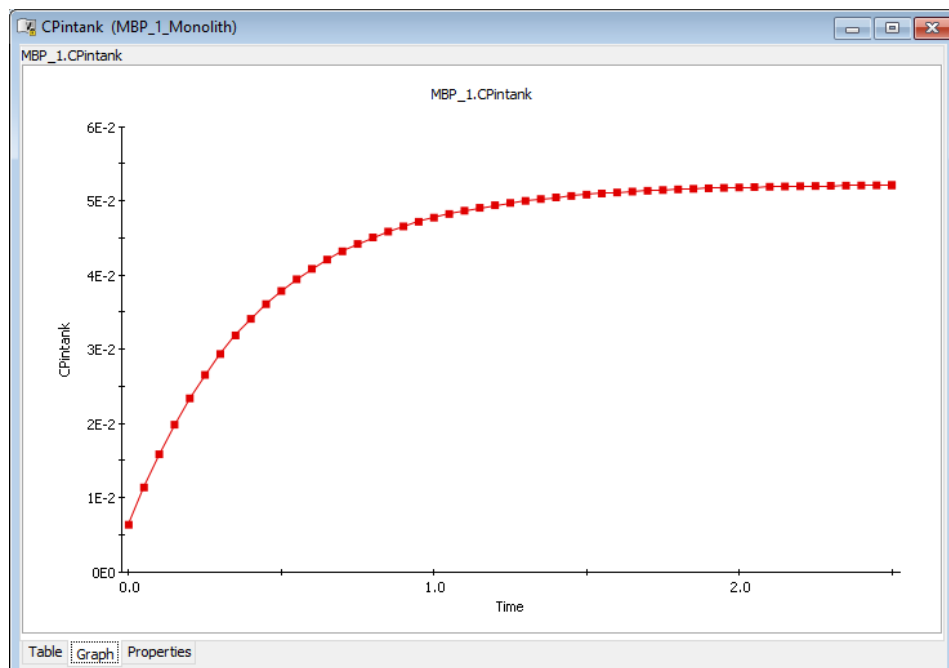
A continuación, se ejecuta el proceso MBP\_1, generando la simulación MBP\_1\_Monolith, lo que da lugar a los valores de las variables a lo largo del tiempo.



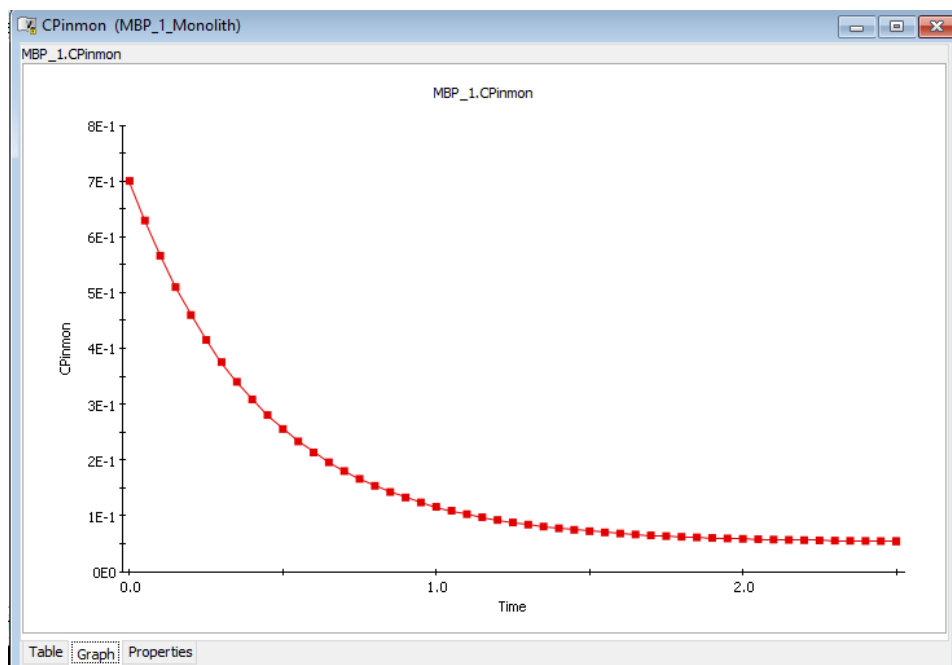
**Figura A.25. Valor de la concentración de proteína en el CSTR generada con el balance de materia.**



**Figura A.26. Valor de la concentración inicial de proteína en el CSTR generada con el balance de materia.**

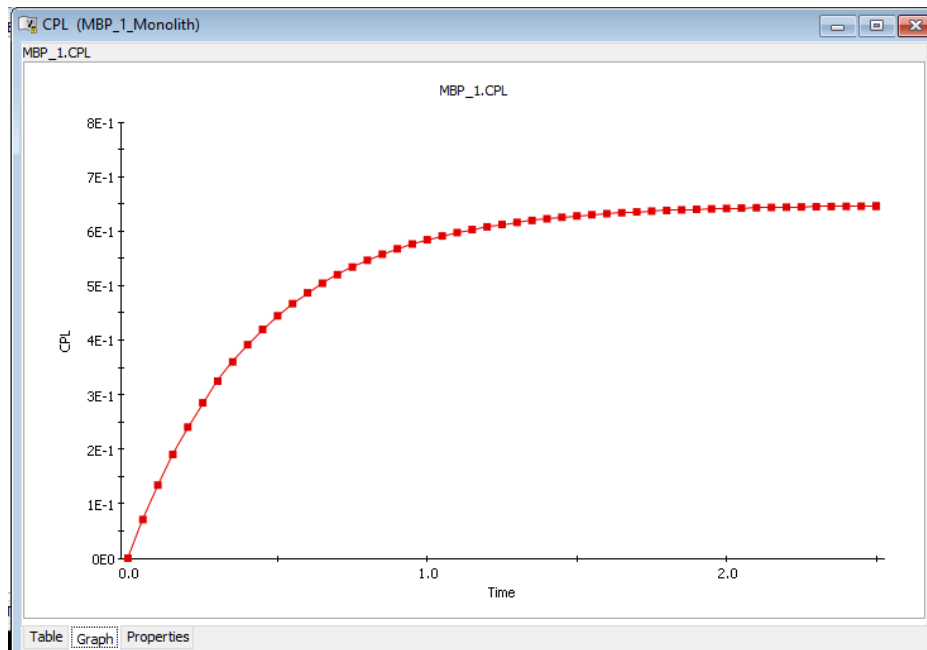


**Figura A.27.** Valor de la concentración de proteína que entra en el CSTR generada con el balance de materia.

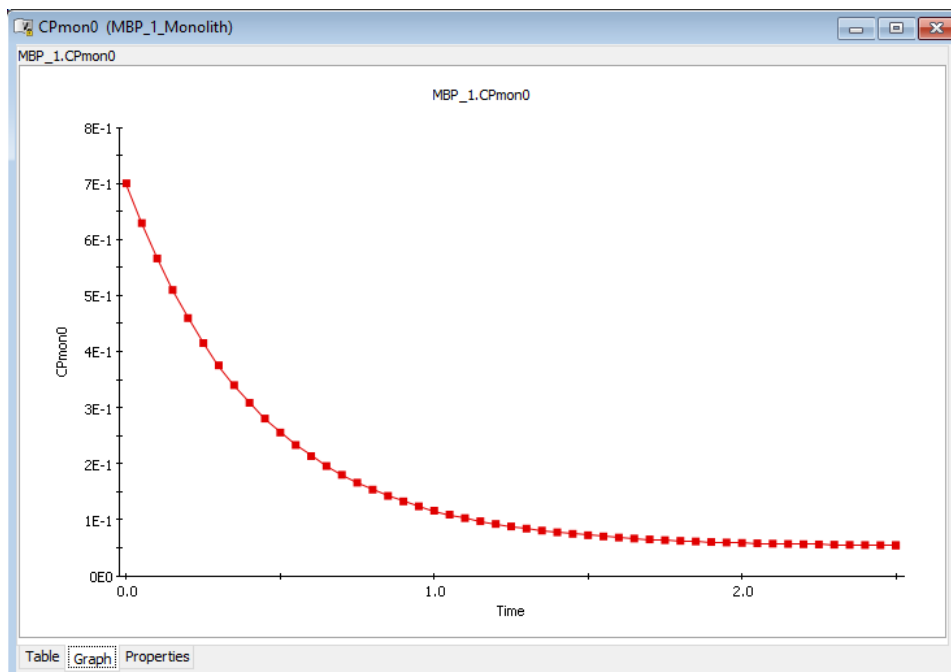


**Figura A.28.** Valor de la concentración de proteína que entra en el monolito generada con el balance de materia.

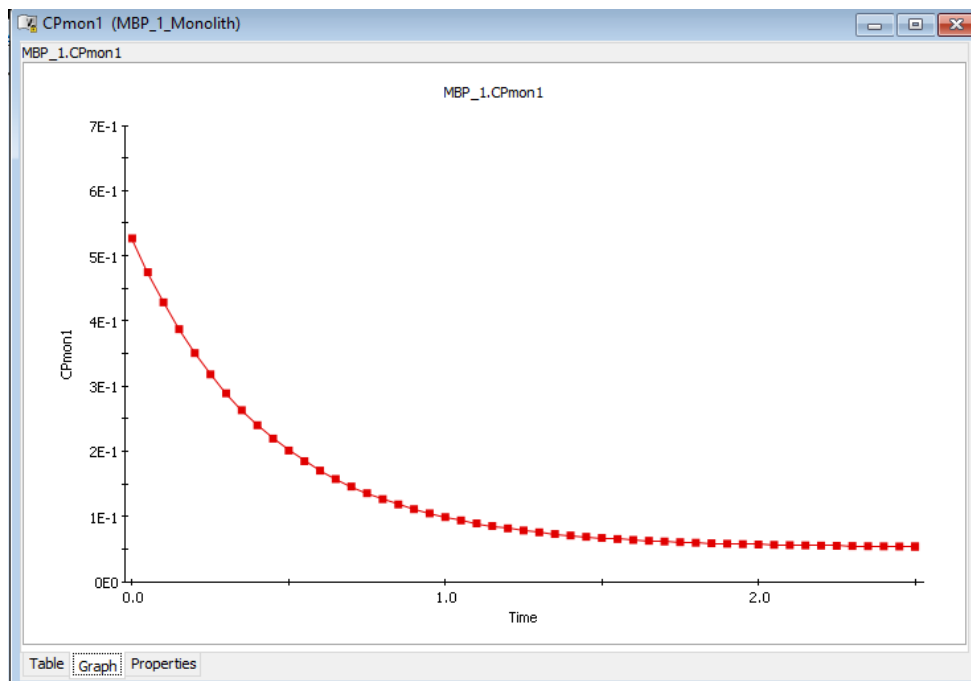




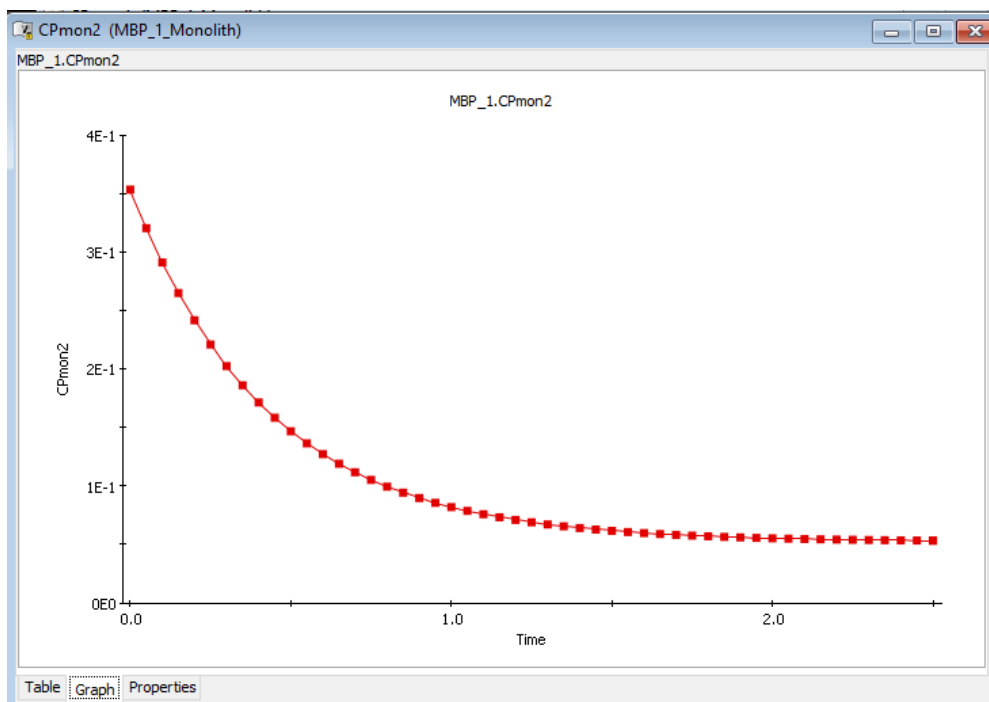
**Figura A.29.** Valor de la concentración de proteína que se adsorbe en el monolito generado con el balance de materia.



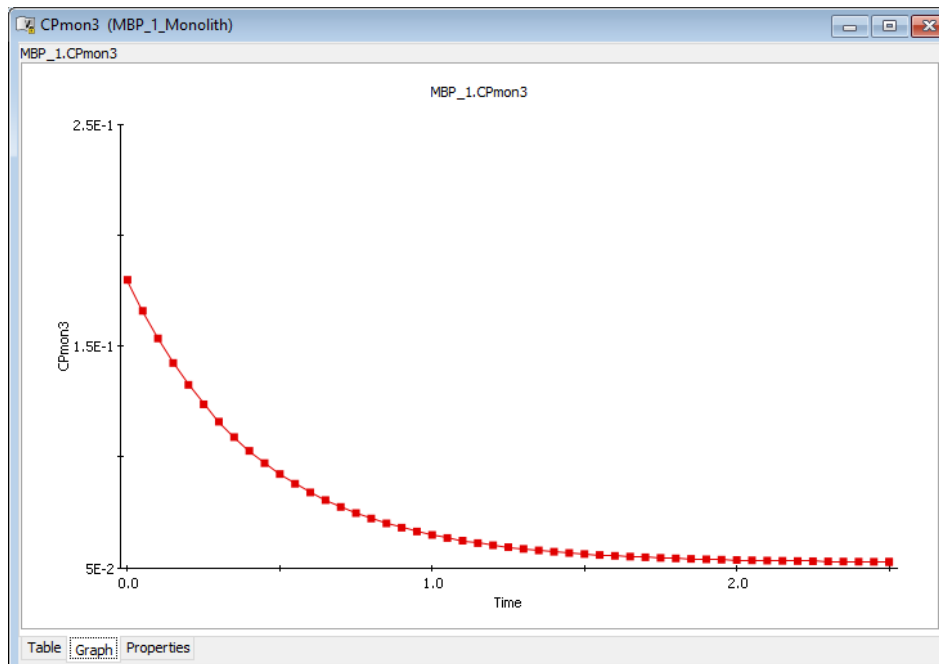
**Figura A.30.** Valor de la concentración de proteína en el monolito a  $z=0$  cm generada con el balance de materia.



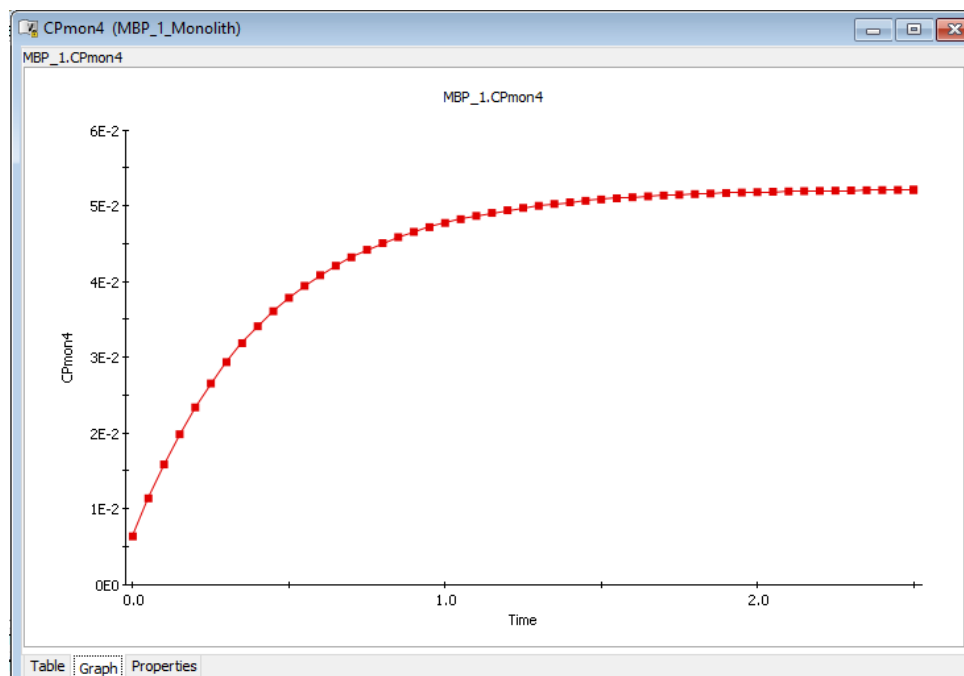
**Figura A.31. Valor de la concentración de proteína en el monolito a  $z=0.5$  cm generada con el balance de materia.**



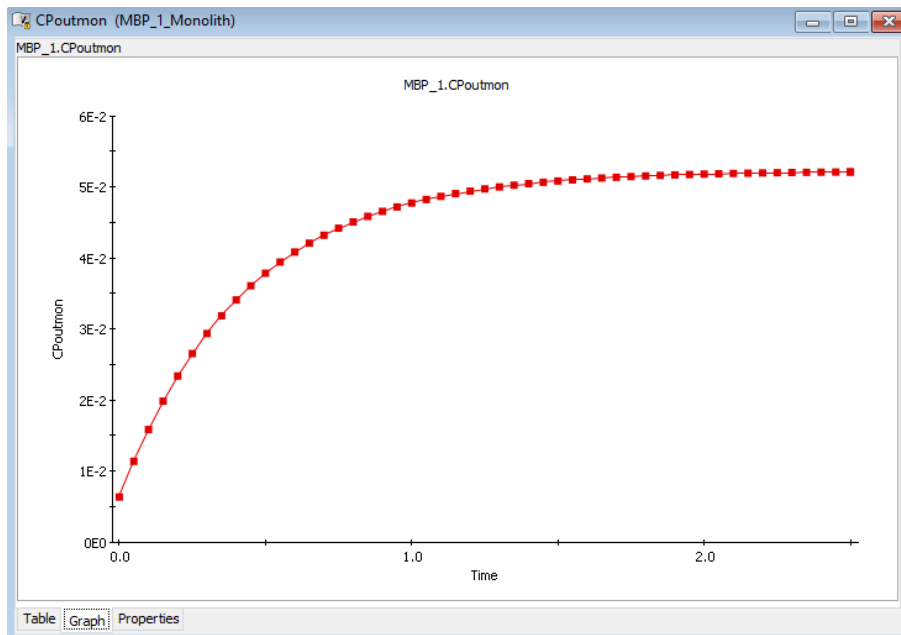
**Figura A.32. Valor de la concentración de proteína en el monolito a  $z=1.0$  cm generada con el balance de materia.**



**Figura A.33. Valor de la concentración de proteína en el monolito a  $z=1.5$  cm generada con el balance de materia.**

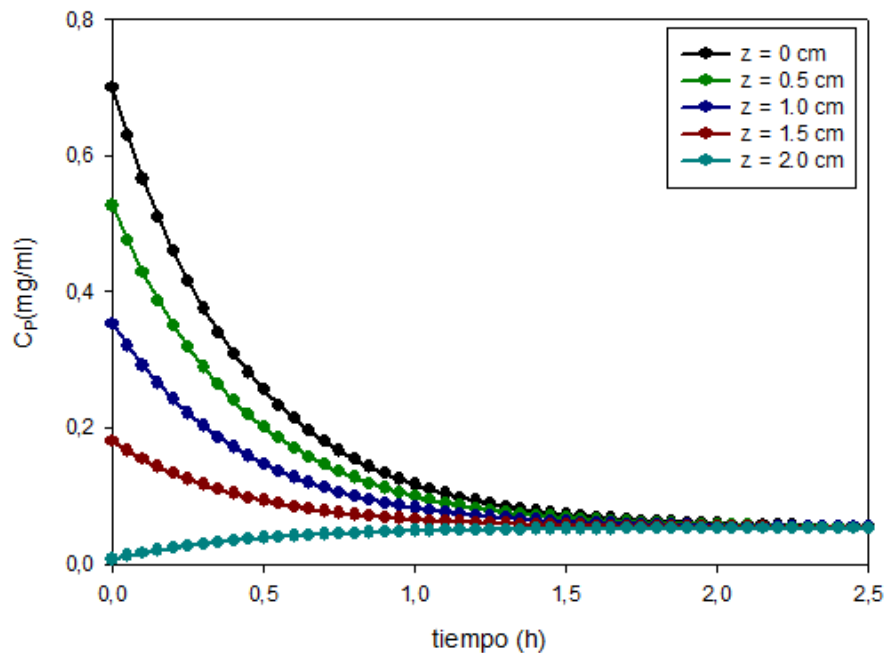


**Figura A.34. Valor de la concentración de proteína en el monolito a  $z=2.0$  cm generada con el balance de materia.**



**Figura A.35. Valor de la concentración de proteína a la salida del monolito generada con el balance de materia.**

Por tanto, en el interior del monolito, la proteína varía de la siguiente forma:



**Figura A.36. Representación de la concentración de proteína (mg/mL) a diferentes alturas del monolito (cm) a lo largo del proceso de adsorción en el monolito.**

Así se tiene caracterizada la concentración de proteína en cada punto de la instalación y en cada instante.

Este modelo se puede extrapolar a cualquier otra concentración inicial de proteína, por lo que también tiene capacidad predictiva.



## **Apéndice B.**

### **Publicaciones**





# Advanced Model-Based Control Strategies for the Intensification of Upstream and Downstream Processing in mAb Production

**Maria M. Papathanasiou** 

Dept. of Chemical Engineering, Centre for Process Systems Engineering (CPSE), Imperial College London, London SW7 2AZ, U.K.  
Artie McFerrin Department of Chemical Engineering, Texas A&M University, College Station, TX 77843

**Ana L. Quiroga-Campano**

Dept. of Chemical Engineering, Centre for Process Systems Engineering (CPSE), Imperial College London, London SW7 2AZ, U.K.

**Fabian Steinebach**

Institute for Chemical and Bioengineering, ETH Zurich, olfgang-Pauli-Str. 10/HCI F 129, W, Zurich CH-8093, Switzerland

**Montaña Elviro**

Dept. of Chemical Engineering, Centre for Process Systems Engineering (CPSE), Imperial College London, London SW7 2AZ, U.K.

**Athanasios Mantalaris**

Dept. of Chemical Engineering, Centre for Process Systems Engineering (CPSE), Imperial College London, London SW7 2AZ, U.K.

**Efstratios N. Pistikopoulos\***

Artie McFerrin Department of Chemical Engineering, Texas A&M University, College Station, TX 77843

DOI 10.1002/btpr.2483

Published online 00 Month 2017 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

*Current industrial trends encourage the development of sustainable, environmentally friendly processes with minimal energy and material consumption. In particular, the increasing market demand in biopharmaceutical industry and the tight regulations in product quality necessitate efficient operating procedures that guarantee products of high purity. In this direction, process intensification via continuous operation paves the way for the development of novel, eco-friendly processes, characterized by higher productivity and lower production costs. This work focuses on the development of advanced control strategies for (i) a cell culture system in a bioreactor and (ii) a semicontinuous purification process. More specifically, we consider a fed-batch culture of GS-NS0 cells and the semicontinuous Multicolumn Counter-current Solvent Gradient Purification (MCSGP) for the purification process. The controllers are designed following the PAROC framework/software platform and their capabilities are assessed in silico, against the process models. It is demonstrated that the proposed controllers efficiently manage to increase the system productivity, returning strategies that can lead to continuous, stable process operation. © 2017 American Institute of Chemical Engineers Biotechnol. Prog., 000:000–000, 2017*

*Keywords: process intensification, continuous biomanufacturing, advanced control, process monitoring, monoclonal antibodies*

## Introduction

Mammalian cell culture systems are being extensively used by global manufacturers for the commercial production of high value biologics, such as monoclonal antibodies (mAbs). Despite their beneficial properties and their rapidly increasing market,<sup>1</sup> mAbs are now facing competition stemming from the emergence of biosimilars and other therapeutic agents of similar properties, lower production costs, and

shorter time-to-market. Such products provide a cost-effective alternative and their market is rapidly increasing.<sup>2</sup> There is, therefore, an eminent need for the mAb market to shift toward more cost-effective solutions and smart manufacturing that could result into higher process yield, cheaper end-products, and shorter production times.<sup>3–5</sup>

MAb production consists mainly of the upstream (USP) and the downstream processing (DSP). USP refers to the culturing of the cells that are used as the expression system for the production of the targeted product, while DSP involves a series of separation/purification steps of the upstream mixture. Currently, cell culture systems are operated to a great extent in fed-batch mode, while separation processes are characterized by periodic, batch profiles. However, competition is instructing ground-breaking changes in the current state-of-the-art and a

\*Current address of Montaña Elviro: Department of Chemical Engineering, School of Chemical Sciences, University of Salamanca, Plaza de los Caídos 1-5, 37008, Salamanca, Spain

Correspondence concerning this article should be addressed to E. N. Pistikopoulos at stratos@tamu.edu.

paradigm shift toward continuous biomanufacturing. Continuous operation is coupled with a series of advantages, such as high productivity and improved product quality as the process is running uninterrupted, providing greater uniformity. Furthermore, the shift from batch to continuous operation leads to a significant decrease of both the holdup steps and the production time, thus minimizing the risk of product degradation.<sup>6–9</sup>

However, a shift from batch to a fully integrated, continuous operation is not a trivial task and is associated with a plethora of challenges. The latter can arise from the optimal equipment design, the quality assurance, and the monitoring and control of the new production line. More specifically, in the case of the upstream, it is necessary to ensure that the continuous system will be characterized by similar or higher productivity, improved product quality, while the equipment size is decreased. Similarly, in downstream processing and in particular in the case of chromatographic separation processes, it is essential to optimize and/or redesign current equipment to allow handling of larger load volumes, while minimizing equipment and material cost.<sup>10–14</sup> From a process stand point, it is necessary to ensure that the integrated bioprocess is adequately and efficiently monitored and controlled to achieve maximum and stable product quality and yield. Control and monitoring of such complex processes is a challenging task that is now coupled with the continuous operation, rendering online measurements even more challenging to obtain. On that end, the development of advanced computational tools can facilitate changes in the current state-of-the-art of biomanufacturing, providing a basis for simulations of reduced cost. In addition, it can pave the way toward the design of advanced optimization strategies and control policies that will ensure feasible, optimal, and stable operation. Furthermore, in silico experimentation allows the comparison of various operating scenarios and reduces significantly labor time and cost.

As mentioned earlier, the move from batch to continuous operation is considered to be a fundamental change in the status quo that requires thorough consideration and investigation of several factors that affect both process counterparts. The vision of a fully integrated bioprocess can also be facilitated through gradual development of each process independently, leading to hybrid intermediates (e.g., continuous upstream and batch downstream).<sup>15,16</sup> The optimization of USP and DSP prior to their integration can smoothen significantly their integration procedure. In this work, we are focusing on the design and testing of dynamic process models and advanced controllers for both an upstream and a downstream system, in an independent fashion. In particular, we present novel control approaches for the maximization of the productivity of a mammalian cell culture system and for the control of a semicontinuous periodic chromatographic separation process, where we aim to efficiently track the process dynamics. To compensate for the effect of USP on DSP, here we consider the composition of the upstream harvest as disturbance for the separation process.

## Theoretical Background

### From mathematical modeling to advanced control

The development and testing of the computational tools discussed above requires the application of robust procedures that can guarantee the efficiency of the designed optimization and control policies. Moreover, from a computational

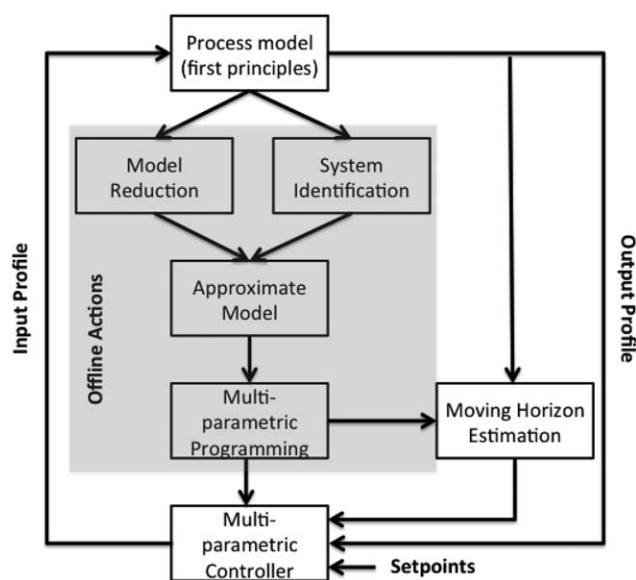


Figure 1. The general PAROC framework.<sup>17</sup>

perspective, the mathematical models describing such processes are usually highly complex and require significant computational force to be simulated. In addition, nonlinearities present in the model equations might render the optimization and control studies impossible to perform. Therefore, prior to the execution of the in silico experimentation, the design of a detailed computational protocol is required that will guarantee seamless development and testing of the respective tools. In this work, we follow the PAROC (PARAmetric Optimization and Control) framework and software platform (Figure 1) for the design and testing of advanced controllers.<sup>17</sup> PAROC is a comprehensive framework that allows the execution and design of advanced optimization and control studies based on high-fidelity, dynamic mathematical models. The framework comprises four distinct steps that are explained below in detail: (i) high-fidelity modeling and analysis, (ii) model approximation, (iii) model-based control, and (iv) “closed-loop” control system validation.

**High-Fidelity Modeling and Analysis.** As mentioned above, mathematical models play a vital role in the in-silico experimentation. Following the procedure suggested by Kiparissides et al.,<sup>18</sup> the first step of the framework is dedicated to the formulation and validation of a rigorous, dynamic model, based on first principles. Once the model structure has been finalized, the impact of the parameter uncertainty on the model output is assessed (Global Sensitivity Analysis, GSA) and the significant parameters are estimated using experimental data (Parameter Estimation, PE). The model predictability is also evaluated and the model is used for both open loop simulations of the examined system, and optimization studies. Within PAROC, the actions described here are executed using gPROMS<sup>®</sup> Model-Builder<sup>19</sup> for the model simulation and the optimization, while the GSA and PE are performed using gPROMS<sup>®</sup> Model-Builder in conjunction with MATLAB<sup>®</sup>, via the gO:MATLAB interface.

**Model Approximation.** Usually, the models designed in the previous step contain large sets of Partial and/or Ordinary Differential and Algebraic Equations (PDAE and/or ODAE) that involve highly nonlinear terms, thus leading to computationally expensive simulations. Therefore, it is often

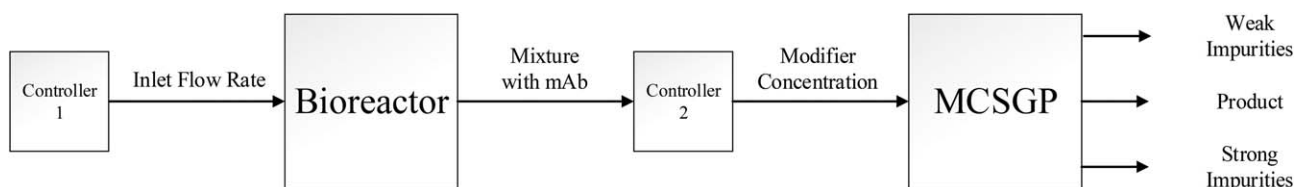


Figure 2. Control scheme of the examined bioprocess.

necessary to simplify the model formulation and replace it with a linear system representation that will allow control studies to be successfully performed.<sup>20,21</sup> PAROC suggests the model approximation to be realized via either (i) system identification or (ii) model reduction techniques. The principal difference of the two methods is that the latter is based on formal techniques that reduce the model complexity, while maintaining the physical interpretation of its entities, while system identification is based on statistical methods that may lead to linear representations without physical meaning. However, both methods aim to design linear models (state space) that are suitable for the formulation and solution of the control problem later on. In this work, we perform the model approximation via system identification, using the System Identification Toolbox (*ident*) from MATLAB<sup>®</sup>. For the identification procedure, we excite the high-fidelity model under random input within the range of interest. More specifically, we vary both the input and the disturbances and we monitor the response of the tracked outputs. The nature of disturbances can be: (i) measured: corresponding to changes in the system inputs (e.g., composition of feed stream, sampling flow rate) that can be predicted and/or experimentally predefined or (ii) unmeasured: referring to disturbances that can unexpectedly occur during operation. The input/measured disturbance-output data set is used for the design of linear state space models.

**Model-Based Control.** The state space model designed in the previous step is used here for the formulation of the control problem, employing receding horizon policies. PAROC suggests the development of advanced controllers based on multiparametric programming techniques, Multi-parametric Model Predictive Control (mp-MPC) techniques. Mp-MPC combines the advantages of classical MPC with the ability to solve the optimization problem offline, thus improving the controller performance during online operation.<sup>22</sup> In comparison to other control strategies (such as PID control), mp-MPC is model-based and can therefore predict the system behavior in the future. In addition, the controller can account for disturbances that are crucial for the product quality in such systems. For example, variations in the pH, temperature, and culture volume can significantly affect the final product quality. Moreover, the solutions can be stored in small devices (MPC-on-a-chip)<sup>23</sup> that can be highly beneficial for continuous processes, where the equipment size is reduced. The control formulations are solved within MATLAB<sup>®</sup> using the POP toolbox.<sup>24</sup> The framework accounts also for cases when the measured output may be noisy and the system measurements do not produce this information directly. The latter is performed through the use of constrained estimation techniques such as the moving horizon estimator (MHE).<sup>25–27</sup> However, the application of MHE is not investigated in this work.

**“Closed-Loop” Control System Validation.** Following the solution of the control problem, the designed controllers are tested in silico against the process model that is used as

the in silico representation of the physical system. This is a “closed-loop” procedure, where the dynamic model is simulated in tandem with the controller and the performance of the latter is assessed. For the closed-loop validation, we use gPROMS<sup>®</sup> ModelBuilder for the model simulation in tandem with MATLAB<sup>®</sup>, utilizing the gO:MATLAB interface.

### Monoclonal antibody biomanufacturing

Usually, mAb biomanufacturing comprises two main steps: (a) the upstream and (b) the downstream. The upstream refers to the culturing of the cells, where the antibody is produced, while the downstream is responsible for the separation of the upstream mixture and the purification of the targeted product. In particular here we consider (a) a GS-NS0 cell culture system for the production of a chimeric IgG4 antibody and (b) a semicontinuous, chromatographic separation process for the purification of the upstream mixture. Figure 2 illustrates the bioprocess as considered in this work and the proposed control scheme. For the purposes of this work, we consider the upstream and the downstream as two distinct systems for which we develop independent control strategies. It is evident that the operation of the upstream is not dependent on its downstream counterpart; however, that does not hold for the case of the downstream. The performance of the latter is highly dependent on the mixture resulting from the bioreactor and therefore the designed controller (Controller 2) should account for variations in the upstream mixture. The two systems are explained below in detail.

**Upstream: GS-NS0 Cell Culture System.** We consider a cell culture system of the GS-NS0 mammalian cell line, for the production of the chimeric IgG4 antibody, in a 1 L bioreactor with 200 mL working volume. Based on previously presented work,<sup>28</sup> we investigate a simplified metabolic network (Figure 3) that describes the uptake of nutrients used in the examined system. Namely, we consider glucose and four key amino acids: aspartate, arginine, asparagine, and glutamate. The nutrients are utilized through different pathways for biosynthesis, energy production, and mAb assembling (Figure 3).

In particular, glucose is the most predominant carbohydrate that participates in various metabolic pathways, such as (1) the pentose phosphate pathway (PPP) for the production of DNA precursors, (2) the anaerobic pathway or glycolysis for the production of energy, and (3) the aerobic pathway, where it is completely oxidized through the tricarboxylic acid (TCA) cycle. On the other hand, glutamate is a key compound in cellular metabolism as it represents the only source of glutamine.<sup>29,30</sup> It has been observed that in GS-NS0 cultures, glutamate consumption is preferred over glucose and therefore, glutamate depletion leads to a decrease in the growth rate. Nevertheless, the cells can still continue to grow utilizing other amino acids, such as arginine, whose catabolism leads to glutamate production. Another key

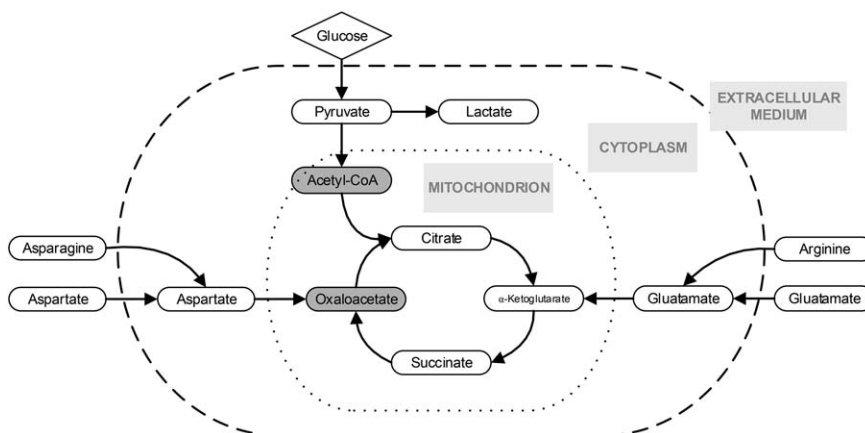


Figure 3. Metabolic network considering the basic pathways.

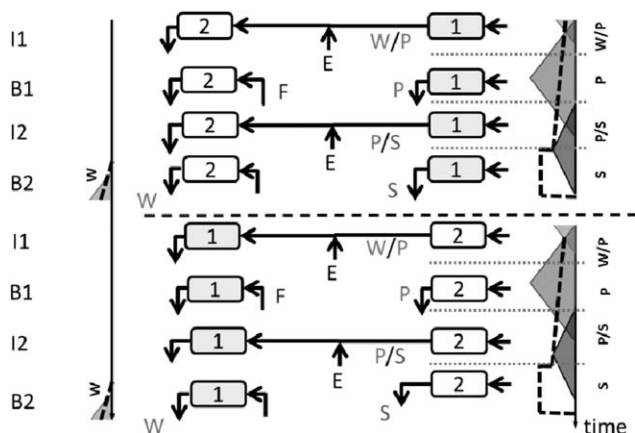


Figure 4. The twin-column MCSGP as presented by Krattli et al.<sup>41</sup>

amino acid considered in this work is aspartate that is crucial for energy production (through the TCA cycle). When aspartate is exhausted, asparagine can be converted into aspartate through the reaction catalyzed by asparaginase, to compensate for aspartate depletion.<sup>31</sup>

Although cell culture systems have been studied for several years, the lack of PAT technologies limits their capabilities. Currently, cell culture systems operate to a great extent in fed-batch mode, while *in situ* monitoring relies on sensors and electrodes measuring basic process parameters (e.g., pH, dissolved oxygen, temperature, airflow, pressure, etc.).<sup>32</sup> The lack of more advanced online measurements hinders eventually the development of advanced process control tools that can improve the process efficiency. Despite the aforementioned obstacles, significant contributions have been reported in the control of mammalian cell cultures systems.<sup>32–37</sup> Most of the presented studies rely either on an overwhelming amount of measurements or mathematical models and optimization procedures of excessive computational requirements. Therefore, the proposed methodologies, in spite of their experimental success, can become significantly expensive when applied in industrial scale. Consequently, the design of advanced control strategies of reasonable feedback requirements that are trained to reject system disturbances becomes imperative. In continuous processing, additional factors need to be considered in the design of a global control strategy, such as the interaction between the multiple units of the production line.<sup>38</sup> To overcome the regulatory

hurdles, the developed schemes need to minimize risk of failure and ensure process robustness prior to their online application. Therefore, the application of detailed frameworks for the design and testing of advanced controllers for such systems is of vital importance.

*Downstream: Semicontinuous, Chromatographic Separation Process.* For the downstream purification process, we consider a semicontinuous, ion-exchange chromatographic process. The Multicolumn Countercurrent Solvent Gradient Purification (MCSGP) process is used for the purification of various biomolecules and was originally presented by Aumann and Morbidelli.<sup>39</sup> In this work, we examine the separation of a ternary mixture including weak impurities (W) (fragments), product (P), and strong impurities (S) (aggregates). The current setup comprises two, identical chromatographic columns that alternate between batch and continuous operation.<sup>40</sup> The two columns start empty and equilibrated (Figure 4). During the first interconnected operation (I1), the impure fraction containing weak impurities and product is recycled from column 1 to column 2 with an additional fragment of eluent (E) (referring to the modifier, the salt used to induce separation). After the completion of I1, the columns switch to batch mode (B1) where fresh feed (F) is introduced to column 2 and product is eluted from column 1. Following that, the two columns switch again to continuous mode, where the impure fraction containing product and weak impurities is recycled from column 1 to column 2. By the end of the I2 phase, column 2 starts eluting weak impurities (B2 phase). B2 phase is completed when column 2 starts eluting the impure fraction containing weak impurities and product. At this point, the two columns swap places and the procedure described above is repeated.

For seamless upstream/downstream integration, it is essential that the control schemes developed for the two counterparts are able to coordinate with one another. For this reason, both schemes suggest tracking the antibody concentration as output, allowing uninterrupted monitoring throughout the process course. In addition, impurities resulting from the cell culture system can be treated as disturbances by the downstream controller, eliminating therefore the need for accurate online measurements on their concentration. The downstream control scheme presented in Figure 5 accounts for the two process modes of MCSGP (batch and continuous, Figure 4). The work on the controller development for the MCSGP process is described in Appendix A.

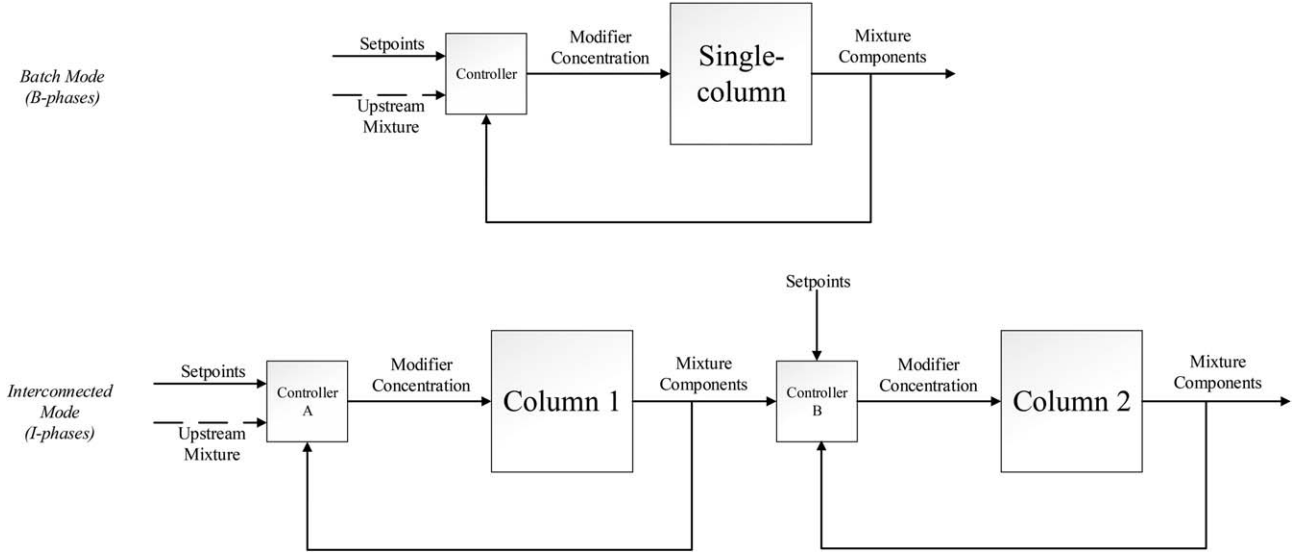


Figure 5. Proposed control scheme for the downstream system.

Table 1. Mathematical Model Describing the Upstream System

$\frac{dV}{dt} = F_{IN} - F_{OUT}$	(E.1)	$\frac{d(V[GLU])}{dt} = VX_v \left( Q_{glu,arg} - Q_{x,glu} - Q_{tca,glu} \right) + F_{IN}[GLU]_{IN} - F_{OUT}[GLU]$	(E.12)
$\frac{dVX_v}{dt} = VX_v(\mu - \mu_d) - F_{OUT}X_v$	(E.2)	$Q_{glu,arg} = C_{arg} Q_{tca,glu}$	(E.13)
$\frac{dVX_d}{dt} = VX_v\mu_d - F_{OUT}X_d$	(E.3)	$Q_{x,glu} = \frac{\mu}{Y_{x,glu}}$	(E.14)
$\mu = \mu_{max} \left( \frac{[GLC]}{K_{glc} + [GLC]} \right) \left( \frac{[GLU]}{K_{glu} + [GLU]} + \frac{[ARG]}{K_{arg} + [ARG]} \right) \left( \frac{[ASP]}{K_{asp} + [ASP]} + \frac{[ASN]}{K_{asn} + [ASN]} \right)$	(E.4)	$Q_{tca,glu} = \frac{\mu}{Y_{tca,glu}} + m_{tca,glu}$	(E.15)
$\mu_d = \mu_{d,max} \left( \frac{K_{glc,lim}}{K_{glc,lim} + [GLC]} + \frac{K_{glu,lim}}{K_{glu,lim} + [GLU]} + \frac{K_{asp,lim}}{K_{asp,lim} + [ASP]} + \frac{K_{arg,lim}}{K_{arg,lim} + [ARG]} + \frac{K_{asn,lim}}{K_{asn,lim} + [ASN]} \right)$	(E.5)	$\frac{d(V[ARG])}{dt} = -VX_v(Q_{glu,arg} + Q_{x,arg}) + F_{IN}[ARG]_{IN} - F_{OUT}[ARG]$	(E.16)
$\frac{d(V[GLC])}{dt} = -VX_v(Q_{x,glc} + Q_{glyc,glc} + Q_{tca,glc}) + F_{IN}[GLC]_{IN} - F_{OUT}[GLC]$	(E.6)	$\frac{d(V[ASP])}{dt} = VX_v(Q_{asp,asn} - Q_{x,asp} + Q_{tca,asp}) + F_{IN}[ASP]_{IN} - F_{OUT}[ASP]$	(E.17)
$Q_{x,glc} = \frac{\mu}{Y_{x,glc}}$	(E.7)	$Q_{asp,asn} = C_{asn} Q_{tca,glu}$	(E.18)
$Q_{glyc,glc} = (1 - Q_{MET}) \left( \frac{\mu}{Y_{glyc,glc}} + m_{glyc,glc} \right)$	(E.8)	$Q_{x,asp} = \frac{\mu}{Y_{x,asp}}$	(E.19)
$Q_{MET} = \frac{K_{MET}}{K_{MET} + [GLU]}$	(E.9)	$Q_{tca,asp} = C_{asp} Q_{tca,glu}$	(E.20)
$Q_{tca,glc} = \frac{\mu}{Y_{tca,glc}} + m_{tca,glc}$	(E.10)	$\frac{d(V[ASN])}{dt} = -VX_v(Q_{asp,asn} + Q_{x,asn}) + F_{IN}[ASN]_{IN} - F_{OUT}[ASN]$	(E.21)
$\frac{d(V[LAC])}{dt} = VX_v 2[Errorhx2217]Q_{gly,glc} - F_{OUT}[LAC]$	(E.11)	$\frac{d(V[mAb])}{dt} = VX_v m_{mAb,x}$	(E.22)

## Results

We use the processes described above for the development of advanced, mp-MPC controllers following the PAROC framework. For the controller design, we treat each system as an independent unit and therefore we present two control schemes: one for the upstream and a second one for the downstream. To compensate for the effect of the USP on DSP, here we consider the upstream harvest composition as disturbance for the downstream system.

### The upstream system

*The Process Model.* For the upstream system, we consider a 1 L bioreactor with 200 mL working volume, where samples of 1 mL are taken every 6 h. The system (Figure 3) is described by an unstructured, nonsegregated, Monod-kinetics model that comprises 21 Ordinary Differential Equations (ODEs), 24 variables, and 27 parameters (Table 1).

It should be underlined that the presented model considers an outlet flow rate ( $F_{OUT}$ ) that allows the formulation to

account for sampling and/or outlet flow. The presented model can be used for either of the following cases: (i) batch ( $F_{OUT}$  considers only the sampling), (ii) fed-batch ( $F_{OUT}$  considers only the sampling), and (iii) continuous ( $F_{OUT}$  considers both sampling and a continuous outlet flow). For the purposes of this work, we studied a fed-batch system. Following the framework presented by Kiparissides et al.,<sup>18</sup> we perform Global Sensitivity Analysis for the identification of the significant model parameters that are later estimated using experimental data. Moreover, the model is validated against experimental data and its predictive capabilities are assessed (Appendix A, Figures A.1, A.2). The model simulation and the parameter estimation are performed in gPROMS<sup>®</sup> Model-Builder v4.2.0,<sup>19</sup> while the sensitivity analysis is executed through the gO:MATLAB interface that allows in tandem utilization of gPROMS<sup>®</sup> Model-Builder and MATLAB<sup>®</sup>. For more information on the model development, analysis, and validation, the reader is referred to Appendix A.

*Model-Based Optimization for the Maximization of the Productivity in GS-NSO Cell Cultures.* The presented model is used as a basis for the design of a dynamic optimization

problem for the maximization of the culture productivity. The suggested formulation (Table 2) aims to maximize the final concentration of mAb, administrating GS-Supplement (SAFC Biosciences, Sigma-Aldrich, UK) X40 and 0.4 M glucose in fed-batch fashion.

Aiming to move toward continuous operation, here we present an optimization strategy based on longer time intervals. In particular, the culture time (168 h) is separated in 76 intervals and the optimizer is let free to design a feeding strategy that will lead to maximum productivity. Owing to the plethora of nutrients available at the beginning of the culture, initially we design a scarcer feeding strategy that we intensify after the 20<sup>th</sup> hour (2 h intervals) (Figure 6a), when nutrients concentrations start to decrease significantly (Figure

**Table 2. Formulation of the Dynamic Optimization Solved for the Maximization of the Productivity of the GS-NS0 Cell Culture System**

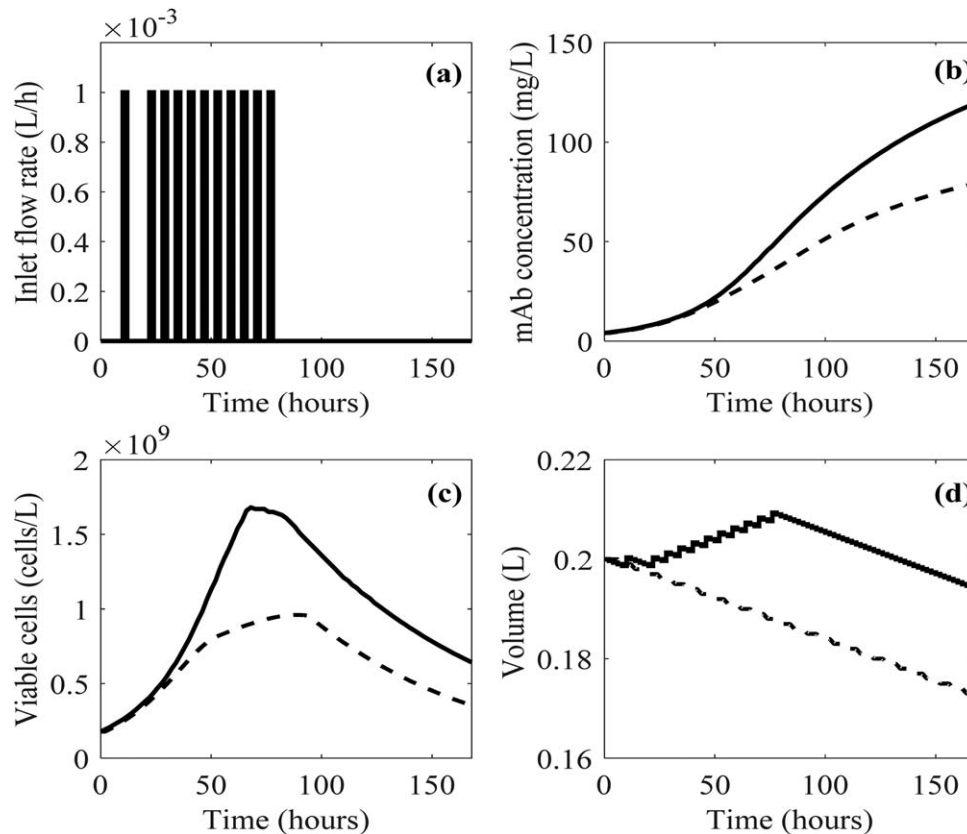
Objective Function	max [mAb]
<i>subject to</i>	
The process model:	$x_i(t)=f_i(X_j(t), u(t), t), i,j=1 \dots 10$
Control variable:	$u(t)=F_{in}(t)$
Inequality constraints:	$0.9 \times V_0 \leq V \leq 1.1 \times V_0$ $F_{LB} \leq F_{in} \leq F_{UB}$
Initial conditions:	
$V_0=0.2$ L	$X_{V,0}=1.78 \times 10^8$ cells/L
$[mAb]_0=4.06$ mg/L	$X_{D,0}=4.4 \times 10^7$ cells/L
$[GLC]_0=19.8$ mM	$[GLU]_0=1.03$ mM
$[ASP]_0=0.45$ mM	$[ASN]_0=1.03$ mM
$[ARG]_0=0.99$ mM	$[LAC]_0=0.73$ mM
Total amount removed from sampling:	$F_{out, tot}=28$ mL

7). To maintain the culture under optimal condition, we consider a tight constraint on the total culture volume, and on the inlet flow rate of the supplement. Moreover, we allow 28 mL sampling volume to be removed throughout the culture period. The optimization studies are executed in gPROMS<sup>®</sup> ModelBuilder and the results are presented here.

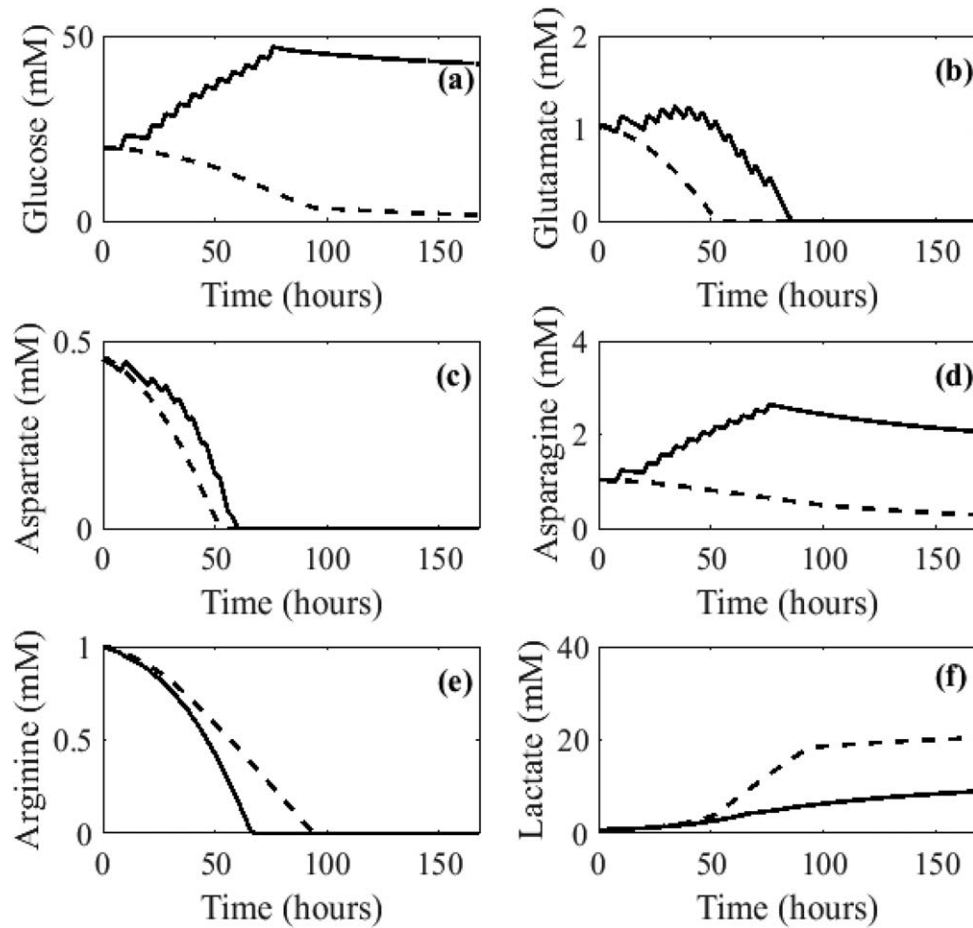
Figure 6a demonstrates the proposed feeding strategy, where medium is introduced in pulses of 2 h duration. Based on the applied strategy, the feeding is intensified after the 20<sup>th</sup> hour; however, it is observed that the dynamic optimizer suggests that fresh medium should be administrated only until the 70<sup>th</sup> hour. The proposed schedule results in a higher mAb concentration by the end of the culture (approximately 1.4-fold higher than the batch system). Moreover, it is demonstrated that the depletion of 3 of the key nutrients (glutamate, aspartate, and arginine) (Figures 7b,c,e) leads to decrease cell growth and subsequently cell death. The dynamic optimization results provide the basis for the development of the presented control studies and the determination of the respective setpoints.

*Control Scheme.* The proposed controller aims to achieve the maximum productivity setpoint as determined by the open-loop dynamic optimization (Figure 6b), feeding GS-Supplement (SAFC Biosciences, Sigma-Aldrich, UK) X40 and 0.4 M glucose (Table 3), while maintaining the working volume within  $\pm 10\%$  of the starting value.

Figure 8 demonstrates the scheme considered for the development of the controller, where the setpoints are assigned by the operator, for the maximization of the mAb concentration (tracked output). As manipulating variable, we



**Figure 6. Simulation results after the solution of the dynamic optimization problem for 168 h of culture: (a) optimal feeding strategy, (b) volumetric mAb concentration for batch (- -) and fed-batch (—) system, (c) viable cell population for batch (- -) and fed-batch (—) system, and (d) culture volume for batch (- -) and fed-batch (—) system.**



**Figure 7.** Simulation results after the solution of for batch ( - - ) and fed-batch ( - ) system: (a) glucose, (b) glutamate, (c) aspartate, (d) asparagine, (e) arginine, and (f) lactate over 168 h of culture.

**Table 3.** Composition of the Feeding Medium Used in this Work

Component	Concentration
Glucose	400 [mM]
Glutamate	20.39 [mM]
Arginine	0 [mM]
Aspartate	3.91 [mM]
Asparagine	22.71 [mM]

**Table 4.** Key Features of the State Space Model Designed for the Bioreactor System

Feature	Corresponding Entity/Value
Input	Feed flow rate
Output	mAb concentration, culture volume
Disturbance	Periodic sampling (1 mL every 6 h)
Number of states	4
Sampling time ( $T_s$ )	2 h

consider the inlet flow rate of the feeding medium, while the flow rate corresponding to the periodic sampling is treated as disturbance. In addition, the formulation of the control problem accounts for the aforementioned volume constraint.

**Model Approximation.** The high-fidelity, process model (Table 1) is characterized by nonlinear equations that increase significantly the computational expense of control studies. Therefore, an intermediate step is required, where the process model is reformulated to a state space, linear representation. In this work, this is performed using system identification techniques. The model input (inlet flow rate of

**Table 5.** State Space Model Formulation

$$x(t+T_s) = Ax(t) + Bu(t) + Cd(t) \quad \text{(Equation 1)}$$

$$y(t) = Dx(t) \quad \text{(Equation 2)}$$

the feeding medium) is adequately excited and the behavior of the tracked output (mAb concentration) is monitored (Figure 9). In addition, here we consider a periodic sampling of 1 mL every 6 h that is introduced as measured disturbance for the design of the state space model (Figure 9b). The fit illustrated on Figure 9c corresponds to the mismatch between the state space and the process model. In this case, there is a 95.13% agreement between the output of the linear model and the one generated by the high-fidelity model. Moreover, standard practice indicates that the culture volume should not vary more than  $\pm 10\%$  from its starting value. Consequently, to ensure that the volume is maintained within the permitted range, we consider it as an additional system state and an output with a predefined setpoint. Owing to the principles upon which system identification is based (Table 5), the states of the state space model ( $x$ ) do not correspond to any of the physical entities of the original model. On the contrary, the outputs ( $y$ ) correspond to the mAb concentration and the culture volume, while the disturbances ( $d$ ) represent the sampling flow rate and the input ( $u$ ) corresponds to the feed flow rate. As explained in Model Approximation, the states of the state space model do not correspond to any physical entity and therefore it suffices to initialize them from a feasible point. It should be underlined that the linear

**Table 6. Tuning Parameters, as They are Set for the Proposed Controlled Problem in the Upstream Process**

Tuning Parameter	Explanation	Value	Tuning Parameter	Explanation	Value
OH	Output Horizon	4	$U_{\min}$	Input upper bound	0
NC	Control Horizon	2	$U_{\max}$	Input lower bound	1
QR	Weights on the outputs	1E3 $I$	$D_{\min}$	Disturbance upper bound	0
Q	Weights on the states	$I$	$D_{\max}$	Disturbance lower bound	0.1
R	Weights for the inputs	0.01			
P	Terminal weight for the states	Riccati equation*			

\*The Riccati equation is as follows:  $P=A^T P A-(A^T P B)(B^T P B+R)^{-1}(A P B)+Q$ , where  $A$  and  $B$  are the matrices of the state space model and  $P$ ,  $R$ ,  $Q$  are the tuning parameters used for the control problem formulation.

model designed in this step is used solely to facilitate the development of the model-based controller later on. The in silico assessment of the controller behavior is based on the dynamic process model. Table 4 summarizes the key features of the designed linear model, where a sampling time ( $T_s$ ) of 2 h is used. The sampling time corresponds to the discretization step used for the formulation of the state space model and therefore the frequency that the controller is updated during the closed-loop validation and/or online operation.

Where  $x$ ,  $u$ ,  $y$  are the states, inputs (modifier concentration), and outputs (mAb concentration), respectively;  $t$  corresponds to the time;  $T_s$  is the sample time; and  $A$ ,  $B$ ,  $C$ ,  $D$  represent the matrices of the state space model.

$$A = \begin{bmatrix} 0.5441 & -0.04234 & 0.04154 & 0 \\ 0.003578 & 0.9867 & 0.001953 & 0 \\ -1.684 & -0.1334 & 1.126 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

$$B = \begin{bmatrix} 1.718e+4 \\ -1242 \\ 7.411e+4 \\ 7200 \end{bmatrix}$$

$$C = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ -120 \end{bmatrix}$$

$$D = \begin{bmatrix} 51.69 & -90.72 & -13.25 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

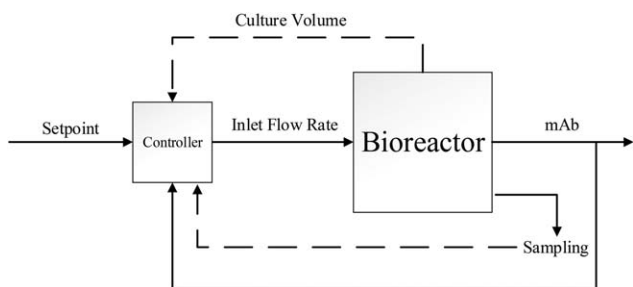
**Controller Design and “Closed-Loop” Validation.** The multiparametric programming problem is formulated and solved based on the state space model described in Control Scheme. Table 6 summarizes the control parameters chosen for the design of the mp-MPC. The control problem comprises 8 parameters and is solved for an output horizon of 4 and a control horizon of 2, using POP toolbox<sup>24</sup> in MATLAB<sup>®</sup>. Following its design, the controller is validated in-silico, in “closed-loop” fashion against the process model. The validation is facilitated using the gO:MATLAB interface that allows seamless data exchange between MATLAB<sup>®</sup> (control actions) and gPROMS<sup>®</sup> ModelBuilder (process model). The model is simulated for 168 h (7 days), under periodic sampling (Figure 10b) and the behavior of the controller is assessed. Here, we aim to increase the antibody concentration produced by the culture system and therefore the setpoint is set to a maximum target value obtained from the dynamic optimization). In this study, the setpoint is set

to the target value obtained by the dynamic optimization upon which the performance of the controller is assessed. There are cases, however, where the setpoint is subjected to changes based on the system performance and variations that can occur in the operating conditions.<sup>36,37</sup> While this has not been addressed in this work, it could be achieved either (i) by in tandem operation of the controller with a dynamic optimizer that can recalculate the optimal setpoint, based on the operating conditions and constraints<sup>42</sup> or (ii) by employing estimation techniques.<sup>17,27</sup>

The “closed-loop” simulation is based on the original, nonlinear process model that is assumed to accurately represent the real system (i.e., plant). Consequently, the system dynamics are fully incorporated in the validation, allowing the controller to be assessed against an in silico representation of the physical system. Therefore, based on the nature of mp-MPC, the plant-model mismatch is inherently incorporated in the formulation of the control problem,<sup>43</sup> and therefore, the assessment of the controller. Owing to its receding horizon nature, the controller calculates at every step the optimal actions for the subsequent time steps, based on the chosen output and control horizon. In this case, the controller requires feedback every 2 h to estimate the state of the output in the subsequent 4 steps (8 h) and calculate the optimal control actions for the next 2 steps (4 h). According to MPC theory, only the first control action is used, while the controller reiterates as it moves forward in time. In the presented case, samples are taken every 6 h. Nevertheless, the controller is designed to require feedback every 2 h, thus posing the challenge of measurement availability. In such cases, the validated mathematical model can be used to update the controller at times when measurements are unavailable. Due to its predictive, dynamic nature, the process model can predict the system state without requiring feedback from experimental measurements. However, it can be reinitialized at a more accurate state when measurements become available. The controller can be updated when measurements become available and re-estimate the upcoming optimal actions. Here, we choose to track the volumetric antibody concentration that can be monitored online using sensors available in the market (e.g., Bioprofile<sup>®</sup> Flex Analyser, Bionova). The latter offers the flexibility of obtaining an at-line initial, accurate estimate of the system state that can be corrected later on by the offline measurements (available every 6 h).

The presented results are based on the assumption that disturbances arise from the periodic sampling taken every 6 h (Figure 10b). Given that the schedule and amount of samples taken are known a priori, they are treated as measured disturbances from the examined case. However, disturbances can also be of unmeasured nature, arising from sudden changes in the system operation and/or variation in the feeding





**Figure 8.** Proposed control scheme for the upstream system.

composition. For such cases, robust mp-MPC can be employed<sup>17,44</sup> that train the controller to handle unmeasured deviations. Moreover, such controllers can be combined with estimation techniques (e.g., Moving Horizon Estimation)<sup>27</sup> to allow correction of the system states in case of unavailable and/or noisy measurements.

It is observed that the designed controller inherently suggests fed-batch feeding (Figure 10a, while the first pulse is introduced 8 h after the beginning of the culture and the feeding is intensified only after the 20<sup>th</sup> hour. During the beginning of the culture, the cells are growing slowly (adaptation/lag phase) and therefore the nutrient requirements are lower.<sup>45</sup> Consequently, the proposed feeding strategy minimizes the excess of nutrients in the culture and promotes the effective consumption of glucose, reducing the formation of toxic metabolites, such as lactate (Figure 12f).<sup>46,47</sup> In a similar fashion, the controller intensifies the feeding between 20 and 76 h of culture, where the culture is undergoing its exponential phase and maximum cell growth is achieved.

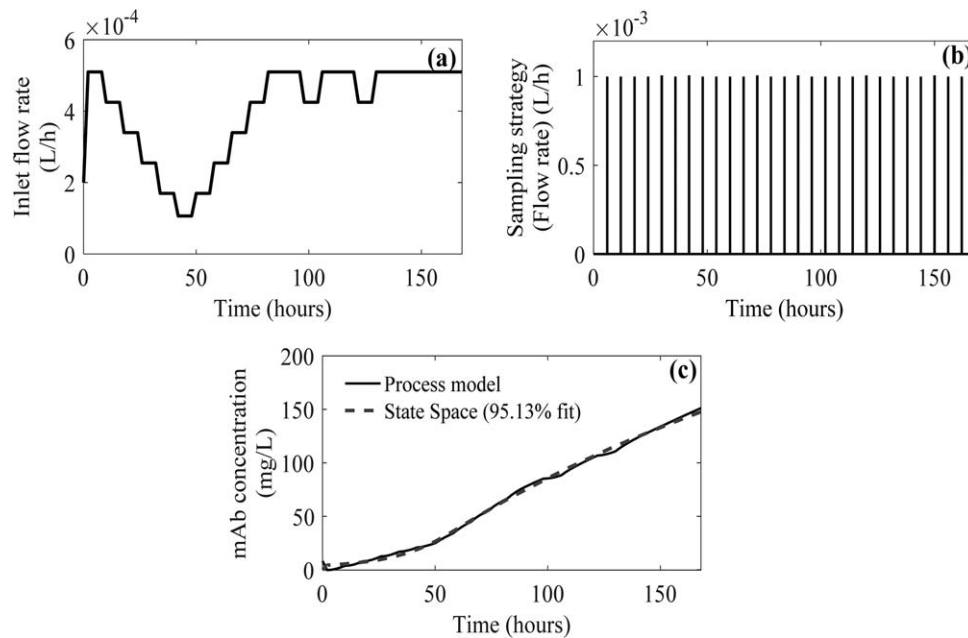
The suggested strategy for nutrient supply (Figure 10a) not only increases the number of viable cells but also prolongs the culture longevity (Figure 11b), leading to increased productivity (Figure 11a).<sup>48</sup> Counterintuitively, the controller suggests a scarcer feeding toward the end of the culture (beyond the 142<sup>nd</sup> hour). However, the latter is in agreement with standard experimental/industrial practice, as at this stage, the culture starts entering death phase that is an irreversible state. In particular, the exhaustion of arginine (66<sup>th</sup> hour), followed by the limitation of glutamate (84<sup>th</sup> hour), decreases the cell growth and activates cell apoptosis via starvation signals.<sup>49</sup> Therefore, any medium provided past this point would increase process waste and would not improve the culture productivity. Furthermore, these results provide a valid indication of the optimal time point that the culture should be terminated to minimize product degradation and therefore to improve the performance of the downstream purification. In addition, it is illustrated (Figure 10c) that the controller efficiently manages to maintain the working volume within the permitted range ( $\pm 10\%$  from the starting value of 0.2 L). The volume of feeding required to maintain the system in exponential growth, the accumulation of glucose and asparagine, and the limitation of glutamate and arginine reveal the opportunity to use the proposed computational platform to simultaneously optimize the feeding composition and feeding profile. In particular, the process model can be used for optimization studies that will elucidate optimal medium composition, while the controller will identify the optimal feeding strategy for the maximization of the culture productivity.

The presented control input (Figure 10a) results in increased culture productivity (Figure 11a, continuous line),

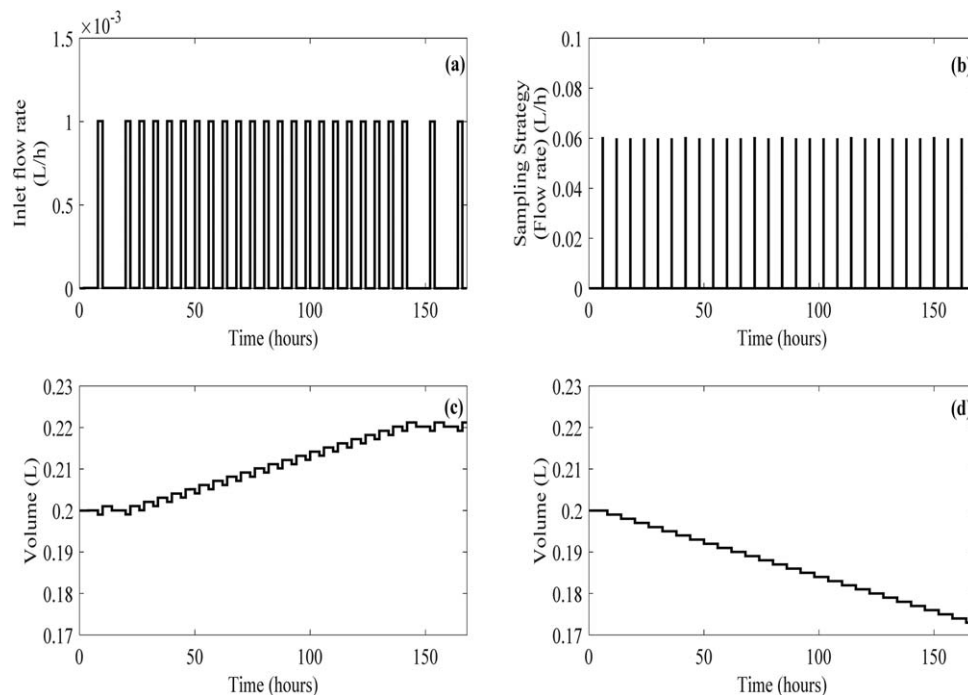
that is almost 1.4-fold higher compared to the batch system (Figure 11a, dotted line). In addition, the suggested feeding strategy results in higher cell densities and prolonged culture times (Figure 11b). The latter plays a vital role increasing the culture productivity, particularly under continuous operation, where the culture time should be increased to minimize start-up/shut-down costs.

*Comparison of Feeding Strategies.* Currently, in fed-batch cultures, measurements are taken every 24 h and therefore control strategies developed for such systems can only be updated once per day. However, to minimize the risk of failure in continuous operation, tighter monitoring and control strategies should be investigated. Previously we examined optimization and control strategies based on a 2 h interval. Here we examine the impact on the system performance of two new strategies: (a) a 4 h interval and (b) a tighter approach of 1 min intervals. The system performance is compared to the one described above, and to the batch operation.

The linear state space models for the 1 min and 4 h cases are derived directly from the linear model designed in the previous section, using a different discretization step. The system behavior and the interactions between the input (feed flow rate), the disturbance (sampling), and the outputs (culture volume and mAb concentration) remain the same. Appendix A demonstrates the details of the new approximate models (for  $T_s$  of 1 min and 4 h). For the formulation and solution of the two new control problems, we use the tuning parameters as presented in Table 6 the performance of the mp-MPC controllers is assessed here, in silico against the process model. For the “closed-loop” validation, we consider periodic sampling of 1 mL every 6 h (disturbance). Both controllers aim to increase the culture productivity (mAb concentration) using the setpoint obtained from the dynamic optimization studies and manipulating the inlet flow rate of the feed. For the latter, we consider feeding of the GS-Supplement (SAFC Biosciences, Sigma-Aldrich, UK) X40 and 0.4 M glucose, as before. The controller is simulated for 168 h (7 days) of culture and its performance is assessed. Figure 13 illustrates the feeding strategies as indicated by the controllers. It is observed that the 2 and 4 h controller (Figures 13a,c) return a pulse feeding strategy that is scarcer in the beginning and is intensified as the culture evolves and enters growth phase. As mentioned previously, the generated profiles are in accordance with the system biologics, as nutrients are mostly required during the exponential phase. In addition, the cell density increases as a function of time (Figure 15), leading therefore to increased nutrient demand. A key difference in the two input profiles is that the 2 h controller decreases the frequency of the feeding toward the last hours of the culture. On the other hand, the 1 min strategy suggests a different input profile for the feeding that could be characterized semicontinuous. In particular, the controller (Figure 13b) starts introducing 0.3 mL of fresh medium that is gradually decreased throughout the culture time and reaches the value of 0.17 mL on the 168<sup>th</sup> hour. The continuous profile is interrupted by periodic pulses of approximately 1 mL at the points when samples are extracted from the bioreactor. The latter are most probably corrective actions taken by the controller as a response to the occurring disturbance (sampling), to maintain the culture volume within the permitted window. It should be underlined that all three strategies manage to maintain the culture volume within the predefined  $\pm 10\%$  window (Figure 14).



**Figure 9.** Data used for the model approximation of the upstream process model: (a) random pulse input strategy applied on the inlet flow rate (input), (b) periodic sampling strategy applied on the system (1 mL/6 h), (c) comparison between the process model (continuous grey line) and the linear state space model (dotted black line).



**Figure 10.** (a) Control input (inlet feed flow rate) as designed by the presented controller, (b) sampling strategy applied to both the batch and the fed-batch system, (c) evolution of culture volume for the fed-batch case, and (d) evolution of the culture volume for the batch case.

Comparing the output profiles (Figure 15), we observe that all controllers outperform the batch system, as expected. The 4 h strategy achieves significantly lower antibody concentration by the end of the culture, compared to the other two strategies that demonstrate a similar behavior in the output (Figure 15a). However, based on the profile of viable cells (Figure 15b), it could be concluded that the scarcer the strategy, the higher the culture longevity. More specifically, it is observed that although the 4 h strategy results in lower

cell density compared to the other fed-batch systems, it demonstrates a decreased death rate and therefore prolonged culture time.

Figure 16 illustrates the profiles of the 6 nutrients considered in this work, where the proposed strategies manage to maintain the levels of most of the amino acids and glucose above 0 and therefore guarantee that nutrients are available throughout the culture period. Comparing the amino acid profiles, it is evident that the cells utilize them in a

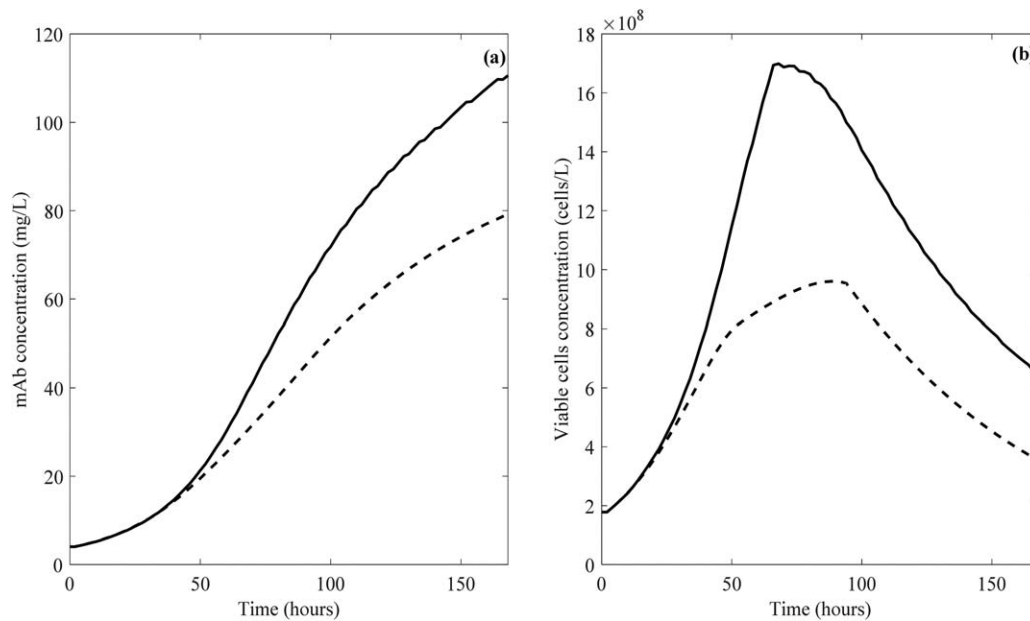


Figure 11. Comparison between the fed-batch (continuous black line) and the batch (dotted line) system for (a) the mAb concentration and (b) the population of viable cells over 168 h of culture.

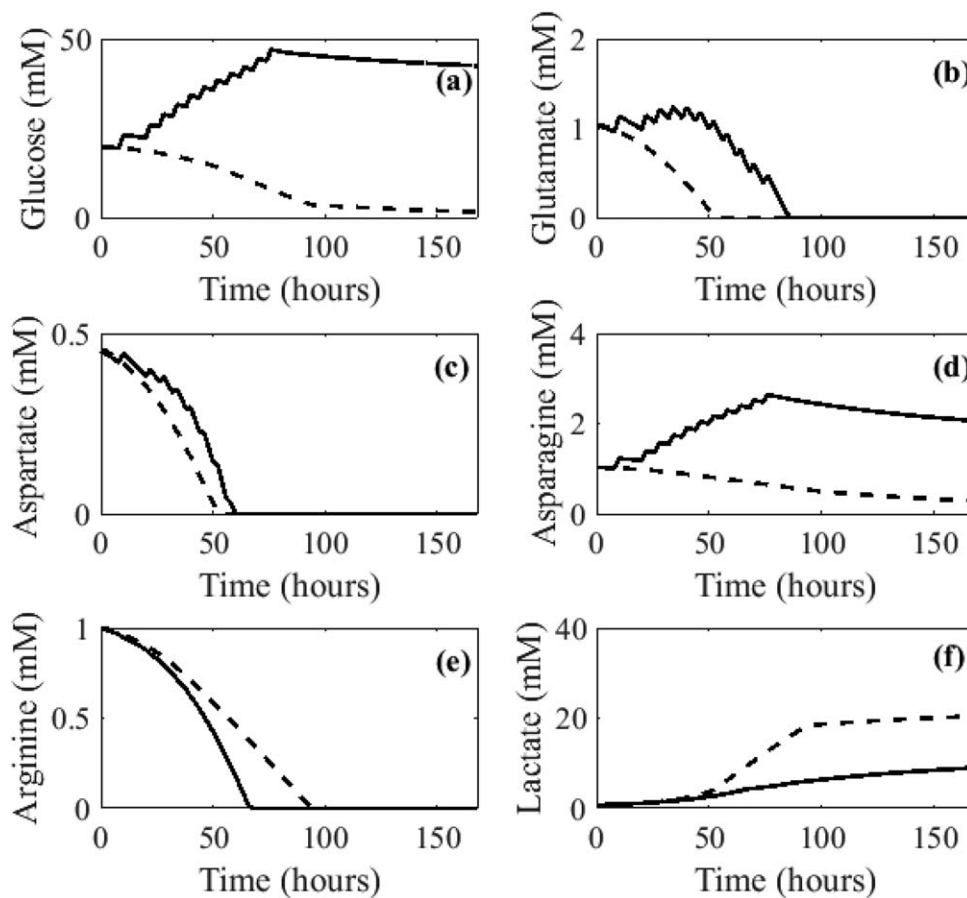


Figure 12. Comparison between the fed-batch (continuous black line) and the batch (dotted grey line) system for the concentrations of (a) glucose, (b) glutamate, (c) aspartate, (d) asparagine, (e) arginine, and (f) lactate over 168 h of culture.

preferential manner, rather than all at the same time and rate. According to the metabolic interactions considered here, the cell population utilizes different metabolic pathways based on the nutrient availability. Such profiles could therefore lead to the design of combined optimization and/or

control strategies where the optimal medium and composition for maximum productivity are defined.<sup>30</sup>

To evaluate the overall performance of the examined systems, we compare the total amount of antibody produced within the culture period (Figure 17). Therefore we can

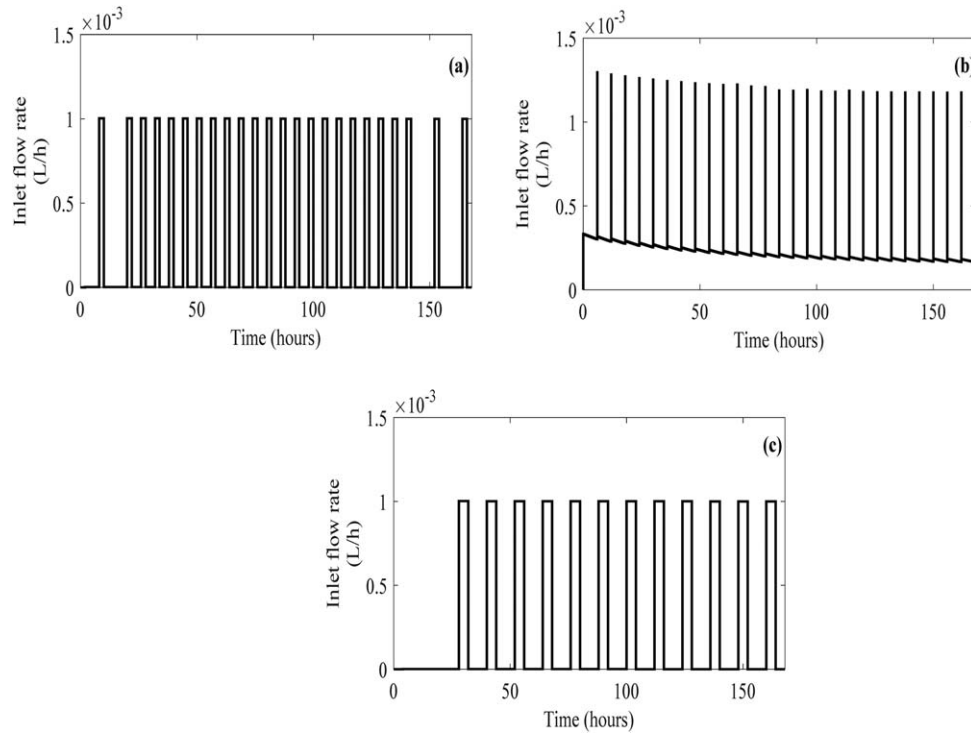


Figure 13. Input profile (feeding strategy) for the (a) 2 h, (b) 1 min, and (c) 4 h interval strategy.

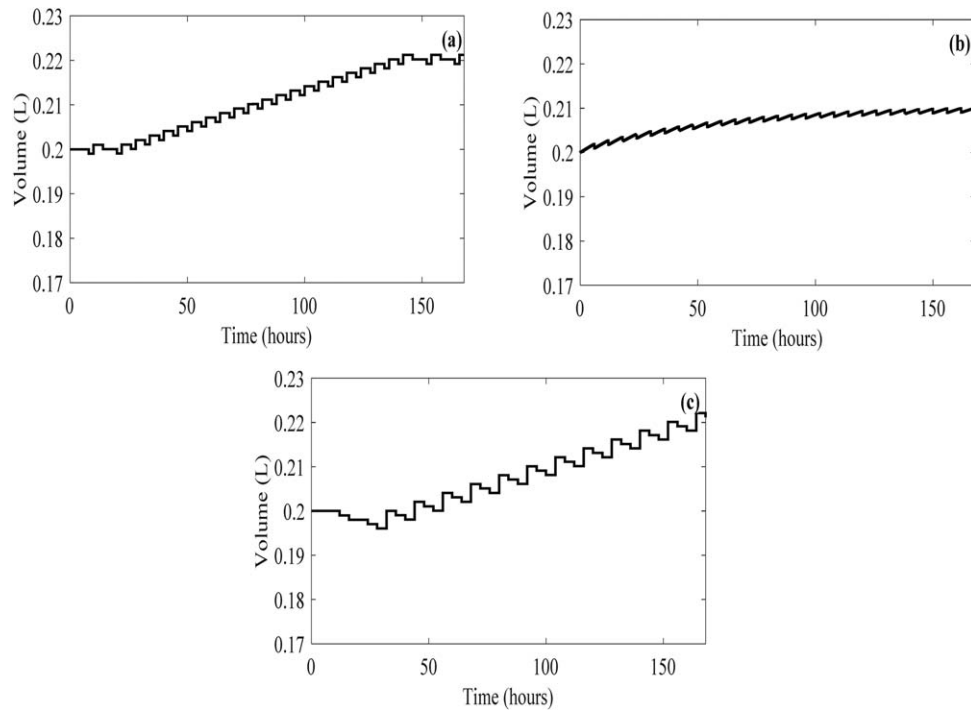
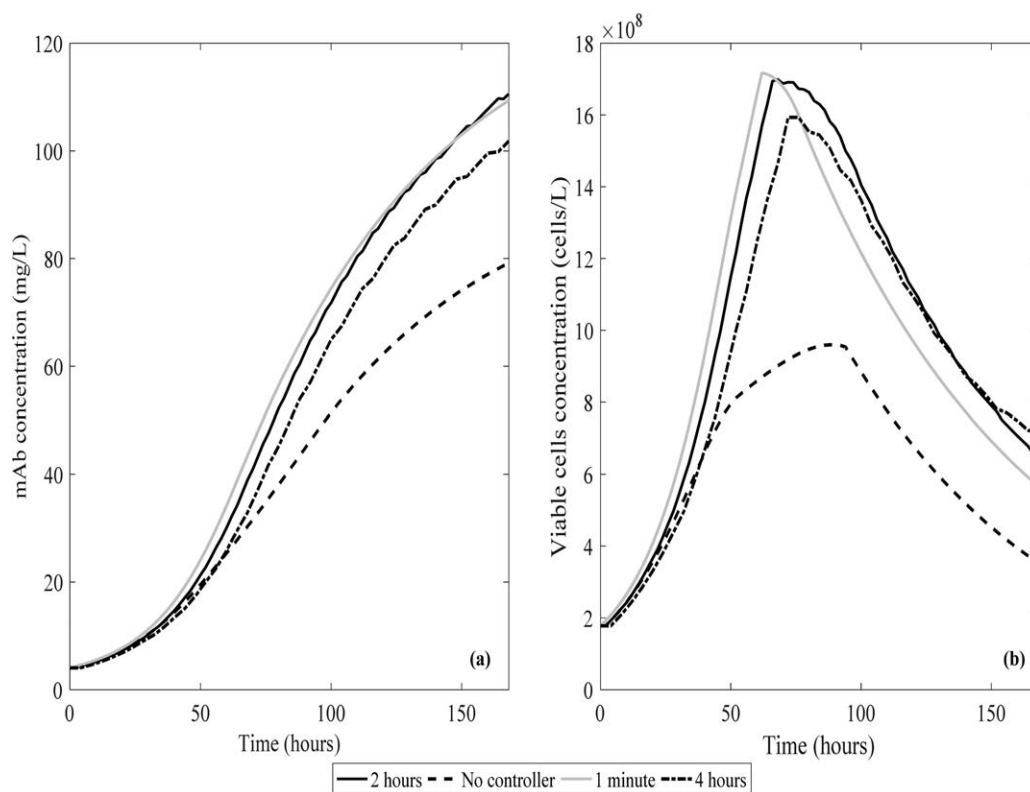


Figure 14. Culture volume during the simulation of the (a) 2 h, (b) 1 min, and (c) 4 h interval strategy.

assess the total amount of product produced, regardless of variations in the culture volume. It can be observed that although the maximum mAb concentration (mg/L) is reached following the feeding strategy designed by the dynamic optimization, the culture produces higher total amount of product (mg) under the 2 h and 1 min strategies. Interestingly, although the total amount of medium

administered in the 2 and 4 h strategy is the same and in fact significantly higher (49 mL) than the 1 min one (37 mL), the latter strategy manages to reach similar amounts of total product to the 2 h strategy (1965mg). Conversely, the 4 h strategy can be considered as less efficient (1860 mg). It could be therefore concluded that control strategies with higher feedback frequency and therefore



**Figure 15.** Comparison of the 2 h, 1 min, and 4 h interval and the batch system for (a) the mAb concentration and (b) the population of viable cells over 168 h of culture.

more frequent feeding can lead to more efficient culture operations. That could be attributed to the fact that semi-continuous operations, such as the 1 min strategy, introduce the feed in a gradual fashion, allowing the culture to adapt to changes and therefore minimize the risk of cell stress that might jeopardize the cell functions.

### Discussion

This work demonstrates the development of advanced computational tools that can facilitate the move from batch to continuous operation. Although regulatory authorities are supportive of this paradigm shift toward continuous manufacturing,<sup>38</sup> the adaptation of novel processing methodologies by the key industrial players is relatively slow. Concerns arising from the uncertain efficiency of new equipment as well as the overwhelming investment costs make the shift from batch to continuous operation a challenging process.<sup>16</sup> As pointed out by the FDA,<sup>38</sup> questions regarding the optimal sample frequency and on-line/in-line data management need to be answered prior to the development and adaptation of novel, continuous production lines. Moreover, issues regarding the integration of analytical tools and the uniformity in the control approach need to be addressed.<sup>50</sup> In order to be able to tackle the aforementioned challenges, a thorough investigation and understanding of the system is required. The latter necessitates the execution and comparison of various operating scenarios that will elucidate the process dynamics and the optimal design and/or operating conditions. In this direction, advanced computational tools can prove to be of high importance as they provide reduced-

cost testing platforms, where the results can be obtained rapidly.<sup>51,52</sup> The development of tractable mathematical models provides a solid basis to quantitatively study the characteristics of complex and multilevel interactions. Multiscale mathematical models combined with experimentally derived characterization will allow an early determination of the process bottlenecks at minimum experimental cost. These models can also be used for testing purposes of different operating scenarios and initial conditions, and for the design of advanced optimization strategies and control policies that will lead to optimal and stable operation. Here we focus on the development of powerful *in silico* tools for each process individually aiming to study in depth their dynamics. In particular, we consider a bioreactor (USP) and a chromatographic separation process (DSP) that are used in the production of mAbs. As presented earlier, the two systems are modeled based on first principles and their validated mathematical models are used as the basis for the development of advanced control strategies. The work presented here provides a valuable platform for *in silico* experimentation, where the developed tools can be used for the execution of reduced-cost simulations. Moreover, the models can be used for the development of advanced optimization policies that will determine the optimal operating conditions. In addition, the validated process models serve as a basis for the simulation of the respective system under extreme conditions. Here we study each process independently, considering the effect of USP on DSP through the use of disturbances in the control problem formulation. However, the complete bioprocess involves also intermediate separation steps (e.g., capture) that need to be also

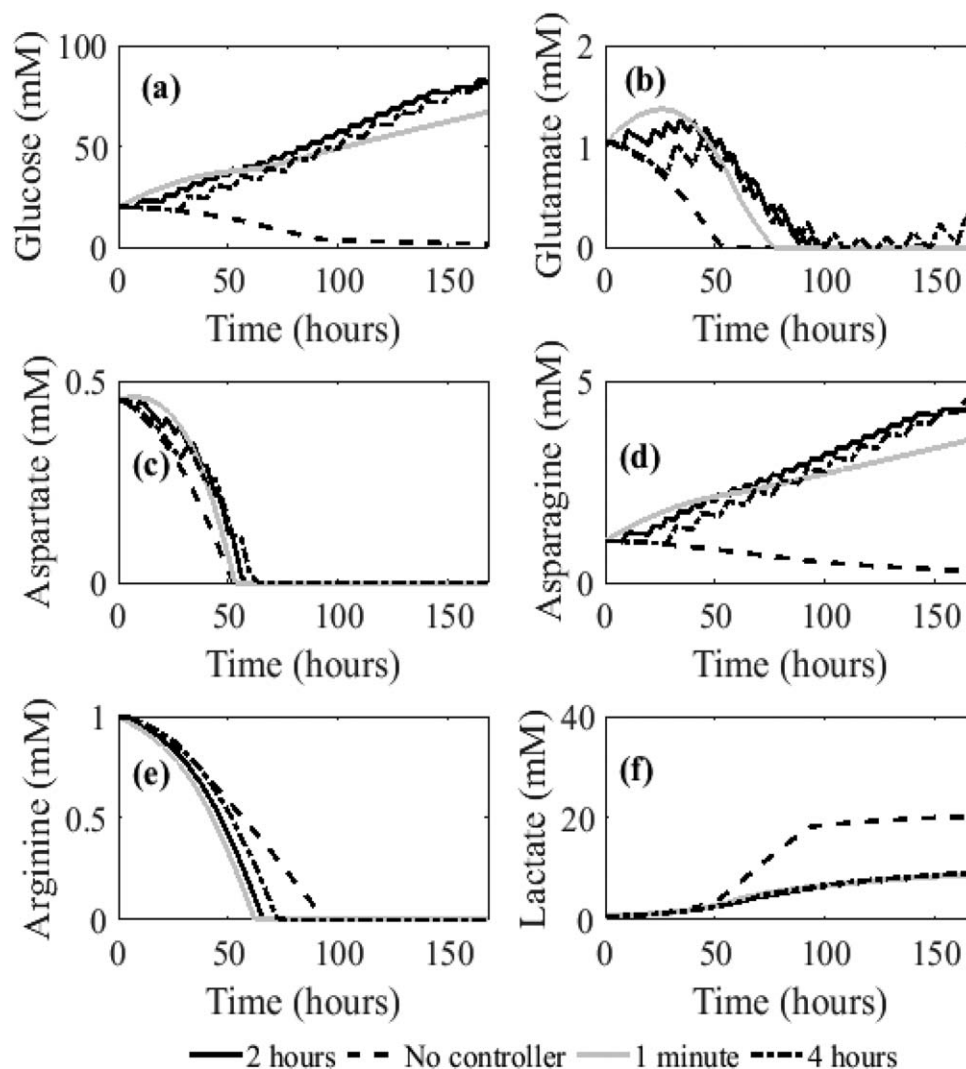


Figure 16. Comparison of the 2 h, 1 min, and 4 h interval and the batch system for the concentrations of (a) glucose, (b) glutamate, (c) aspartate, (d) asparagine, (e) arginine, and (f) lactate over 168 h of culture.

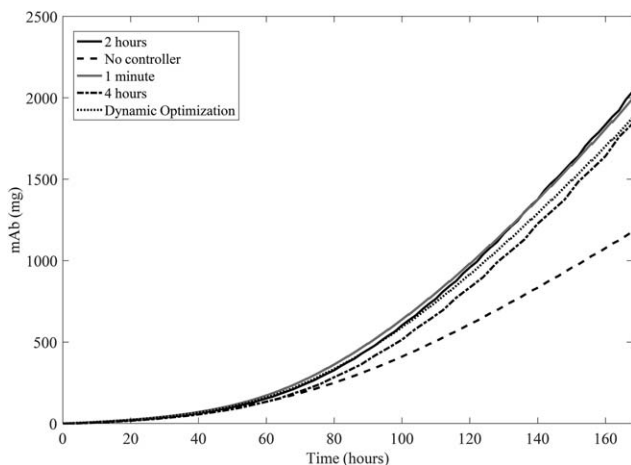


Figure 17. Accumulative amount of mAb produced during the culture period for the 2 h, 1 min, and 4 h interval and the batch system.

incorporated. Current and future research is focusing on the integration of all process model parts heading toward a dynamic, tool that will allow in silico experimentation of the entire process under continuous operation.

## Conclusions

In this work, we present an in silico approach toward the intensification of monoclonal antibody production through continuous operation. In particular, we demonstrate the application of computational tools for the simulation and control of a bioreactor and a purification process. Our main aim is to investigate the independent improvement of the upstream and downstream system to facilitate their integration. We consider a GS-NS0 cell culture system for the production of a monoclonal antibody (upstream) and the semicontinuous MCSGP chromatographic separation process (downstream) for the purification of the targeted product. In the proposed in silico approach, we aim to maximize the process productivity through the design of advanced control strategies that will maintain the process under optimal operating conditions. Therefore, we design two individual control schemes, applied on the two process units. First, a multiparametric controller for the maximization of the cell culture productivity is designed. The upstream controller considers a tight constraint on the culture volume, and a periodic sampling. It manages to efficiently increase the final product concentration under fed-batch feeding. Similarly, for the downstream, we design two identical controllers that operate on the two chromatographic columns under continuous

operation. The proposed control strategy manages to efficiently track the outlet concentrations of the mixture components, under periodic input (modifier concentration). Following our previously presented work,<sup>53</sup> we suggest tracking of the integral of the outlet concentrations of the mixture components to achieve continuous control laws that will facilitate continuous process monitoring. Additionally, aiming to overcome the challenge of unavailable measurements that very often arise in continuous operation, we robustify the proposed downstream controllers against variable feeding loads. This automatically enables the downstream controllers to operate independently from the composition of the upstream mixture, yet maintaining product purity and yield to the desired levels. The presented findings demonstrate how computational tools can facilitate the shift toward continuous operation, providing in silico experimentation that significantly minimizes labor cost and time, and the risk of infeasible and/or suboptimal process design, while it can ensure that the process operates under optimal conditions. This work investigates each process unit separately and therefore cannot guarantee an overall optimal performance. Consequently, further research is focusing on the in silico simulation of the integrated, continuous bioprocess by the incorporation of intermediate separation steps, such as capture chromatography. The latter along with the complete simulation of the MCSGP process will also allow further testing of the effect of the upstream performance on its downstream counterpart.

### Acknowledgments

MMP would like to thank Dr Richard Oberdieck for his contribution in the application of the setpoint shift strategy. Part of this work was performed in the framework of the OPTICO project (G.A. No 280813) for “Model-based Optimization and Control for Process-Intensification in Chemical and Biopharmaceutical Processes,” and MODLIFE (No 198280). Financial support from the Department of Chemical Engineering, Imperial College London and the Artie McFerrin Department of Chemical Engineering, Texas A&M University is also gratefully acknowledged. ME would like to acknowledge the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain) (FPI 2012 fellowship) for facilitating this collaboration within the EEBB 2015.

### Literature Cited

- Research, T. M. Monoclonal Antibodies Market - Global Industry Size, Share, Trends, Analysis and Forecast 2012–2018. <http://www.transparencymarketresearch.com/monoclonal-antibodies.html> (25/02),
- Kozlowski S, Woodcock J, Midthun K, Sherman RB. Developing the Nation's Biosimilars Program. *N Engl J Med.* 2011; 365:385–388.
- Blackstone EA, Fuhr JP. Innovation and competition: Will biosimilars succeed? The creation of an FDA approval pathway for biosimilars is complex and fraught with hazard. Yes, innovation and market competition are at stake. But so are efficacy and patient safety. *Biotechnol Healthcare.* 2012; 9:24–27.
- Xenopoulos A. A new, integrated, continuous purification process template for monoclonal antibodies: Process modeling and cost of goods studies. *J Biotechnol.* 2015; 213:42–53. (0),
- Walther J, Godawat R, Hwang C, Abe Y, Sinclair A, Konstantinov K. The business impact of an integrated continuous biomanufacturing platform for recombinant protein production. *J Biotechnol.* 2015; 213:3–12.
- Zydney AL. Continuous downstream processing for high value biological products: A Review. *Biotechnol Bioeng.* 2016; 113: 465–475.
- Steinebach F, Angarita M, Karst DJ, Müller-Späth T, Morbidelli M. Model based adaptive control of a continuous capture process for monoclonal antibodies production. *J Chromatogr A.* 2016; 1444:50–56.
- Gillespie R, Nguyen T, Macneil S, Jones L, Crampton S, Vunnum S. Cation exchange surface-mediated denaturation of an aglycosylated immunoglobulin (IgG1). *J Chromatogr A.* 2012; 1251:101–110.
- Gospodarek AM, Hiser DE, O'Connell JP, Fernandez EJ. Unfolding of a model protein on ion exchange and mixed mode chromatography surfaces. *J Chromatogr A.* 2014; 1355:238–252.
- Gronemeyer P, Ditz R, Strube J. Trends in upstream and downstream process development for antibody manufacturing. *Bioengineering* 2014; 1:188–212.
- Strube J, Grote F, Ditz R. Bioprocess design and production technology for the future. In: *Biopharmaceutical Production Technology.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2012; 657–705.
- Kelley B. In: *Industrialization of mAb Production Technology: The Bioprocessing Industry at a Crossroads, MAbs, 2009.* Taylor & Francis; 2009; 443–452.
- Chon JH, Zarbis-Papastoitis G. Advances in the production and downstream processing of antibodies. *N Biotechnol.* 2011; 28: 458–463.
- Dünnebier G, Engell S, Epping A, Hanisch F, Jupke A, Klatt KU, Schmidt -, Traub H. Model-based control of batch chromatography. *AIChE J.* 2001; 47:2493–2502.
- Godawat R, Konstantinov K, Rohani M, Warikoo V. End-to-end integrated fully continuous production of recombinant monoclonal antibodies. *J Biotechnol.* 2015; 213:13–19.
- Konstantinov KB, Cooney CL. White paper on continuous bioprocessing May 20–21, 2014 continuous manufacturing symposium. *J Pharm Sci.* 2015; 104:813–820.
- Pistikopoulos EN, Diangelakis NA, Oberdieck R, Papatheanasiou MM, Nascu I, Sun M. PAROC—An integrated framework and software platform for the optimisation and advanced model-based control of process systems. *Chem Eng Sci.* 2015; 136: 115–138.
- Kiparissides A, Koutinas M, Kontoravdi C, Mantalaris A, Pistikopoulos EN. “Closing the loop” in biological systems modeling—From the in silico to the in vitro. *Automatica* 2011; 47:1147–1155.
- P.S.E, gPROMS ModelBuilder (R). In *Process Systems Enterprise: 1997–2016.*
- Lambert RSC, Rivotti P, Pistikopoulos EN. A Monte-Carlo based model approximation technique for linear model predictive control of nonlinear systems. *Comput Chem Eng.* 2013; 54:60–67.
- Rivotti P, Lambert RSC, Pistikopoulos EN. Combined model approximation techniques and multiparametric programming for explicit nonlinear model predictive control. *Comput Chem Eng.* 2012; 42:277–287.
- Bozinis N, Kouramas KI, Pistikopoulos EN. MPC on a Chip. In 2011; Vol.2, 231–253.
- Dua P, Kouramas K, Dua V, Pistikopoulos EN. MPC on a chip—Recent advances on the application of multi-parametric model-based control. *Comput Chem Eng.* 2008; 32:754–765.
- Oberdieck R, Diangelakis NA, Papatheanasiou MM, Nascu I, Pistikopoulos EN. POP—Parametric optimization toolbox. *Ind Eng Chem Res.* 2016.
- Rao CV. Moving Horizon Strategies for the Constrained Monitoring and Control of Nonlinear Discrete-time Systems. Ph.D. Thesis, University of Wisconsin-Madison, 2000.
- Darby ML, Nikolaou M. A parametric programming approach to moving-horizon state estimation. *Automatica* 2007; 43:885–891.
- Voelker A, Kouramas K, Pistikopoulos EN. Simultaneous State Estimation and Model Predictive Control by Multi-Parametric Programming. In *ELSEVIER SCIENCE BV:* 2010; 607–612.
- Kiparissides A, Pistikopoulos EN, Mantalaris A. On the model-based optimization of secreting mammalian cell (GS-NS0) cultures. *Biotechnol Bioeng.* 2015; 112:536–548.

29. Papatthanasou MM, Quiroga-Campano AL, Oberdieck R, Mantalaris A, Pistikopoulos EN. Development of advanced computational tools for the intensification of monoclonal antibody production. In: Zdravko K, Miloš B, editors. *Computer Aided Chemical Engineering*. Elsevier; 2016; Vol. 38: 1659–1664.
30. Campano AQ, Papatthanasou MM, Pistikopoulos EN, Mantalaris A. A predictive model for energy metabolism and ATP balance in mammalian cells: Towards the energy-based optimization of mAb production. In: Zdravko K, Miloš B, editors. *Computer Aided Chemical Engineering*. Elsevier; 2016; Vol. 38: 1581–1586.
31. Xu P, Dai X-P, Graf E, Martel R, Russell R. Effects of glutamine and asparagine on recombinant antibody production using CHO-GS cell lines. *Biotechnol Prog.* 2014; 30:1457–1468.
32. Teixeira AP, Oliveira R, Alves PM, Carrondo MJT. Advances in on-line monitoring and control of mammalian cell cultures: Supporting the PAT initiative. *Biotechnol Adv.* 2009; 27:726–732.
33. Zhou W, Rehm J, Hu W-S. High viable cell concentration fed-batch cultures of hybridoma cells through on-line nutrient feeding. *Biotechnol Bioeng.* 1995; 46:579–587.
34. Ozturk SS, Thrift JC, Blackie JD, Naveh D. Real-time monitoring and control of glucose and lactate concentrations in a mammalian cell perfusion reactor. *Biotechnol Bioeng.* 1997; 53:372–378.
35. Craven S, Whelan J, Glennon B. Glucose concentration control of a fed-batch mammalian cell bioprocess using a nonlinear model predictive controller. *J Process Control.* 2014; 24:344–357.
36. Aehle M, Bork K, Schaepe S, Kuprijanov A, Horstkorte R, Simutis R, Lübbert A. Increasing batch-to-batch reproducibility of CHO-cell cultures using a model predictive control approach. *Cytotechnology* 2012; 64:623–634.
37. Jenzsch M, Gnoth S, Beck M, Kleinschmidt M, Simutis R, Lübbert A. Open-loop control of the biomass concentration within the growth phase of recombinant protein production processes. *J Biotechnol.* 2006; 127:84–94.
38. Chatterjee S. FDA Perspective on Continuous Manufacturing. In 2012.
39. Aumann L, Morbidelli M. A continuous multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP) process. *Biotechnol Bioeng.* 2007; 98:1043–1055.
40. Krättli M, Steinebach F, Morbidelli M. Online control of the twin-column countercurrent solvent gradient process for biochromatography. *J Chromatogr A.* 2013; 1293:51–59.
41. Krättli M, Ströhlein G, Aumann L, Muller-Spath T, Morbidelli M. Closed loop control of the multi-column solvent gradient purification process. *J Chromatogr A.* 2011; 1218:9028–9036.
42. Pistikopoulos EN, Diangelakis NA. Towards the integration of process design, control and scheduling: Are we getting closer?. *Comput Chem Eng.* 2016; 91:85–92.
43. Pistikopoulos EN. Perspectives in multiparametric programming and explicit model predictive control. *AIChE J.* 2009; 55:1918–1925.
44. Kouramas KI, Panos C, Faísca NP, Pistikopoulos EN. An algorithm for robust explicit/multi-parametric model predictive control. *Automatica* 2013; 49:381–389.
45. Olofsson P, Ma X. Modeling and estimating bacterial lag phase. *Math Biosci.* 2011; 234:127–131.
46. Xie L, Wang DIC. Applications of improved stoichiometric model in medium design and fed-batch cultivation of animal cells in bioreactor. *Cytotechnology* 1994; 15:17–29.
47. Cruz HJ, Freitas CM, Alves PM, Moreira JL, Carrondo MJT. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme Microb Technol.* 2000; 27:43–52.
48. Spens E, Häggström L. Defined protein and animal component-free NS0 fed-batch culture. *Biotechnol Bioeng.* 2007; 98:1183–1194.
49. Majors BS, Betenbaugh MJ, Chiang GG. Links between metabolism and apoptosis in mammalian cells: Applications for anti-apoptosis engineering. *Metab Eng.* 2007; 9:317–326.
50. Ierapetritou M, Muzzio F, Reklaitis G. Perspectives on the continuous manufacturing of powder-based pharmaceutical processes. *AIChE J.* 2016; 62:1846–1862.
51. Klatt K-U, Marquardt W. Perspectives for process systems engineering—Personal views from academia and industry. *Comput Chem Eng.* 2009; 33:536–550.
52. Gernaey KV, Cervera-Padrell AE, Woodley JM. A perspective on PSE in pharmaceutical process development and innovation. *Comput Chem Eng.* 2012; 42:15–29.
53. Papatthanasou MM, Avraamidou S, Oberdieck R, Mantalaris A, Steinebach F, Morbidelli M, Mueller-Spaeth T, Pistikopoulos EN. Advanced control strategies for the multicolumn countercurrent solvent gradient purification process. *AIChE J.* 2016; 62: 2341–2357.
54. Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem.* 1979; 254:2669–2676.
55. Fitzpatrick L, Jenkins HA, Butler M. Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture. *Appl Biochem Biotechnol.* 1993; 43:93–116.
56. Altamirano C, Illanes A, Casablanca A, Gámez X, Cairó JJ, Godia C. Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture. *Biotechnol Prog.* 2001; 17:1032–1041.
57. Gu X, Harmon BJ, Wang DIC. Site- and branch-specific sialylation of recombinant human interferon- $\gamma$  in Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 1997; 55:390–398.
58. Mukherjee S, Chiu R, Leung S-M, Shields D. Fragmentation of the Golgi apparatus: An early apoptotic event independent of the cytoskeleton. *Traffic* 2007; 8:369–378.
59. Hills AE, Patel A, Boyd P, James DC. Metabolic control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation in GS-NS0 cells. *Biotechnol Bioeng.* 2001; 75:239–251.
60. Al-Rubeai M, Emery AN. Mechanisms and kinetics of monoclonal antibody synthesis and secretion in synchronous and asynchronous hybridoma cell cultures. *J Biotechnol.* 1990; 16:67–85.
61. Li GY, Wang SW, Rabitz H. Practical approaches to construct RS-HDMR component functions. *J Phys Chem A.* 2002; 106: 8721–8733.
62. Müller-Spätth T, Aumann L, Melter L, Ströhlein G, Morbidelli M. Chromatographic separation of three monoclonal antibody variants using multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP). *Biotechnol Bioeng.* 2008; 100:1166–1177.
63. Müller-Spätth T, Aumann L, Ströhlein G, Kornmann H, Valax P, Delegrange L, Charbaut E, Baer G, Lamproye A, Jöhneck M, Schulte M, Morbidelli M. Two step capture and purification of IgG2 using multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP). *Biotechnol Bioeng.* 2010; 107:974–984.
64. Guiochon G, Golshan-Shirazi S, Katti A. *Fundamentals of Non-linear and Preparative Chromatography*. Boston: Academic Press; 1994.
65. Grossmann C, Ströhlein G, Morari M, Morbidelli M. Optimizing model predictive control of the chromatographic multi-column solvent gradient purification (MCSGP) process. *J Process Control.* 2010; 20:618–629.

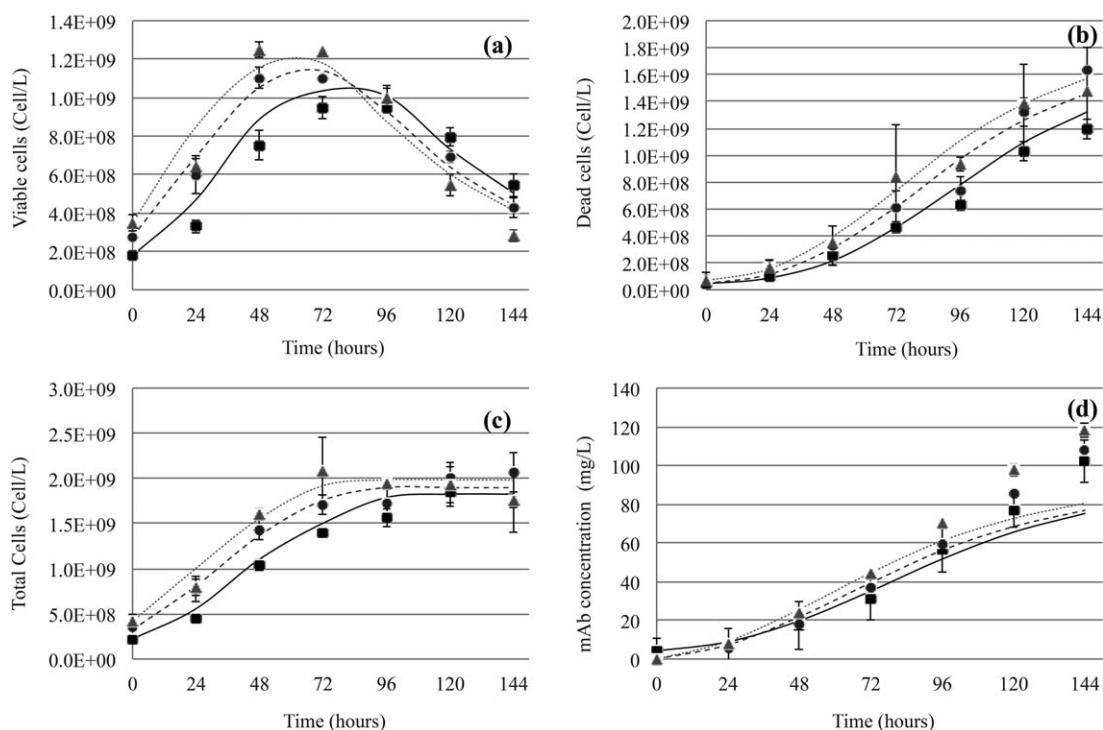
## Appendix A

The system presented in “Upstream: GS-NS0 Cell Culture System” is described by an Ordinary and Differential Equation (ODE) model that features the main metabolic interactions and pathways. Following the framework presented by Kiparissides et al.,<sup>18</sup> the first step is the construction of the equation set, followed by global sensitivity analysis (GSA), parameter estimation (PE), and experimental validation. Here we present how these steps are applied for the development of a dynamic model, describing a GS-NS0 cell culture system.

## Materials and Methods

The model is validated against a series of experimental data, the methodology for which is described below. The experiments designed below are performed using the same conditions presented by Kiparissides to allow a direct comparison of the model validity.





**Figure A.1. Model validation: comparison of 3 different simulation results (points) and 3 different experimental data sets (grey, black, and dotted lines) for: populations of (a) viable, (b) dead, and (c) total cells and (d) the concentrations of mAb.**

### Cell line and culture conditions

GS-NS0 mouse myeloma cells were cultured in triplicate 1 L Erlenmeyer flasks (Corning) with 200 mL working volume, agitated at 130 rpm, incubated at 37°C, and 5% CO<sub>2</sub>. The media contained Advanced-DMEM X1 (Invitrogen Ltd.), MEM non-essential amino acids (Sigma–Aldrich) X2, MEM-essential amino acids (Sigma –Aldrich) X2, GS-Supplement (Sigma-Aldrich) X1, MEM-Vitamins (Gibco) X1, Penicillin/Streptomycin (Gibco) X1, 5 mg/L MSX (Sigma-Aldrich), and 10% dialyzed fetal bovine serum (Gibco). The monoclonal antibody produced by the cell is a chimeric IgG4 antibody, cB72.3, which recognizes the Tag-72 tumor marker in colorectal cancer.

### Feeding medium composition

A concentrated medium comprising GS-Supplement (SAFC Biosciences, Sigma-Aldrich, UK)  $\times 40$  and 0.4 M glucose was considered as fed-batch concentrated medium for the development of the optimization and control strategies.

### Detection of viable and dead cells

The number of cells in different states was determined by flow cytometry using Guava ViaCount<sup>®</sup> assay (Merck Millipore). Every 24 h, 50  $\mu$ L of the culture was extracted and subsequently incubated with 450  $\mu$ L of ViaCount<sup>®</sup>, for 5 min at room temperature. The data were acquired using a bench-top flow cytometer, Guava EasyCyte<sup>™</sup> (Merck Millipore), and processed using GuavaSoft software (V 2.6).

### Glucose and toxic metabolites analysis

Extracellular glucose and lactate concentrations were measured using Nova BioProfile 400 analyzer. Seven hundred microliter samples were collected from each flask on 24 h intervals and centrifuged at 800 rpm for 5 mins.

### Amino acids analysis

High-pressure liquid chromatography (HPLC) assay was used to determine the concentration of amino acids in samples collected every 24 h. The samples were centrifuged for 5 mins at 800 rpm; the supernatant was filtrated through a 10 kDa cutoff ultrafiltration membrane at 22,000 rpm, 4°C for 1 h and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  prior to analysis. Amino acid analysis was performed with Agilent 1260 Infinity Quaternary LC, equipped with RRLC in-line filter, 4.6 mm, 0.2  $\mu$ m; and ZORBAX Eclipse Plus C18 LC, 4.6 mm, 100 mm, and 1.8  $\mu$ m column (Agilent Technologies).

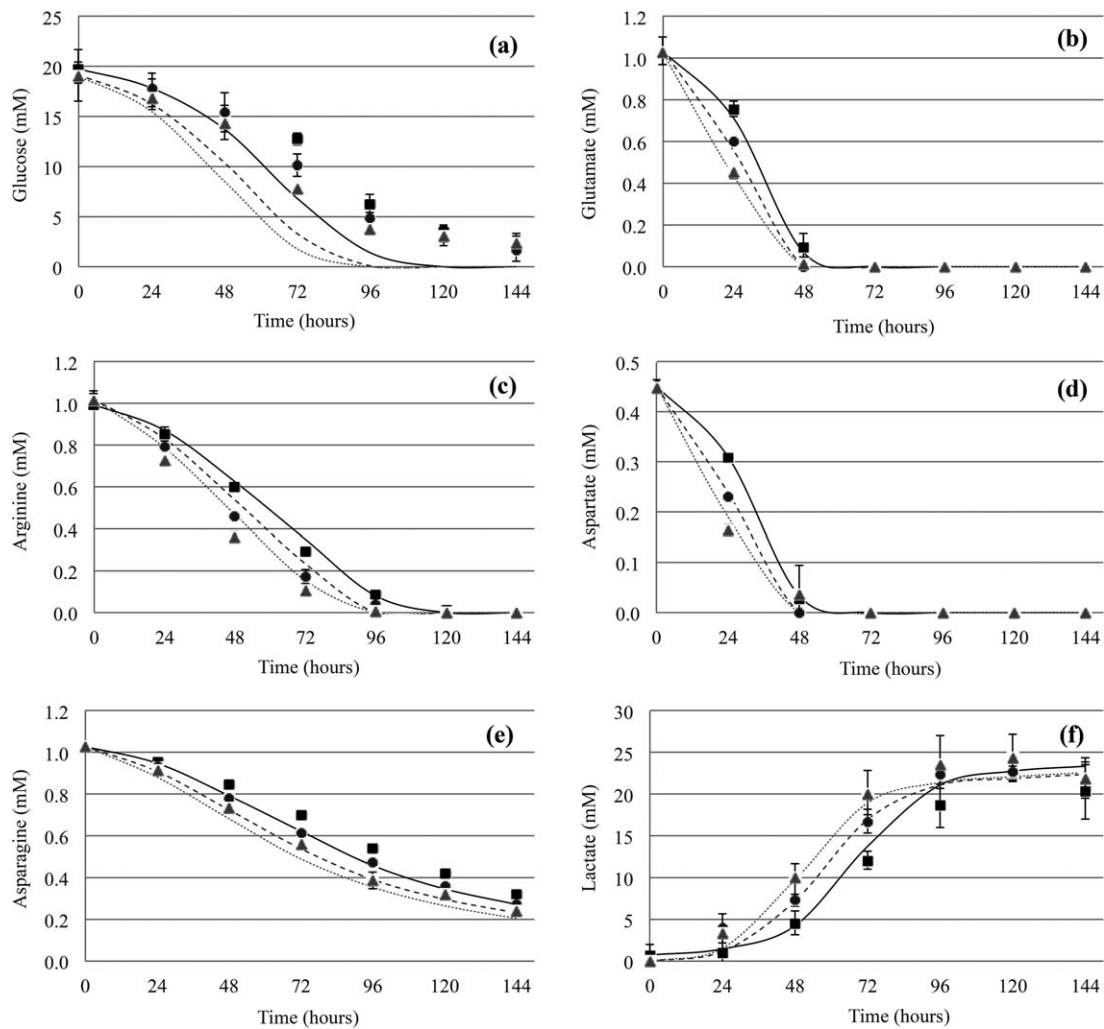
### Monoclonal antibody production

The product was measured using HPLC techniques. The samples were centrifuged for 5 min at 800 rpm, the supernatants were filtrated through 0.2  $\mu$ m filter and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  prior to analysis. The mAb assay was performed with Agilent 1260 Infinity Quaternary LC, equipped with RRLC in-line filter, 4.6 mm, 0.2  $\mu$ m; and Bio-Monolith Protein A, 4.95  $\times$  5.2 mm column (Agilent Technologies Ltd).

### Model Development and Validation

The proposed model describes a simplified metabolic network of GS-NS0 cells, based on four key nutrients and glucose. The model equations and the interactions considered in this work are described below.

Cell growth depends on the availability of a wide variety of nutrients, in particular, carbohydrates and amino acids. Glucose is the most predominant carbohydrate consumed by mammalian cells and it follows different metabolic pathways: (1) the pentose phosphate pathway (PPP) to produce DNA precursors, (2) the anaerobic pathway or glycolysis to produce energy, and (3) the aerobic pathway where glucose is completely oxidized through the tricarboxylic acid (TCA) cycle that also incorporates amino acids to produce energy. Amino acids are considered as the



**Figure A.2. Model validation: comparison of 3 different simulation results (points) and 3 different experimental data sets (grey, black, and dotted lines) for the concentrations of (a) glucose, (b) glutamate, (c) arginine, (d) aspartate, (e) asparagine, and (f) lactate.**

building blocks for the production monoclonal antibodies and proteins that correspond to 70% of cell composition. In the case of GS-NS0 cells, glutamate is considered as the main source of glutamine used for biosynthesis of cellular structures and product. However, it has been reported that glutamate is used not only as a biosynthesis precursor but also as one of the main energy sources in mammalian cells, contributing more than 50% of the produced ATP.<sup>54–56</sup> Cells require glutamate also for glutamine production, proliferation, mAb assembly, and energy production.

The suggested model assumes that arginine and asparagine are used to supply glutamate and aspartate, respectively, and for cell proliferation and survival. Cell growth rate depends on the availability of nutrients in the culture. Namely, the depletion of glutamate and/or aspartate leads to decrease in the growth rate, while cell growth is diminished with the exhaustion of either glutamate/arginine or aspartate/asparagine (Equation E.4). In addition, cell starvation (exhaustion of nutrients) produces cellular stress and activates apoptosis pathways and subsequently cell death. The independent effect of each nutrient has been depicted as an additive effect (Equation E.5).

The specific glucose consumption for biomass production ( $Q_{x,glc}$ ) is described by biomass yield from glucose ( $Y_{x,glc}$ ), that is modeled as a function of the growth rate ( $\mu$ ) and considers the consumption of glucose for biosynthesis of multiple structural components of the cell, including nonessential amino acids, lipids, nucleotides, and DNA. Furthermore,  $Q_{glyc,glc}$  corresponds

to the specific consumption of glucose per cell for the production of energy through glycolysis, while  $Q_{MET}$  depicts the effect of glutamate concentration in glucose uptake for the production of energy through glycolysis.<sup>28</sup> The specific consumption of glucose per cell to produce energy through TCA cycle is described by  $Q_{tca,glc}$ . Moreover, the specific consumption of amino acids is linked to both biomass ( $Q_{x,glu}$ ) and energy ( $Q_{tca,asp}$ ) production. The balance for the mAb is described by a non-growth-associated/maintenance term that ( $m_{mAb,xv}$ ) that describes the constant production of mAb by viable cells.

The model monitors viable and dead cell concentrations, and therefore, the viability of the culture can be predicted. The latter is of high importance as viable cells are the ones secreting the complete and active product. During the growth phase, the lysis is reduced and consequently the concentration of impurities related to culture debris is significantly lower. Under death phase, culture viability is reduced and glycosylation is incomplete<sup>57</sup> and therefore cells release an incomplete product,<sup>58</sup> leading to an increase in the accumulation of impurities. Another important factor is the release of proteases during the death phase, which could damage the product structure.<sup>59</sup> Therefore, it is of vital importance to be able to predict the optimal point where the culture needs to be terminated as low viability can lead both to increased levels of impurities but also products of poor quality. The model consists of 21 differential and algebraic equations, 24 variables and 27 parameters. The model is simulated in

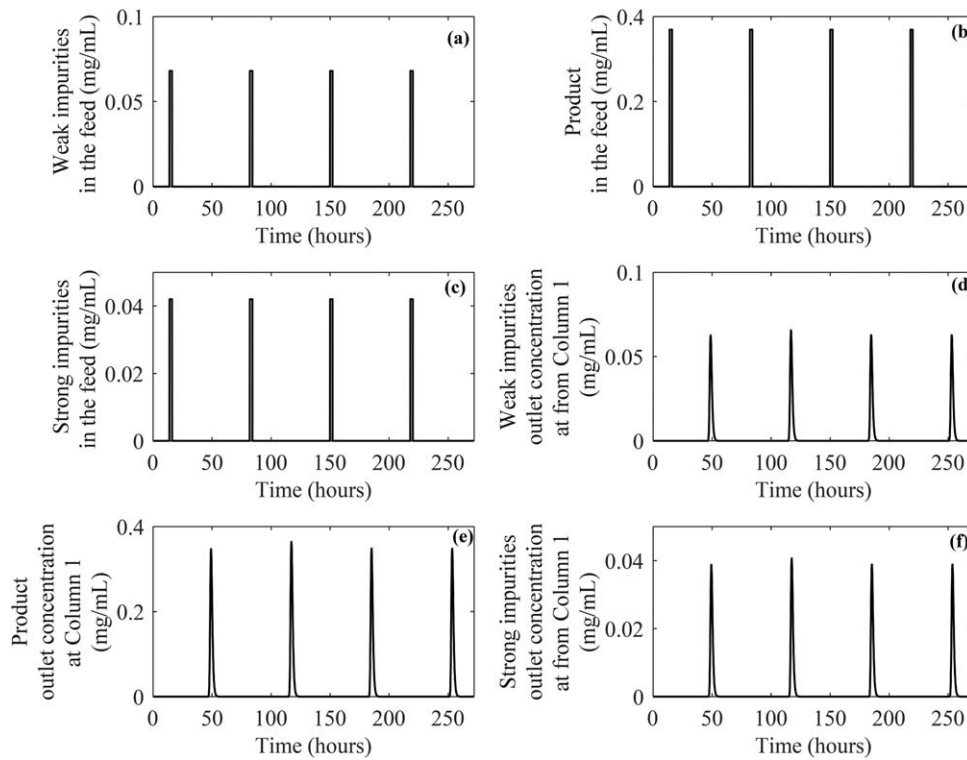


Figure A.3. Disturbance profile as considered in this for work for Controller 1: concentrations of (a) weak impurities, (b) product, and (c) strong impurities present in the feed; and Controller 2: concentrations of (d) weak impurities, (e) product, and (f) strong impurities recycled from Column 1 to Column 2.

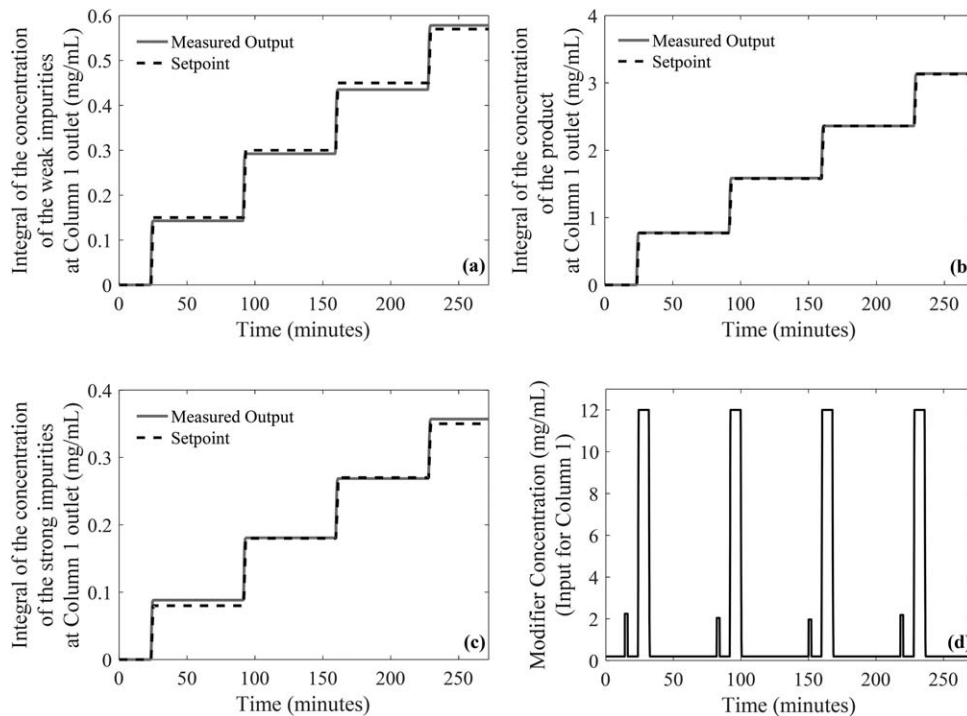
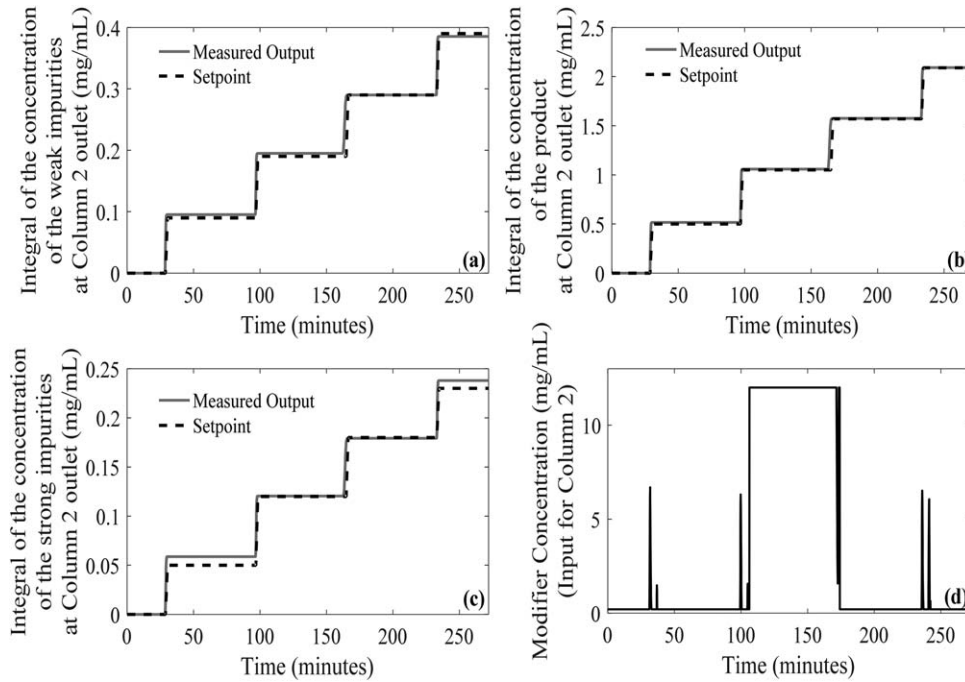


Figure A.4. Closed-loop validation results for the Controller A: comparison of the predefined setpoint (—) [using the setpoint shift strategy] and the output of the process model simulation (---) as resulted from the controller closed-loop validation for (a) weak impurities, (b) product, and (c) strong impurities over time [under the disturbance and input profile illustrated in Figure 12] and (d) the proposed input strategy (modifier concentration).

gPROMS ModelBuilder® v4.2.0. Following the framework presented by Kiparissides et al.,<sup>18</sup> the model is subjected to sensitivity analysis for the identification of the significant parameter set.

#### Viable and dead cell concentration

It is observed (Figure A.1a) that the suggested model efficiently captures the culture entry to exponential phase (post 24<sup>th</sup> hour)



**Figure A.5.** Closed-loop validation results for the Controller B: comparison of the predefined setpoint (—) [using the setpoint shift strategy] and the output of the process model simulation (—) as resulted from the controller closed-loop validation for (a) weak impurities, (b) product, and (c) strong impurities over time [under the disturbance and input profile illustrated in Figure 12] and (d) the proposed input strategy (modifier concentration).

**Table A.1. Results of the GSA Procedure and the Final Parameter Values**

Parameter	Value	Units	Parameter	Value	Units
$\mu_{max}^*$	0.0229552	$h^{-1}$	$Y_{x,glc}$	1.00E+09	Cell/mmol
$K_{met}$	0.09	mM	$Y_{glyc,glc}$	9.00E+07	Cell/mmol
$K_{glc}$	3.5	mM	$M_{glyc,glc}$	2.00E-11	mmol/Cell h
$K_{glu}^*$	0.5	mM	$Y_{tca,glc}$	3.00E+08	Cell/mmol
$K_{asp}^*$	0.465278	mM	$M_{tca,glc}$	2.00E-11	mmol/Cell h
$K_{arg}$	0.001	mM	$Y_{x,glu}$	9.25E+09	Cell/mmol
$K_{asn}$	0.001	mM	$Y_{tca,glu}$	4.00E+09	Cell/mmol
$\mu_{d,max}^*$	0.0033736	$h^{-1}$	$M_{tca,glu}^*$	2.54E-11	mmol/Cell h
$K_{lim,glc}$	3.5	mM	$C_{asp}$	0.6	-
$K_{lim,glu}$	0.5	mM	$C_{asn}$	0.2	-
$K_{lim,asp}$	0.5	mM	$C_{arg}^*$	0.33818	-
$K_{lim,arg}$	0.5	mM	$m_{mab,x}^*$	6.59E-10	mg/Cell h
$K_{lim,asn}$	0.5	mM			

\*Significant parameters that are re-estimated using experimental data.

**Table A.2. Key Features of the Designed State Space Model**

	Column 1	Column 2
Input	Modifier concentration	Modifier concentration
Output	Integrals of the outlet concentrations of W, P, and S	Integrals of the outlet concentrations of W, P, and S
Disturbance	Feed composition (Figure 3a–c)	Component concentrations recycled from Column 1 (Figure 3d–f)
Number of states	4	4
Sampling time ( $T_s$ )	6 s	6 s

The latter holds the same formulation for both columns, considering different outputs and disturbances based on the column position.

after a short lag period. In addition, the peak in the viable cell concentration is also predicted as the results from the model simulation fall within the range of the reported experimental error. The population of dead cells is also accurately described by the process model (Figure A.1).

### Monoclonal antibody concentration

In the case of the mAb concentration, a quite good agreement between the model simulation and the experimental data is

observed (Figure A.1d). However, a significant discrepancy is observed from 120 to 144 h, where the model under predicts antibody concentration and the predicted value does not lie within the experimental error. At the end of the culture, when the growth is inhibited, and the death process is more prominent, the unspecific release of product increase and this phenomenon is not described in the model equations. It has been documented that apoptosis triggers the Golgi apparatus fragmentation<sup>58</sup> and there is a passive release of the product in the culture medium,<sup>60</sup> to capture this phenomenon, it should be

**Table A.3. Tuning Parameters Used for the Formulation of the mp-MPC Problem for the Downstream Process**

Tuning Parameter	Explanation	Value	Tuning Parameter	Explanation	Value
QR	Weights on the outputs	[1E2 1E4 1E2]	$U_{\min}$	Input upper bound	0.2
Q	Weights on the states	1I	$U_{\max}$	Input lower bound	12
R	Weights for the inputs	1	$D_{\min}$	Disturbance upper bound	[0 0 0]
P	Terminal weight for the states	Riccati equation	$D_{\max}$	Disturbance lower bound	[10 10 10]

**Table A.4. Equations for the Calculation of Purity and Yield Over a Process Cycle, where  $C_{\text{Weak, average}}$ ,  $C_{\text{Product, average}}$ ,  $C_{\text{Strong, average}}$  Correspond to the Average Concentrations of Weak Impurities, Product, and Strong Impurities and  $C_{\text{feed, average}}$  to the Average Feed Concentration Over a Process Cycle**

Product	$C_{\text{Product, average}}$	(Equation 3)
purity	$\frac{C_{\text{Product, average}}}{C_{\text{Weak, average}} + C_{\text{Product, average}} + C_{\text{Strong, average}}}$	(Equation 4)
Yield	$\frac{C_{\text{Product, average}}}{C_{\text{feed, average}}}$	(Equation 4)

included a term that accounts for mAb release during dead phase.

### Glucose uptake and lactate production

Although the initial decrease in the glucose concentration (Figure A.2a) is efficiently captured, the model does not manage to describe the experimentally defined plateau reached after the 96<sup>th</sup> hour. On the other hand, lactate production is adequately described.

### Glutamate, arginine, asparagine, and aspartate uptake

The model captures efficiently the depletion of both glutamate and aspartate at the 48<sup>th</sup> hour of the culture (Figures A.2b,e). Similarly, the profiles of asparagine and arginine are also characterized by good agreement between the simulation results and the experimental data.

Overall, it can be concluded that the presented model provides a satisfactory representation of the examined system and be used for further prediction and analysis. Subsequently, GSA and PE are applied for the identification and estimation of the significant model parameters.

### Global sensitivity analysis (GSA) and parameter estimation (PE)

GSA is the mathematical procedure according to which the model parameters are simultaneously excited, within the range of interest, and their effect on the model outputs is monitored. Such procedures enable the examination of the global parameter space, cope well with nonlinearities, providing a complete set of results that demonstrates both the sensitivity of the model to the uncertainty of the parameter values and the effect of one model parameter to the other.<sup>18,61</sup> Here we apply RS-HDMR for the analysis of 27 parameters on the 10 differential model variables. Data are collected for the entire culture period (168 h) using a sampling time of 2 h and a parameter variation of  $\pm 50\%$ . The GSA results indicate 6 significant parameters (Table A.1) that are re-estimated using data obtained from tailor-made experiments. PE is performed within gPROMS<sup>®</sup> ModelBuilder.

### Design of the 1 min and 4 h control strategies

The linear state space models for the 1 min and 4 h cases are derived directly from the linear model designed in the previously. The system behavior and the interactions between the input (feed flow rate), the disturbance (sampling), and the outputs (culture volume and mAb concentration) remain the same. The matrices representing the mathematical relationships of the

latter are illustrated in the equations sets below (Equations A. 1 and A.2, respectively) and are constructed based on the respective discretization/sampling times (1 min and 4 h, respectively). The fitting of the linear representation to the process model remains the same as well.

$$A = \begin{bmatrix} 0.9955 & -0.0004266 & 0.0004173 & 0 \\ 5.614e-05 & 0.9999 & 1.418e-05 & 0 \\ -0.0169 & -0.001404 & 1.001 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

$$B = \begin{bmatrix} 167.2 \\ -11.47 \\ 717 \\ 60 \end{bmatrix}$$

$$C = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ -1 \end{bmatrix}$$

$$D = \begin{bmatrix} 51.69 & -90.72 & -13.25 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Equation A.1 matrices of the linear state space model of the upstream system with 1 min sampling time.

$$A = \begin{bmatrix} 0.2259 & -0.07035 & 0.06928 & 0 \\ 0.002188 & 0.9732 & 0.004274 & 0 \\ -2.813 & -0.2104 & 1.197 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

$$B = \begin{bmatrix} 2.965e+4 \\ -2261 \\ 1.288e+05 \\ 1.44e+04 \end{bmatrix}$$

$$C = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ -1906 \end{bmatrix}$$

$$D = \begin{bmatrix} 51.69 & -90.72 & -13.25 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Equation A.2 matrices of the linear state space model of the upstream system with 4 h sampling time.

### Development of the downstream control scheme

*The Process Model.* The mathematical model describing MCSGP is a partial differential equation (PDE) model.<sup>53</sup> The

PDE set contains (1) the governing equations of chromatography and (2) the mass balances around the columns, depending on the system configuration. For more information on the model the reader is referred to Müller-Spáth et al.<sup>62</sup> and Papathanasiou et al.<sup>53</sup> The mathematical model has been used and validated for a variety of separation cases.<sup>39,62,63</sup> In this work, the model is simulated in gPROMS<sup>®</sup> ModelBuilder v4.2.0.

**Control Scheme.** The twin-column MCSGP is characterized by two operating modes: (1) the batch and (2) the interconnected mode. During batch phases, the two columns operate independently and the system can be resembled to two single-column configurations (batch phase). It should be noted that the two systems are identical to each other as the columns are characterized by the same technical and physicochemical characteristics. In our previous work,<sup>53</sup> we demonstrated the application of PAROC for the design of advanced control strategies for the batch mode of MCSGP. Here, we are presenting the development of control strategies for the continuous operation. In continuous operation (interconnected mode, I-phases) the impure mixture fractions are recycled from Column 1 to Column 2 (interconnected phase), making therefore the performance of Column 2 dependent on the operation of Column 1. In addition, based on the original process, additional modifier is added at the node before Column 2 and is mixed with the impure fraction exiting column 1. Therefore, in this case, Controller B is responsible of (i) rejecting disturbances caused from the variation in the composition of the outlet stream of Column 1 and (ii) administrating the amount of modifier required to achieve the desired elution

Papathanasiou, Avraamidou, Oberdieck, Mantalaris, Steinebach, Morbidelli, Mueller-Spaeth, and Pistikopoulos<sup>53</sup> presented that the modifier concentration is the most significant input with respect to the eluted component quantity, while the flow rate does not seem to affect the amount of the eluted components. According to the basic chromatographic principles,<sup>64</sup> the modifier concentration affects the liquid–solid equilibrium in a highly nonlinear fashion and consequently the accumulation and/or elution of the components at the end of each process cycle. On the other hand, the flow rate affects the speed of the elution (i.e., the process kinetics) but not the thermodynamics of the chromatographic system. In addition, it was demonstrated<sup>53</sup> how tracking of the integral concentrations of the mixture components can lead to continuous control and process monitoring. Therefore, based on previous findings here we design a control strategy for the two-column configuration. For the design of Controller A, we consider (1) the modifier concentration as the sole control input, (2) the upstream mixture as measured disturbance, and (3) the integrals of the three outlet concentrations of the mixture components (W, P, S) recycled to Column 2 as outputs. Similarly, Controller B accounts for the disturbance resulting from Column 1 (outlet concentrations of the mixture components), tracking the integrals of the three outlet concentrations (W, P, S) and using the modifier concentration as the manipulated variable. It should be highlighted that given the identical technical and physicochemical characteristics of the two columns, we propose the formulation and solution of one control problem and, therefore, the design of one mp-controller that will be applied on both columns.

**Model Approximation.** The process model<sup>53,62</sup> comprises large sets of complex PDEs and needs to be simplified to be suitable for control studies. Therefore, we design a linear state space model, in a similar fashion to the upstream case (From mathematical modeling to advanced control) that correlates the inputs (modifier concentration) and the measured disturbances

(feed composition) to the tracked outputs (integrals of the outlet concentrations of the three mixture components). The inputs and disturbances are adequately excited and the behavior on the outputs is monitored.<sup>53</sup> The resulted data set is processed by the identification toolbox in MATLAB (*ident*), where the linear model is designed. The model results in satisfactory fits for all the tracked outputs (94.88%, 94.93%, and 93.06% for the integral of weak impurities, product, and strong impurities, respectively) and is designed based on 6 s sampling time. Table A.2 summarizes the key features of the designed state space model. Similar to the upstream case, the states of the state space model ( $x$ ) do not correspond to any of the physical entities of the original model. On the contrary, the outputs ( $y$ ) correspond to the integrals of the outlet concentrations of the mixture components, while the disturbances ( $d$ ) represent variations in the composition of the feed stream and the input ( $u$ ) corresponds to the modifier concentration

The model follows the same form as presented above (Table 5), where  $x$ ,  $u$ ,  $y$  are the states, inputs (modifier concentration), and outputs ( $\int C_w$ ,  $\int C_p$ , and  $\int C_s$ ), respectively,  $t$  corresponds to the time,  $T_s$  is the sampling time, and  $A$ ,  $B$ ,  $C$ ,  $D$  represent the matrices of the state space model.

$$A = \begin{bmatrix} 0.9998 & 0.0003667 & 0.0004885 & -9.137e-05 \\ 0.0009448 & 0.9971 & -0.003154 & -0.001599 \\ -0.001027 & 0.0003536 & 0.999 & 0.001881 \\ 0.000969 & 0.001559 & 0.0005033 & 0.9976 \end{bmatrix}$$

$$B = \begin{bmatrix} -6.252e-06 \\ 4.514e-05 \\ 6.337e-05 \\ -3.396e-05 \end{bmatrix}$$

$$C = \begin{bmatrix} 1.557e-05 & 8.449e-05 & 9.616e-06 \\ -9.018e-05 & -0.0004893 & -5.57e-05 \\ -3.487e-05 & -0.0001892 & -2.154e-05 \\ 3.698e-05 & 0.0002007 & 2.284e-05 \end{bmatrix}$$

$$D = \begin{bmatrix} 545.6 & 101.1 & 17.69 & 7.422 \\ 2925 & 660.2 & 102.6 & -67.49 \\ 331.9 & 78.42 & 17.12 & -11.23 \end{bmatrix}$$

**Controller Design and “Closed-Loop” Validation.** The designed state space model is used for the formulation and solution of the mp-programming problem. Table A.3 summarizes the tuning parameters used for the formulation of the mp-MPC. The problem comprises 22 parameters and is solved in MATLAB<sup>®</sup> using the POP<sup>®</sup> toolbox for robust/explicit MPC.

Both controllers (Controller A & B) share the same solution and they are validated in silico, in a “closed-loop” fashion where their capabilities and limitations are assessed. The controllers are updated based on the discretization step chosen for the design of the state space model (6 s). At every step, the controllers receive measurements for the tracked outputs and the measured disturbances that are used for the calculation of the states in the control problem formulation and therefore the optimal input action. In the presented case study, the simulation starts with both columns empty. Feed (Figures A.3a–c) starts being introduced to Column 1, while its outlet is recycled to Column 2 (Figure A.3d–f). In the proposed control design, we

treat the feed introduced to the downstream (Figure 3) as measured disturbance. In practice, the latter corresponds to the mixture resulting from the upstream, containing the targeted product (mAb) and the impurities that usually include aggregates and fragments. However, the composition of the feed stream cannot be manipulated and may in fact vary from one batch to the other. In addition, when moving to a fully integrated and continuous operation, measurements become even more challenging to obtain and that can consequently negatively affect the controller performance, as there is no possibility for online feedback.

Moreover, during interconnected operation of the downstream setup (I-phases), measurements of the recycled fractions entering Column 2 are challenging to obtain. The proposed approach facilitates the aforementioned challenges as it treats the feed as measured disturbances, the ranges of which can be predefined through offline experiments. Therefore, the controllers are measurement-independent with respect to both the upstream outcome and the recycled mixture fractions in the online continuous operation. In this work, the controllers are simulated for a given feed composition (approximately 0.05, 0.2, and 0.03 for the weak impurities, the product, and the strong impurities, respectively). The designed controllers are trained for a variation in the mixture composition that ranges from 0 mg/mL up to +10% from the base case value. The feed is introduced to Column 1 (Figures A.3a–c) under an average constant flow rate (approximately 0.5 mL/min), while Column 2 operates close to the maximum allowed flow rate (approximately 0.9 mL/min), following the original process.<sup>40</sup>

For the above-described strategy, the controllers return the input profile shown in Figures 17d and Figure A.1d to capture the predefined setpoints (Figures A.3a–c and Figure A.1a–c, dotted lines). It is observed that Controller 1 is periodically introducing modifier in the system. Controller 1 inherently adopts this periodic behavior that can lead to stable operation (Figure A.4d), where cyclic steady state can be achieved. Conversely, the input of Controller 2 (Figure A.5d) is not characterized by the same periodicity. The latter can be attributed to the fact that along with the impure mixture fractions, modifier is also

recycled into Column 2 and therefore the applied controller is only feeding the necessary additional amount of modifier. Therefore, it can be assumed that model-based control and the proposed strategy can lead to more ecofriendly processes, where the amount of waste is minimized without affecting the process performance. Both controllers manage to efficiently capture the desired setpoints (Figures A.4a–c and A.5a–c) without significant offset (<2%). It should be noted that the designed controllers are tracking the integrals of the outlet concentrations of the mixture components. It should be underlined that due to the nature of the outputs (integrals), the predefined setpoints can only increase or remain constant. However, the performance of purification processes is usually assessed based on the yield and the purity of the final product. As presented in Papathanasiou et al.,<sup>53</sup> purity and yield are discrete outputs and their monitoring can often lead to cycle-to-cycle approaches.<sup>65</sup> Furthermore, their measurements cannot be obtained online and require offline experiments to be determined. In the proposed strategy, we suggest tracking of the integral concentrations of the mixture components at the column outlet. Integral functions are of continuous nature and allow therefore continuous process control and tailor made laws throughout the process cycle. Additionally, they can be used for the calculation of purity and yield, as the latter are based in the average concentrations of the eluted components (Table A.4).<sup>65</sup>

As mentioned previously, the presented case study is based on constant flow rate values throughout the simulation. Based on the sensitivity experiments presented by Papathanasiou et al.,<sup>53</sup> the flow rate does not affect the quantity of the eluted components. However, the value of the flow rate is responsible for speed that the components travel through the column and therefore determines the residence time and the elution profile. Based on a given set of column volume and flow rate values, the residence time and the inherent system delay can be precalculated and subsequently the setpoints can be shifted accordingly in time.

Manuscript received Aug. 31, 2016, and revision received Mar. 10, 2017.








## Kinetic and Mass Transfer Model for Separation of Protein Using Ceramic Monoliths as a Stationary Phase

Milena Vega, Montaña Elviro, Eva-María Martín Del Valle, Ramón Cerro & Miguel Ángel Galán

To cite this article: Milena Vega, Montaña Elviro, Eva-María Martín Del Valle, Ramón Cerro & Miguel Ángel Galán (2017): Kinetic and Mass Transfer Model for Separation of Protein Using Ceramic Monoliths as a Stationary Phase, Chemical Engineering Communications, DOI: [10.1080/00986445.2017.1313243](https://doi.org/10.1080/00986445.2017.1313243)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/00986445.2017.1313243>

 View supplementary material [↗](#)

 Accepted author version posted online: 12 Apr 2017.  
Published online: 12 Apr 2017.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 Article views: 41

 View related articles [↗](#)

 View Crossmark data [↗](#)



# Kinetic and Mass Transfer Model for Separation of Protein Using Ceramic Monoliths as a Stationary Phase

MILENA VEGA<sup>1</sup>, MONTAÑA ELVIRO<sup>1</sup>, EVA-MARÍA MARTÍN DEL VALLE<sup>1</sup>, RAMÓN CERRO<sup>2</sup>, and MIGUEL ÁNGEL GALÁN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, Salamanca, Spain

<sup>2</sup>Department of Chemical and Materials Engineering, University of Alabama in Huntsville, Huntsville, Alabama, USA

Rigid adsorbents used as matrix skeleton have advantages over soft gel media for downstream processing of proteins. The adsorption of bovine serum albumin (BSA) has been investigated on a rigid ceramic monolith coated with cross-linked microporous agarose (D5). The physical properties of the adsorbent and the adsorption equilibria, adsorption kinetics, and mass transfer behavior have been studied for five different flow rates, with a pH value ranging from pH 4.5 to 7.0. The optimal working flow rate was 14.0 cm<sup>3</sup>/min, and using this flow rate, increasing the pH does not generate a significant improvement in the adsorption capacity. The rates of BSA adsorption have been measured and it was possible to describe a theoretical model, in which the mass transfer involves a dispersion coefficient ( $k_{disp}$ ), which describes the mass transfer in the adsorbent surface, from the volume of the protein solution to the agarose surface. This parameter presents an exponential tendency by increasing the flow rate from  $2.37 \times 10^{-6}$  to  $87.40 \times 10^{-6}$  cm/s for  $n = 1$ . Values obtained for the adsorption kinetic constant ( $k_{ads}$ ) followed the trend of the mass transfer parameter, increasing with the flow rate from  $1.94 \times 10^4$  to  $117.39 \times 10^4$  cm<sup>2</sup>/mol s. The theoretical model predicts the protein concentration in equilibrium for successive column reuses and it can be readily used to determine the optimal reuse of column. Likewise, for a maximum flow rate of 14 cm<sup>3</sup>/min, pressure drop was 0.04 MPa, being an advantage in front of packed columns that have higher pressure drop.

**Keywords:** Adsorption cycles; Ceramic monoliths; IMAC chromatography; Mass transfer

## Introduction

Currently, new materials of great interest are being developed for the separation of biomolecules using immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). Cryogel monoliths (Choudhury et al., 2015; Andaç et al., 2016; Bakhshpour et al., 2016), nanofibrous membranes (Zhu and Sun, 2014; He et al., 2016; Shen, et al., 2017), zeolites/ferrosphere magnetic beads (Vereshchagina et al., 2016), and polyethylene glycol (González-Ortega et al., 2012), among others, have been recently used in IMAC, focused on improving the adsorption capacity of the chromatographic column and affinity selective separations. The prevailing problem of large pressure drop due to flow on tortuous packing columns renders many of these new systems unfeasible for the separation of biomolecules on a large scale. Furthermore, the adsorbent manufacturing process, in some cases, may be too complicated and onerous. For this reason conventional materials such as agarose (Kennedy et al., 2016; Alves Mourão et al., 2016) or silica columns (Zabka et al., 2006; Chen et al., 2016; Yang et al., 2016) are still being used.

For years, the benefits of using monoliths in affinity chromatography by different materials have been investigated: Examples are porous material (Viklund et al., 1996; Mallik and Hage, 2006), macroporous materials (Luo et al., 2002), resins (Sun and Chai, 2002), and monoliths in capillary columns (Bedair and El Rassi, 2004). One of the greatest advantages of monoliths is that they can be manufactured in different formats such as disks, capillaries, and microchips. However, this could be a problem because the monolith may suffer some kind of deformation as a result of working conditions such as pressure, temperature, or flow rate used (Jungbauer and Hahn, 2004).

In short, the use of ceramic monoliths is an attractive alternative for selective separation of biomolecules using IMAC. The clear advantage of this type of ordered arrays is that due to its robust geometry and openness, flow pass through the channels with substantially smaller pressure drop with respect to packed columns of particulate material or monoliths that do not have a compact material and can be deformed under pressure. Additionally, these compact ceramic monolith supports have low thermal expansion and good mechanical strength.

The ceramic channels of the monolith can be coated by microporous-cross-linked agarose, which conforms to the monolith shape. The resulting support media successfully replace bead-packed columns and adsorption takes place within the monolith channels on the agarose surface.

Address correspondence to Eva-María Martín del Valle, Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, P/Los Caídos S/N, Salamanca 37008, Spain. E-mail: [emvalle@usal.es](mailto:emvalle@usal.es)

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at [www.tandfonline.com/gcec](http://www.tandfonline.com/gcec).

The aim of this research was to develop a mathematical model to predict the kinetic and mass transfer parameter using a known protein adsorption system (bovine serum albumin, BSA), activated with an epoxy group and using  $\text{Cu}^{2+}$  as ligand. Although the approach presented in this paper corresponds to the classic mass transfer phenomenon, this model can predict the adsorbed protein concentration in equilibrium with an error margin of less than 5%. The mathematical model is based on traditional affinity chromatography (Mao et al., 1991), but was successfully modified to describe mass transfer processes in IMAC chromatography, using the cylindrical geometry of the ceramic monolith. Because of the microporous nature of the agarose, the model is based on the external mass transfer by convection from the bulk of the protein solution to the agarose surface. Separation and regeneration efficiency of the monolithic column were investigated in a previous work (Vega et al., 2014) and although the BSA has been highly studied, this model can be extrapolated to larger biomolecules in similar process conditions.

## Materials and Methods

### Materials

The 400/6 standard automotive monolith (400 cells in<sup>-2</sup> and 0.006 in wall thickness) from Corning, NY, is made of cordierite and contains traces of iron, titanium, potassium, and calcium (Martin del Valle et al., 2003). The ceramic monolith was used as skeleton for the agarose overlay, but in any case the adsorption process was carried out directly on the monolithic ceramic support. The ceramic block was cut according to the size of the chromatographic column used (XK-16 Pharmacia in our case, with adjustable height). The outer diameter is determined by the diameter of the column. The length and diameter of the cut ceramic monoliths are 7.5 cm and 1.3 cm, respectively.

After coating the ceramic monolith with agarose, the number of open cells in the matrix was counted manually using an optical microscope (Leica DM1000). The agarose layer thickness was obtained experimentally by using optical microscopy and the camera DFC 280 4 × 0.5. These values were also checked by scanning electron microscopy. Thus, considering the average agarose thickness layer, the actual hydraulic internal area for each section of the ceramic monolith was calculated. Table I contains the values for these measurements as well as the main physical properties of the ceramic monolith coated with agarose D5, used for each studied flow rate and pH.

The main physical properties of the ceramic monolith coated with agarose D5 used for the flow rate and pH studies are shown in Table I.

Considering the wall thickness to be about 0.18  $\mu\text{m}$  and that the space between each wall is 1.1 mm, even at the highest average agarose thickness of 147  $\mu\text{m}$ , the channel will have sufficient area for the protein flow to circulate without difficulty through the column, favoring the pressure drop. The pressure drop was measured for each flow rate. For a maximum flow rate of 14  $\text{cm}^3/\text{min}$ , it was found to be 0.04 MPa. If we compare this value with columns packed with silica gel (4.3 MPa, 6.2 MPa) (Kennedy and Jorgenson, 1989; Fields, 1996), the value obtained in this work is significantly lower.

### IMAC Support Preparation

#### Preparation of the D5 Agarose Coating

The column inserts, cut out of a ceramic monolith, were coated with a mixture of agarose type D5, phosphate buffer at pH 4.5, and water. The mixture was heated at 70°C and subjected to vigorous agitation to obtain a homogeneous solution. The column cores, previously dry-weighed, were immersed in agarose two times for a few minutes. After the second immersion, the monolith was left to rest and dry for 2 h and then weighed to calculate the amount of agarose remaining on the walls.

#### Activation of the Epoxy Agarose Matrix

The scheme of the activation of epoxy agarose matrix process can be observed in Figure 1.

1,4-Butanediol diglycidyl ether was provided the spacer arm and the activation of the matrix, obtaining an epoxy agarose support. The result of the activation process was the reversible bond Schiff's base formation. This implies the irreversible immobilization of IMAC ligand. Simultaneous treatment with a reducing agent such as  $\text{NaBH}_4$  guarantees the irreversibility of the formed bonds and inactivates the reactive groups of the support which did not interact, which are converted into a hydroxyl group (Armisen et al., 1999).

#### Binding of the Chelating Compound to the Activated Matrix

The scheme of binding of the chelating compound to the activated matrix process can be observed in Figure 2.

The chelating agent used in this work was iminodiacetic acid (IDA), which coordinates the  $\text{Cu}^{2+}$  in three sites, leaving the remaining coordination sites available to bind with the deprotonated nitrogen of the histidine imidazole group, forming a ternary complex between IDA and amino acid residues found in the BSA surface protein. Thus, the metal ion and the protein in reversible form can be attached.

**Table I.** Physical properties of affinity support

Property/flow rate ( $\text{cm}^3/\text{min}$ )	1.50 <sup>a</sup>	5.50 <sup>a</sup>	8.40 <sup>a</sup>	10.60 <sup>a</sup>	14.0 <sup>a</sup>	14.0 <sup>b</sup>
Weight (g)	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30
Overall volume, $V_M$ ( $\text{cm}^3$ )	4.54	4.53	4.53	4.58	4.45	4.52
Coating load (g)	2.25	1.79	3.07	3.04	2.03	2.59
Coating average thickness ( $\mu\text{m}$ )	108	86	152	147	98	124
Total surface area of coating ( $\text{cm}^2$ )	211	210	204	209	209	210
Hydraulic internal area after coating ( $\text{cm}^2$ )	2.65	2.78	2.39	2.42	2.71	2.56

<sup>a</sup>pH 4.5.

<sup>b</sup>pH 7.0.

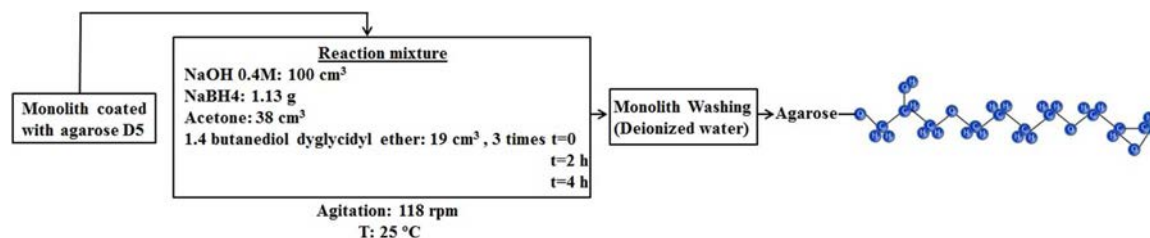


Fig. 1. Process of activation of epoxy agarose matrix.

#### Binding of the Metal ( $\text{Cu}^{2+}$ ) to the IDA–Agarose Matrix

The scheme of binding of the metal to the IDA–agarose matrix process can be observed in Figure 3.

Before the first adsorption step, a 50-mM Tris-buffer (tris-(hydroxymethyl)-aminomethane) at pH 8.0 was circulated through the column for 2 h, until approximately 0.02 absorbance at 280 nm was reached (Vega et al., 2014).

#### Adsorption Process

Five reuse cycles of the column were studied experimentally (where  $n$  is defined as cycle number), although the column could be reused up to 10 cycles. Up to this value, the protein concentration at equilibrium was constant and the column needed to be regenerated only with  $\text{Cu}^{2+}$  (Vega et al., 2014). Five different flow rates were studied, 1.50, 5.50, 8.40, 10.60, and 14.0  $\text{cm}^3/\text{min}$ , for five different cores. Also, two different pH values (4.5 and 7.0) were studied. In order to carry out adsorption experiments, 50  $\text{cm}^3$  of BSA solution 0.7  $\text{mg}/\text{cm}^3$  in phosphate buffer solution and 25°C were continuously circulated through an affinity column XK-16 Pharmacy by adsorption experiments. BSA adsorption in the column was measured by taking an aliquot of 1  $\text{cm}^3$  every 20 min and biomolecule absorbance was measured using a UVICON 922 spectrophotometer at a wavelength of 280 nm, until concentration in the sample reached a constant value, indicating that the adsorption process had stopped. Experimental equilibrium curves of the BSA adsorption process for the five flow rates

studied have been shown in a previously published work (Vega et al., 2014).

#### Elution Process

In order to remove the protein retained in the adsorbent by nonspecific binding, an adsorption buffer (phosphate solution pH 4.5) was circulated through the column at a flow rate of 1.50  $\text{cm}^3/\text{min}$ . In order to do this operation, a sample was measured every 10 min at the column outlet and the absorbance was measured at 280 nm, until the BSA protein concentration reached the value of zero, indicating that it was not possible to elute any more protein.

A competitive inhibitor (imidazole) was used in order to elute the protein specifically bound to the adsorbent (Vunnum and Cramer, 1997; Pathange et al., 2006; Jayabharathi et al., 2011). To carry out the elution process, the effect of imidazole concentration was studied for 0.01, 0.1, 0.2, and 0.3 M concentration values in PBS 7.4 buffer. The solution was circulated through the column at a flow rate of 1.50  $\text{cm}^3/\text{min}$ . Aliquots of the column outlet were collected and analyzed by a spectrophotometer at 280 nm. The elution process continued until it was not possible to detect any more protein. The total amounts of the bound BSA eluted by 0.01, 0.1, 0.2, and 0.3 M imidazole solutions were 10.4, 11.5, 11.6, and 7.8  $\text{mg}/\text{cm}^3$ , respectively. The results showed elution capacity increment by increasing the concentration of imidazole from 0.01 to 0.2 M. Nevertheless, for 0.3 M imidazole concentration the amount of recovered protein was lower, even

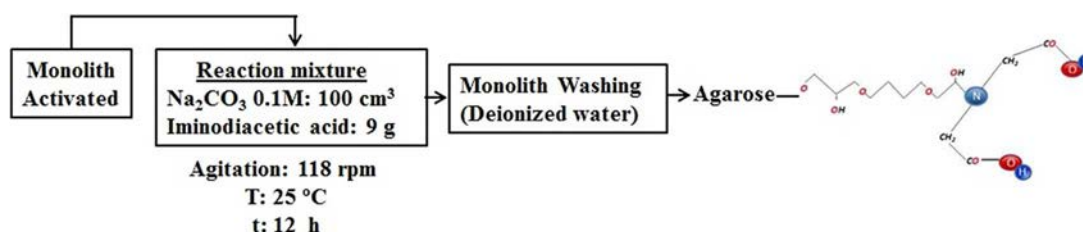


Fig. 2. Binding of the chelating compound to the activated matrix process.

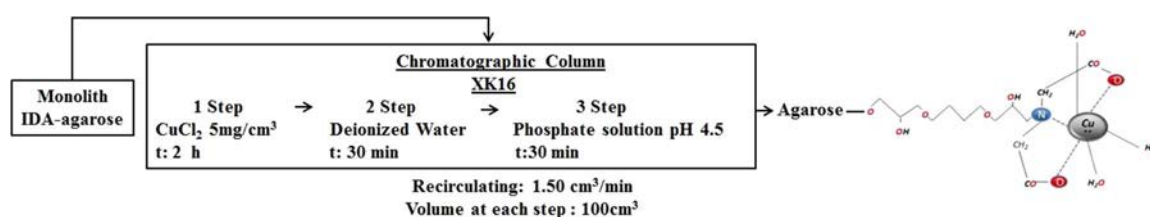


Fig. 3. Binding of metal ( $\text{Cu}^{2+}$ ) to the IDA–agarose matrix.

compared to 0.01 M concentration. This trend, in general, is similar to the one obtained by Wang et al. (2008). Likewise, the required eluent time decreased with increasing concentration of imidazole solution in the elution section; therefore more volume was necessary. Imidazole was able to weaken the affinity between the bound protein and metal ion and then elute the bound proteins. The more imidazole molecules available, the higher probability that interactions between the imidazole molecules and the metal ions will occur. Hence, the required volume of eluent was decreased when the concentration of imidazole solution was increased (Wang et al., 2008).

In this way, the elution experiments were carried out at 0.2 M imidazole to ensure recovery of the maximum amount of BSA protein. The curves for the elution process ( $n = 1$ ) for each flow rate adsorption studied can be found in the supplementary material.

## Results and Discussion

### Mass Transfer Model Development Within the Channels of the Ceramic Monolith

Determination of mass transfer parameters within the ceramic monolith channels and adsorption rate was performed. Hence, a model of mass transfer was developed using MATLAB. This model fits the dispersion coefficient ( $k_{disp}$ ) and the adsorption rate constant ( $k_{ads}$ ) for minimum search method in multiparameter functions.

In order to develop the model, it is necessary to assume that the adsorption process takes place only at the interface between the adsorbent (agarose gel) and the surrounding liquid. Thus, the experimental control volume includes the beaker volume containing the protein solution, the volume of the pump and pipe system, and finally the combined volume of the monolith's channels. The protein is dissolved in a defined volume, which circulates through the entire circuit, where the protein concentration changes over time, due to the fact that protein is adsorbed on the monolithic channels walls. Therefore, the control volume is closed, without convective term and chemical reaction source according to Equation (1).

$$\frac{d}{dt} \int_{V_{sol}} \bar{C}_E(\tilde{x}, t) dV + \frac{d}{dt} \int_{A_{mon}} \bar{\rho}_{BE} dA = 0 \quad (1)$$

where  $\bar{C}_E(\tilde{x}, t)$  is the local concentration (mol/cm<sup>3</sup>),  $\bar{\rho}_{BE}$  is the amount of protein adsorbed per unit of local area (mol/cm<sup>2</sup>),  $V_{sol}$  is the protein solution volume (cm<sup>3</sup>), and  $A_{mon}$  (cm<sup>2</sup>) is the monolithic surface area. The local concentration is a function of the spatial coordinates within the control volume, denoted by the spatial coordinate vector  $\tilde{x}$ , and time. Thus, the biomolecule adsorbed on the surface is also a function of time and space. Integrating Equation (1) with respect to the space variable, it is possible to establish an expression for the global change of the protein concentration as a function of time.

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \left\{ \int_{V_{sol}} \bar{C}_E(\tilde{x}, t) dV \right\} &= \frac{d}{dt} C_E(t) V_{Sol}(t) \\ &= - \frac{d}{dt} \left\{ \int_{A_{mon}} \bar{\rho}_{BE} dA \right\} = - \frac{d\rho_{BE} A_{mon}}{dt} \end{aligned} \quad (2)$$

where

$$C_E(t) = \frac{1}{V_{Sol}(t)} \int_{V_{Sol}} \bar{C}_E(\tilde{x}, t) dV \quad (3)$$

$$\rho_{BE} = \frac{1}{A_{mon}} \int_{A_{mon}} \bar{\rho}_{BE} dA \quad (4)$$

Therefore, the average volume defines the average concentration of the protein solution  $C_E(t)$  as a function of time exclusively. The average monolithic surface defines the average amount of adsorbed protein  $\rho_{BE}$  and likewise, it is only a function of time. Since the monolith area is constant, it is possible to calculate this area from the derivative of Equation (2). Furthermore, if it is assumed that the samples taken for analysis create minor volume changes (this is an experimentally verified assumption), the volume of the solution remains practically constant, thus  $V_{sol}(t) \approx V_o$ . According to the aforementioned description, Equation (2) can be integrated with respect to time, to show that the adsorption amount represents the total amount of adsorbed protein on the monolith surface at any given time during the adsorption process.

$$V_o \int_{C_o}^{C_E} d[C_E(t)] = V_o[C_E(t) - C_o] = -A_{mon} \int_{\rho_o}^{\rho_{BE}} d\rho_{BE} \quad (5)$$

$$-A_{mon} \rho_{BE}(t) \left\{ \rho_{BE}(t=0) = 0 \right. \quad (6)$$

Thus, the constant  $m$  (cm) was defined as  $m = V_o/A_{Mon}$  as, the relationship between the volume of the protein solution which is distributed at the monolith interfacial area, it is possible to obtain an identical equation to Equation (1), but introducing a correction factor  $\phi \leq 1$  in order to take into account the protein concentration trapped within the matrix. This will be considered as a correction to the actual variation in the protein concentration  $C_o - C_E|_0$ .

$$\rho_{BE}(t) = (C_o - C_E)m\phi \quad (7)$$

### Mass Balance

The global variation of the protein concentration in solution and the protein adsorbed on the monolith walls is represented by Equation (8), obtained from Equations (1) through (7).

$$m \frac{dC_E}{dt} + \frac{d\rho_{BE}}{dt} = 0 \quad (8)$$

When an adsorption cycle is completed, there is a specific amount of adsorbed protein on the ceramic monolith surface coated with agarose gel,  $C_{E,ads}$  (mol/cm<sup>3</sup>), and a small protein fraction is retained,  $C_{E,ret}$  (mol/cm<sup>3</sup>); this behavior can be described according to Equation (9).

$$C_E|_1 = C_o - C_{E,ads} - C_{E,ret} \quad (9)$$

where

$$C_{E,ads} = C_o - C_E|_1 + C_{E,ret} = (C_o - C_E|_1)\phi \quad (10)$$

And by defining  $\phi$  as

$$\phi = \frac{C_o - (C_{E|1} - C_{E,ret})}{(C_{E|1} - C_{E,ret})} = \frac{C_o}{(C_{E|1} - C_{E,ret})} - 1 \quad (11)$$

Thus, the amount of protein specifically unbound to the ligands is very low and relatively constant, representing the total protein dissolved in the surrounding solution. Therefore, Equation (11) can be written in terms of the adsorbed protein surface concentration, obtaining Equation (7) again.

### Mass Transfer in the Adsorbent Surface

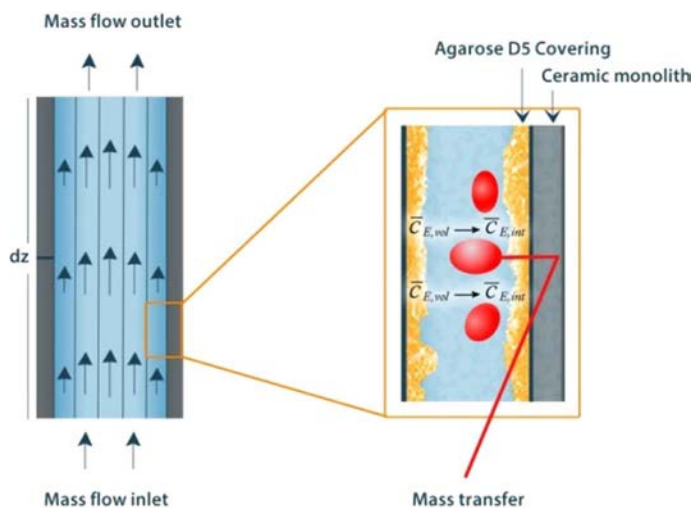
In order to evaluate the protein transport contribution from the overall solution volume to the agarose surface, the mass balance is evaluated on a small differential length  $dz$  (Figure 4), throughout the ceramic column.

Therefore, the protein concentration change in a monolithic channel results in the adsorbed protein on the monolith surface as shown in Equation (12).

$$\frac{d}{dt} \int_{dV} \bar{C}_E dV + \frac{d}{dt} \int_{dA} \bar{\rho}_{BE} dA + \int_{dA} \bar{C}_E \mathbf{v} \cdot \mathbf{n} dA = 0 \quad (12)$$

where the first term represents the local variation of the protein concentration at equilibrium  $\bar{C}_E$  in the total volume with respect to time. The second term corresponds to the temporal variation of adsorbed protein on the monolith surface and, finally, the third term represents the convective flow from input and output of protein which in this case is negligible. This assumption can be justified if, at the local level, the protein flow that migrates from the solution to the interface is equal to the adsorbed protein on the agarose interface. Therefore, Equation (12) can be transformed as follows (Equation. 13):

$$\frac{d}{dt} \left[ \int_{dV} \bar{C}_E dV + \int_{dA} \bar{\rho}_{BE} dA \right] \cong 0 \quad (13)$$



**Fig. 4.** Adsorption process scheme of a multichannel monolithic column coated with microporous agarose D5.

According to Equation (13), it can be said that assuming that the dispersion of protein is equal to the concentration of protein, a local equilibrium concentration is generated. This equilibrium can be described according to Equation (14):

$$\frac{d\bar{\rho}_{BE}}{dt} = -m \frac{d\bar{C}_E}{dt} = k_{disp} (\bar{C}_{E,Vol}(t) - \bar{C}_{E,int}) \quad (14)$$

where a local dispersion coefficient is introduced ( $k_{disp}$ ), by introducing the radial diffusion process into the model.

### Protein-Adsorbent Interactions

Assuming no protein accumulation on the agarose gel surface, the amount of protein adsorbed on the surface is a function of protein concentration in the solution at the interface  $\bar{C}_{E,int}$  and the amount of free sites available for the adsorption process, according to Equation (15).

$$\begin{aligned} \frac{d\bar{\rho}_{BE}}{dt} &= -m \frac{d\bar{C}_E}{dt} \\ &= k_{ads} [(\rho_{AS}^R - \bar{\rho}_{BE}) m \bar{C}_{E,int} - K_D \bar{\rho}_{BE}] \end{aligned} \quad (15)$$

where  $k_{ads}$  (cm<sup>2</sup>/mol s) is the desorption kinetics constant and  $K_D$  is the adsorption equilibrium constant defined as:  $K_D = \frac{k_{des}}{k_{ads}}$  (mol/cm<sup>2</sup>), where  $k_{des}$  (s<sup>-1</sup>) is the adsorption kinetics constant. The mathematical procedure to obtain  $K_D$ , for the flow rate and pH values studied, can be consulted in the supplementary material.

Since we assume that the amount of protein adsorbed on the monolith coated with agarose gel surface is equal to the diffusion rate of a volume of monolith channel to interface, it is possible to use Equations (14) and (15) to remove the protein concentration in solution at the agarose interface as shown in Equation (16):

$$\bar{C}_{E,int} = \bar{C}_E(t) + \frac{m}{k_{disp}} \frac{d\bar{C}_E}{dt} = \frac{-m \frac{d\bar{C}_E}{dt} + k_{ads} K_D \bar{\rho}_{BE}}{k_{ads} (\rho_{AS}^R - \bar{\rho}_{BE}) m} \quad (16)$$

From Equation (15), for the adsorbed protein amount in solution, it is possible to obtain a differential equation that relates the mass transfer dispersion coefficient and adsorption rate constant at the interface of the agarose gel, as shown in Equation (17).

$$\begin{aligned} -\frac{d\bar{C}_E}{dt} \left[ \frac{(\rho_{AS}^R - \bar{\rho}_{BE}) m}{k_{disp}} + \frac{1}{k_{ads}} \right] &= \bar{C}_E(t) (\rho_{AS}^R - \bar{\rho}_{BE}) \\ &\quad - \frac{K_D \bar{\rho}_{BE}}{m} \end{aligned} \quad (17)$$

Thus, to remove the protein concentration absorbed per unit area  $\bar{\rho}_{BE}$  from Equation (17), Equation (7) is used, resulting in Equation (18).

$$\begin{aligned} -\frac{d\bar{C}_E}{dt} \left[ \frac{(\rho_{AS}^R - (C_o - \bar{C}_E) m)}{k_{disp}} + \frac{1}{k_{ads}} \right] \\ = \bar{C}_E (\rho_{AS}^R - (C_o - \bar{C}_E) m) - K_D (C_o - \bar{C}_E) \\ = m \bar{C}_E^2 + \bar{C}_E [\rho_{AS}^R - m C_o + K_D] - K_D C_o \end{aligned} \quad (18)$$

Finally, from Equation (18), we obtain Equation (19).

$$\begin{aligned} -\frac{d\bar{C}_E}{dt} \left[ \frac{1}{M} + \frac{1}{k_{ads}} \right] &= (\bar{C}_E - x_1)(\bar{C}_E - x_2) \\ &\times \bar{C}_E^2 + \bar{C}_E \left[ \frac{\rho_{AS}^R}{m} - C_o + \frac{K_D}{m} \right] - \frac{K_D}{m} C_o \\ &= \bar{C}_E^2 - B\bar{C}_E - c = (\bar{C}_E - x_1)(\bar{C}_E - x_2) \end{aligned} \quad (19)$$

where

$$c = \frac{K_D C_o}{m} \quad (20)$$

$$M = \frac{E}{(\rho_{AS}^R - (C_o - \bar{C}_E)m)} \quad (21)$$

$$E = \frac{k_{disp}}{m} \quad (22)$$

And solving the quadratic equation:

$$\bar{C}_E^2 + \bar{C}_E \left[ \frac{\rho_{AS}^R}{m} - C_o + \frac{K_D}{m} \right] - \frac{K_D}{m} C_o = 0 \quad (23)$$

$$\bar{C}_E = \frac{-\frac{\rho_{AS}^R}{m} + C_o - \frac{K_D}{m} \pm \sqrt{\left(\frac{\rho_{AS}^R}{m} - C_o + \frac{K_D}{m}\right)^2 + 4\frac{K_D C_o}{m}}}{2}$$

Simplifying Equation (23), we obtain Equation (24):

$$B = \left[ \frac{\rho_{AS}^R}{m} - C_o + \frac{K_D}{m} \right] \quad (24)$$

Thus, the two solutions to the quadratic equation are  $x_1$  and  $x_2$  shown in Equations (25) and (26), respectively:

$$x_1 = \frac{1}{2} \left[ B + \sqrt{B^2 + \frac{4K_D C_o}{m}} \right] \quad (25)$$

$$x_2 = \frac{1}{2} \left[ B - \sqrt{B^2 + \frac{4K_D C_o}{m}} \right] \quad (26)$$

The  $x_1$  value from Equation (25) corresponds to the prediction of local equilibrium protein concentration  $\bar{C}_E$ . The values corresponding to the local concentration–time profiles were correlated according to Equation (25). The model developed in this work is based on the model described by Mao et al. (1991). However, in this case, the model fits the dispersion coefficient  $k_{disp}$  and adsorption kinetics constant  $k_{ads}$ .

### Flow Rate Effect

The experimental local protein adsorption process curves ( $\bar{C}_E$  vs.  $t$ ) corresponding to the five flow rates studied, for each reuse cycle ( $n_1, n_2, n_3, n_4,$  and  $n_5$ ) of the monolithic column coated with agarose, were compared to the values predicted by the mass transfer model (Figure 5).

Assuming that all channels behave similarly inside the average volume in the monolithic column coated with agarose, it is possible to say that the local adsorption is identical to the global adsorption. Thus, the global concentration predicted at

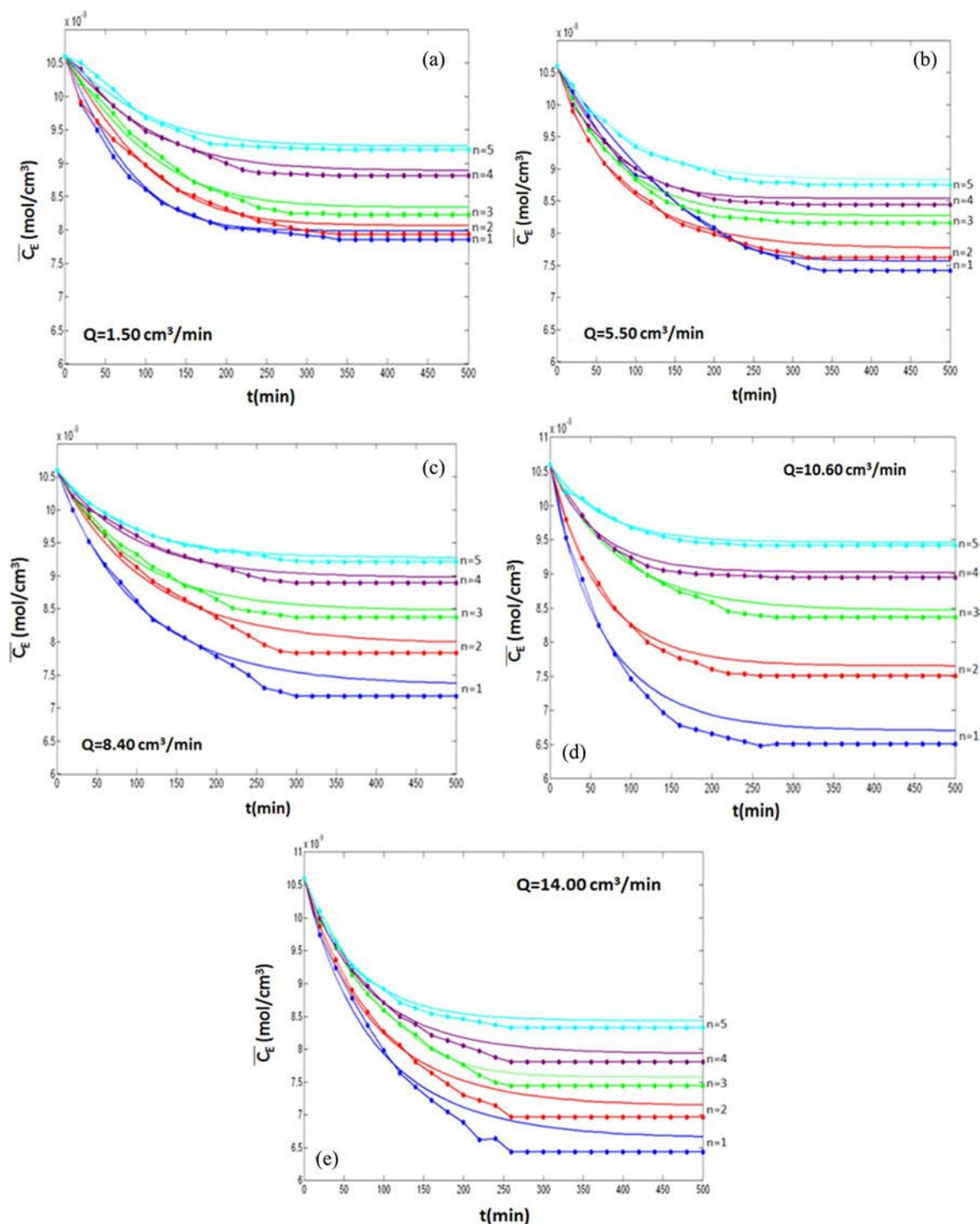
equilibrium  $C_E$ , obtained by the efficiency model (Vega et al., 2014), and the local equilibrium concentration  $\bar{C}_E$ , obtained using the mass transfer model proposed in this work, are practically the same.

According to Figure 5(a–e), the model fits adequately to the experimental adsorption curves with an error margin of less than 5%. As previously reported, the adsorption capacity of the monolithic column coating with agarose decreases when the number of reuse cycles is increased for the same flow rate. This behavior was consistently observed in the five flow rates studied and a reason could be due to fouling caused by the retained protein in the adsorbent surface, which cannot be removed after the elution process. This behavior implies that the actual available adsorption process area is an important factor in the adsorption process, which influences the adsorption capacity of the monolithic column. Also, it was demonstrated that by increasing the flow rate, the time required to reach equilibrium is less. On the other hand, it was proven that the adsorption capacity increases when the flow rate of the adsorption process increases as well. For this reason, the experiment at different pH values was done at a flow rate of 14 cm<sup>3</sup>/min. Figure 6 shows the experimental and theoretical adsorption curves corresponding to experiments at pH 7.0 for a flow rate of 14 cm<sup>3</sup>/min.

According to Figure 6, regardless of the pH used, the time required for the system to reach the equilibrium at the same flow rate is practically the same. The equilibrium curves at pH 7.0 are practically identical with respect to pH 4.5. This behavior is similar to the one obtained by Xi and Wu (2004) where the pH (4.0 to 7.5) effect on the BSA adsorption in Cu<sup>2+</sup> with cross-linked chitosan coated on non-porous silica gel was studied. Results showed that the capability of protein coordination with the copper ion was decreased with the lowering of pH values. The maximal adsorption capacity was reached at pH 6.0, but when the pH was higher than 6.0, the adsorptive capacity was decreased. This might be caused by the phosphate ion in the buffer solution, as it might compete with the protein to coordinate with the copper ion. When the pH value was high, the percentage of HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> in the buffer solution was increased. Additionally, when a pH value up to the protein isoelectric point was used, it was negatively charged, generating more interactions with the metallic ions (Nghah et al., 2002; Rezwani et al., 2005). Although only five reutilization cycles are shown, the column can be reused up to 10 times ( $n = 10$ ) for subsequent cycles; the adsorption capacity is practically the same in subsequent adsorption cycles, so it is necessary to regenerate the column in order to use it again. It is also important to note that the BSA concentration used in the adsorption process (0.7 mg/cm<sup>3</sup>) is high compared to the traditional concentrations used in IMAC chromatography which are of the order of 0.1 mg/cm<sup>3</sup> (Luo et al., 2001; Arvidsson et al., 2002; Plieva et al., 2004).

### Adsorption Kinetics Constant Determination

An amount of protein which is not possible to elute remains inside the column; therefore some binding sites may be blocked from  $n = 1$ . The rate constant obtained by the mass transfer model should be considered as a pseudo-constant  $k'_{ads}$  because

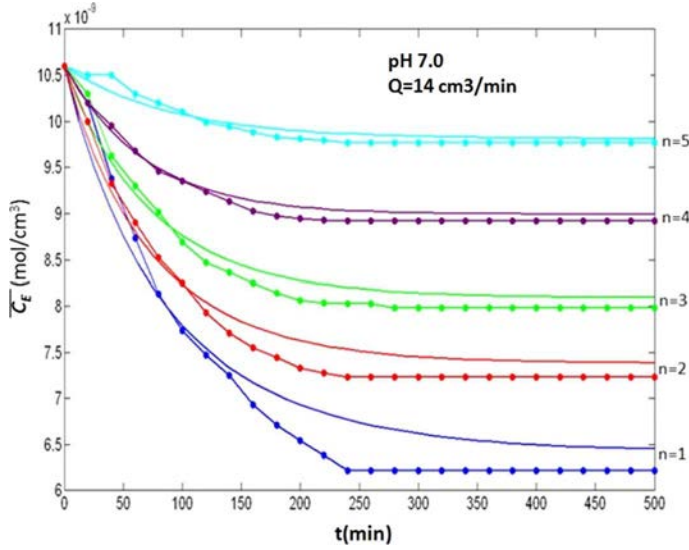


**Fig. 5.** Comparison of model prediction (line) with respect to experimental data (points) corresponding to the protein adsorption process in phosphate solution pH 4.5 and 25°C, for the five flow rates studied: (a) 1.50 cm<sup>3</sup>/min, (b) 5.50 cm<sup>3</sup>/min, (c) 8.40 cm<sup>3</sup>/min, (d) 10.60 cm<sup>3</sup>/min, and (e) 14.00 cm<sup>3</sup>/min.

for each reuse ( $n_2$  to  $n_5$ ), the value obtained is relatively different. However considering that for the same flow rate the time required for the adsorption process to reach the equilibrium is practically the same in all cycles ( $n_1$  to  $n_5$ ), it is possible to average the  $k'_{ads}$  values obtained. Thus, to obtain  $k_{ads}$  the

$k'_{ads}$  average value, the adsorption efficiency ( $\eta_A$ ) was used.  $\eta_A$  considers the natural transformation that the monolithic column coated with agarose undergoes through the successive reuse cycles. Sites are blocked by the imidazole, and the amount of protein that is retained is not possible to elute. This variable





**Fig. 6.** Comparison of model prediction (line) with respect to experimental data (points) corresponding to the protein adsorption process in phosphate solution pH 7.0 and 25°C, at flow rate 14 cm<sup>3</sup>/min.

depends on the coating structure and can only be measured by extrapolation during the first adsorption cycle ( $n = 1$ ) (Equation 27).

$$\eta_{A0} = \frac{[C_0 - C_{E|1}] \phi m}{\eta_{A0} \rho_{AS}^T} \quad (27)$$

Thus, to obtain  $\eta_A$  it is necessary to calculate the adsorption efficiency, which relates the amount of protein adsorbed during the first adsorption cycle per unit of area to the actual amount of protein which can be adsorbed on the adsorption surface. In this form, Equation (7) is used to compute the theoretical maximum amount of protein that can be adsorbed on the surface. As porosity is negligible, the internal volume of agarose is negligible as well. Therefore, the adsorption process is carried out exclusively on the adsorbent surface. Using Equation (28), it is possible to obtain the conversion of protein concentration into surface concentration on the monolith.

$$\begin{aligned} \rho_{AS}^T (\text{mmol}/\text{cm}^2) &= \frac{10^{14} (\text{nm}^2/\text{cm}^2)}{\delta_E (\text{nm}) \times 10^{-6} \times N (\text{molecules}/\text{mol})} \\ &= 3.12 \times 10^{-6} (\text{mmol}/\text{cm}^2) \end{aligned} \quad (28)$$

where  $N$  is Avogadro's number and  $\delta_E$  is the footprint of a molecule of protein, which is the area occupied by one protein molecule deposited on the adsorption surface. An order of magnitude estimate of the footprint of BSA is the square of the diameter of BSA,  $D = 7.28$  nm (Daqiq et al., 2007). Our computed value of  $\rho_{AS}^T$  is similar to the value reported by Foose et al. (2008). We make use of these definitions to track changes in adsorption behavior of the monolith columns based on two types of adsorption efficiencies. The first efficiency,  $\eta_{A0}$ , is the relationship between actual amounts of protein that can be adsorbed on the surface of monolith ( $\rho_{AS}^R$  mmol/cm<sup>2</sup>) which

cannot be measured directly and must be estimated by extrapolation of adsorption equilibrium profile and the theoretical amount of protein that can be adsorbed,  $\rho_{AS}^T$  (Vega et al., 2014) (Equation 29). Table II shows the adsorption efficiencies for each flow rate and pH value studied.

$$\eta_{A0} = \frac{\rho_{AS}^R}{\rho_{AS}^T} \quad (29)$$

Thus, we obtain Equation (30).

$$k_{ads} = \eta_A \cdot k'_{ads} \quad (30)$$

Through  $\eta_A$  and pseudo-constant adsorption kinetics  $k'_{ads}$  obtained from the mass transfer model proposed, the adsorption kinetics constant  $k_{ads}$  can be obtained from Equation (30) for each flow rate studied, considering the reuse cycles.

Figure 7 shows the adsorption kinetics constant trend versus Reynolds number for different flow rates studied. The values obtained for each flow rate studied can be consulted in the supplementary material.

According to Figure 7, the adsorption rate increases with increasing flow rate, presenting an exponential tendency. This behavior could be explained, considering that the IDA-Cu<sup>2+</sup> complex is flexible; therefore, the complex is not always in the same position. When the chelate is generated, Cu<sup>2+</sup> may not be accessible for the protein surface, where the protein-ligand binding is produced. Thus, if the adsorption process is performed at low flow rates, for example 1.50 cm<sup>3</sup>/min, with these mass flows, the chelates are unable to reorganize and the matrix adsorptivity is less with respect to a higher flow rate.

Given that the movement through the channels of the matrix is convective, it is likely that the IDA-Cu<sup>2+</sup> complex re-fold in the space, which prevents some active sites from binding with the protein. Thus, it is possible that increasing the adsorption process flow rate increases the adsorption capacity of the adsorbent. Increased adsorption capacity due to increased area available for the adsorption process and the molecules of ligand are able to reorganize and therefore are more accessible for the protein binding sites. This behavior could justify the fact that the amount of adsorbed protein is higher when the flow rate increases and therefore the adsorption rate is increased in the same proportion.

With respect to pH, the  $k_{ads}$  values obtained for the pH values studied are: pH 4.5 ( $117.39 \times 10^{-4}$ ) and pH 7.0 ( $117.60 \times 10^{-4}$ ) cm<sup>2</sup>/mol s. It was noticed that the values obtained for the two pH values studied were practically identical. According to this result, it is possible to say that increasing the pH does not have a significant effect on the variation of the kinetics constant  $k_{ads}$ . This behavior is consistent with the fact that with a flow rate of 14.0 cm<sup>3</sup>/min, the time required for the system to reach equilibrium is virtually the same regardless of the amount of protein adsorbed per unit area. In the supplementary material the data tables by pseudo-constant  $k'_{ads}$  and constant  $k_{ads}$  are available for each flow rate and pH values studied, respectively.

### Dispersion Coefficient Determination

Dispersion coefficients  $k_{disp}$  were obtained by the mathematical model previously described, using MATLAB script, but as in the case of adsorption kinetics constant  $k_{ads}$ , the value obtained by

**Table II.** Adsorption efficiencies for the study of BSA protein in Cu-IDA-agarose/potassium phosphate buffer, 25°C

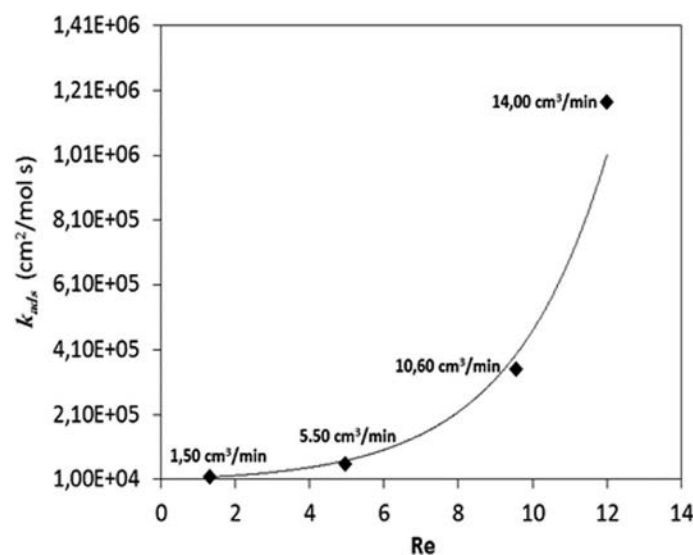
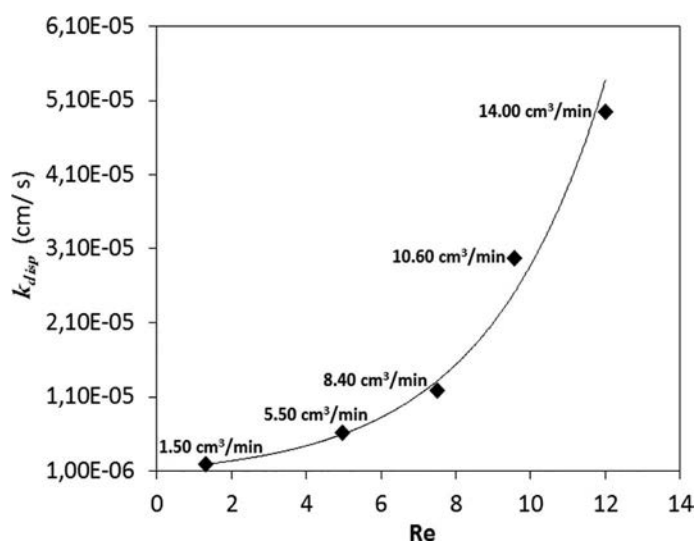
Flow rate (cm <sup>3</sup> /min)	1.50 <sup>a</sup>	5.50 <sup>a</sup>	8.40 <sup>a</sup>	10.60 <sup>a</sup>	14.0 <sup>a</sup>	14.0 <sup>b</sup>
Number of cycles of use (n)	5	5	5	5	5	5
<i>m</i> (cm <sup>3</sup> of solution/area cm)	0.24	0.24	0.24	0.24	0.237	0.238
$\rho_{AS}^R$ (mmol/cm <sup>2</sup> ) × 10 <sup>-7</sup>	7.33	8.02	8.64	10.39	10.29	11.80
$\eta_{A0}$ (d-less)	0.23	0.26	0.28	0.33	0.33	0.24
$\eta_A$ (d-less)	0.84	0.89	0.89	0.88	0.91	0.84

<sup>a</sup>pH 4.50.<sup>b</sup>pH 7.0.

Source: Vega et al. (2014).

the model is a pseudo-coefficient  $k'_{disp}$ ; so it was also necessary to calculate  $k_{disp}$  using the efficiency adsorption process  $\eta_A$ .

However, assuming no limitations imposed by the number of adsorption sites, the amount of Cu<sup>2+</sup> immobilized in the matrix is at least four more orders in magnitude than the amount of protein that can bind to ions. Thus, there are no residual protein molecules from other adsorption/elution cycles blocking the binding sites for  $n = 1$  when the adsorbent is fresh. In this case, all sites for BSA-Cu<sup>2+</sup> binding are available. Therefore, it is possible to say that  $k'_{disp} = k_{disp}$ . However, for  $n \neq 1$ , the actual sites available for adsorption are less because the protein may not be eluted due to the size can block binding sites, it cannot leave these binding sites available for the next adsorption/elution cycle. Additionally, some binding sites could be blocked by the protein since it is larger than Cu<sup>2+</sup> ions. Thus, these sites will become inactive for the next adsorption/elution cycle. Furthermore, imidazole bound to Cu<sup>2+</sup> ions after elution will occupy binding sites, which will not be available for the next protein adsorption process, and so on. As a consequence, the efficiency of the chromatographic column will be reduced. According to the aforementioned description, in order to obtain  $k_{disp}$  values to  $n \neq 1$  it is necessary to use the efficiency adsorption process  $\eta_A$ . In the supplementary material the data tables by

**Fig. 7.** Adsorption kinetics constant variation with respect to Reynolds number for BSA adsorption in phosphate solution pH 4.5 and 25°C.**Fig. 8.** Dispersion coefficient  $k_{disp}$  average variation of the BSA protein adsorption process in phosphate solution at pH 4.5 and 25°C with respect to Reynolds number.

pseudo-coefficient and dispersion coefficients ( $k'_{disp}$ ,  $k_{disp}$ ) are available for each flow rate and pH studied, respectively.

The  $k_{disp}$  increased by increasing the flow rate. This behavior is analogous to the one shown by  $k_{ads}$ , the flow rate increases as the dispersion coefficient increases. This behavior could explain that the best adsorption flow rate was 14.0 cm<sup>3</sup>/min. Figure 8 shows the  $k_{disp}$  behavior with respect to the Reynolds number where the  $k_{disp}$  increases exponentially as the flow rate increases. Likewise, the dispersion coefficient at pH of 7.0 is practically the same obtained at pH 4.5 at a flow rate 14 cm<sup>3</sup>/min.

## Conclusions

It is important to point out that our model is not only applicable to proteins such as BSA, but it can also be used for any type of biomolecules, such as enzymes, under similar process conditions. The model is based on the ceramic monolith channels geometry, which plays the role of a skeleton for the chromatographic column. Because the adsorption process takes place only on the adsorbent surface, the mathematical model can easily be extrapolated to microporous material with similar geometry. In addition, it was demonstrated that the model correctly predicts the protein concentration in equilibrium and it

is possible to extrapolate the value in order to determine the optimal agarose matrix performance.

In the resulting adsorption system, pressure drop is low at a flow rate 14.0 cm<sup>3</sup>/min, where the highest amount of protein was obtained. Using this flow rate when increasing the pH value from 4.5 to 7, the adsorption capacity was almost the same. The time required to reach equilibrium decreases as flow rate increases. As the column is reused, the adsorption capacity decreases, regardless of the flow rate used. After 10 reuses ( $n = 10$ ) the adsorption capacity is constant but low and it is necessary to regenerate the monolithic column. Although other columns can be reused many times, it is important to mention that the BSA initial concentration used in this work is high compared with other studies.

The kinetic constant increases exponentially as the flow rate increases and is practically equal to pH 7.0. This behavior could mean that the flow increase helps the stoichiometry of the DA-Cu<sup>2+</sup> chelate, making some adsorption sites available, which might otherwise be blocked at lower flow rates, for example due to protein molecules which were not eluted in previous cycles and which might block the aforementioned sites. This behavior could assume that the increased flow rate promotes stereochemistry chelate IDA-Cu<sup>2+</sup>, making accessible binding sites that possibly at lower flow rates remain blocked, for example with a protein molecules that were not previously eluted and block binding sites.

## Funding

This research was supported by funds from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain), project CTQ2011-24486. We appreciate the research grant BES-2012-052008.

## Supplementary Material

Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website at <https://doi.org/10.1080/00986445.2017.1313243>

## Nomenclature

$A_{mon}$	monolith total surface area (cm <sup>2</sup> )
$a_M$	specific internal cell area of the ceramic monolith (cm <sup>2</sup> /cm <sup>3</sup> )
$B$	parameter defined as per Equation (24) ( $\frac{\text{mol}}{\text{cm}} - \frac{\text{mol}}{\text{cm}^2} + \frac{\text{mol}}{\text{cm}}$ )
$c$	parameter defined as per Equation (20) (mol <sup>2</sup> /cm <sup>4</sup> )
$C_E$	equilibrium concentration of biomolecule in the supernatant (global) (mol/cm <sup>3</sup> )
$\bar{C}_E$	equilibrium concentration of biomolecule in the supernatant (local) (mol/cm <sup>3</sup> )
$C_{E, ads}$	concentration of biomolecules adsorbed on the monolith surface (mol/cm <sup>3</sup> )
$C_{E, ret}$	biomolecule concentration retained on the monolith surface (mol/cm <sup>3</sup> )
$C_o$	biomolecules concentration, initial (mol/cm <sup>3</sup> )
$\bar{C}_{E, int}$	interface biomolecules concentration (mol/cm <sup>3</sup> )
$D$	biomolecule diameter (nm)
$E$	parameter defined as per Equation (22) (cm <sup>2</sup> /s <sup>2</sup> )

$E_M$	bulk porosity (cm <sup>3</sup> /cm <sup>3</sup> )
$K_A$	adsorption equilibrium constant (cm <sup>2</sup> /mol)
$k_{ads}$	adsorption kinetic constant (cm <sup>2</sup> /mol s)
$k'_{ads}$	pseudo-adsorption kinetic constant (cm <sup>2</sup> /mol s)
$k_{des}$	desorption kinetic constant (s <sup>-1</sup> )
$k_{disp}$	dispersion coefficient (cm/s)
$k'_{disp}$	pseudo-dispersion coefficient (cm/s)
$K_D$	desorption equilibrium constant (mol/cm <sup>2</sup> )
$M$	parameter defined as per Equation (21) (mol/s)
$m$	relationship between the volume of the protein solution which is distributed at the monolith interfacial area (cm <sup>3</sup> of solution/area cm)
$n$	number of cycles (d-less)
$Q$	flow rate (cm <sup>3</sup> /min)
$Q^*$	radio channels of the ceramic monolith (cm)
$Re$	Reynolds number (dimensionless)
$t$	time (min, s)
$V$	total volume (cm <sup>3</sup> )
$V_o$	initial volume of biomolecules solution (cm <sup>3</sup> )
$V_{sol}$	biomolecules solution volume (cm <sup>3</sup> )
$x_1$	parameter defined as per Equation (25) (mol/cm)
$x_2$	parameter defined as per Equation (26) (mol/cm)
$\eta_A$	adsorption efficiency (dimensionless)
$\eta_{A0}$	structural efficiency (dimensionless)
$\rho_{BE, n}$	moles of biomolecule per unit adsorption area (mol/cm <sup>2</sup> )
$\rho_{AS}^R$	real amounts of protein that can be adsorbed on the monolith surface (mmol/cm <sup>2</sup> )
$\rho_{AS}^T$	theoretical amounts of protein that can be adsorbed on the monolith surface (mmol/cm <sup>2</sup> )
$\phi$	biomolecule fraction adsorbed (dimensionless)

## References

- Alves-Mourão, C., Pannunzio-Carmignotto, G., and Alves-Bueno, S. M. (2016). Separation of human IgG fragments using copper, nickel, zinc, and cobalt chelated to CM-Asp-agarose by positive and negative chromatography, *J. Chromatogr. B*, **1017**, 163–173.
- Andaç, M., Galaev, I. Y., and Denizli, A. (2016). Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications in biomacromolecule purification, *J. Chromatogr. B*, **1021**, 69–80.
- Armisen, P., Mateo, C., Cortés, E., Barredo, J. L., Salto, F., Diez, B., and Guisán, J. M. (1999). Selective adsorption of poly-His tagged glutaryl acylase on tailor-made metal chelate supports, *J. Chromatogr. A*, **848**(1), 61–70.
- Arvidsson, P., Plieva, F. M., Savina, I. N., Lozinsky, V. I., Fexby, S., Bülow, L., and Mattiasson, B. (2002). Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns, *J. Chromatogr. A*, **977**(1), 27–38.
- Bakhshpour, M., Derazshamshir, A., Bereli, N., Elkak, A., and Denizli, A. (2016). [PHEMA/PEI]-Cu (II) based immobilized metal affinity chromatography cryogels: Application on the separation of IgG from human plasma, *Mater. Sci. Eng. C*, **61**, 824–831.
- Bedair, M., and El Rassi, Z. (2004). Affinity chromatography with monolithic capillary columns: I. Polymethacrylate monoliths with immobilized mannan for the separation of mannose-binding proteins by capillary electrochromatography and nano-scale liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **1044**(1), 177–186.
- Chen, B., Rong, L., Shiyu, L., Chen, X., Yang, K., Chen, G., and Ma, X. (2016). Evaluation and optimization of the metal-binding properties of a complex ligand for immobilized metal affinity chromatography, *J. Sep. Sci.*, **39**, 518–524.

- Choudhury, S., Connolly, D., and White, B. (2015). Supermacroporous polyHIPE and cryogel monolithic materials as stationary phases in separation science: A review, *Anal. Methods*, **7**, 6967–6982.
- Daqiq, L., Fellows, C. M., Bekes, F., and Lees, E. (2007). Methodologies for symmetrical-flow field-flow fractionation analysis of polymeric glutenin, *J. Text. Stud.*, **38**(2), 273–296.
- Fields, S. M. (1996). Silica xerogel as a continuous column support for high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **68**(5), 2709–2712.
- Foose, L. L., Blanch, H. W., and Radke, C. J. (2008). Kinetics of adsorption and proteolytic cleavage of a multilayer ovalbumin film by subtilisin Carlsberg, *Langmuir*, **24**(14), 7388–7393.
- González-Ortega, O., Porath, J., and Guzmán, R. (2012). Adsorption of peptides and small proteins with control access polymer permeation to affinity binding sites. Part I: Polymer permeation-immobilized metal ion affinity chromatography separation adsorbents with polyethylene glycol and immobilized metal ions, *J. Chromatogr. B*, **1227**, 115–125.
- He, M., Chaozhan, W., and Yinmao, W. (2016). Preparation of a novel  $Zr^{4+}$ -immobilized metal affinity membrane for selective adsorption of phosphoprotein, *J. Chromatogr. B*, **1029**, 184–190.
- Jayabharathi, J., Thanikachalam, V., Devi, K. B., and Perumal, M. V. (2011). Binding interaction of bioactive imidazole with bovine serum albumin—A mechanistic investigation, *Spectrochim. Acta, Part A*, **83**(1), 587–591.
- Jungbauer, A., and Hahn, R. (2004). Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology, *J. Sep. Sci.*, **10**, 767–778.
- Kennedy, J. J., Yan, P., Zhao, L., Ivey, R. G., Voytovich, U. J., Moore, H. D., Lin, C., Pogosova-Agadjanian, E. L., Stirewalt, D. L., Reding, K. W., Whiteaker, J. R., and Paulovich, A. G. (2015). Immobilized metal affinity chromatography coupled to multiple reaction monitoring enables reproducible quantification of phospho-signaling, *Mol Cell Proteomics*, **15**(2), 726–739.
- Kennedy, R. T., and Jorgenson, J. W. (1989). Preparation and evaluation of packed capillary liquid chromatography columns with inner diameters from 20 to 50 micrometers, *Anal. Chem.*, **61**(10), 1128–1135.
- Luo, Q., Zou, H., Xiao, X., Guo, Z., Kong, L., and Mao, X. (2001). Chromatographic separation of proteins on metal immobilized iminodiacetic acid-bound molded monolithic rods of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate), *J. Chromatogr. A*, **926**(2), 255–264.
- Luo, Q., Zou, H., Zhang, Q., Xiao, X., and Ni, J. (2002). High-performance affinity chromatography with immobilization of protein A and L-histidine on molded monolith, *Biotechnol. Bioeng.*, **80**(5), 481–489.
- Mallik, R., and Hage, D. S. (2006). Affinity monolith chromatography, *J. Sep. Sci.*, **29**(12), 1686–1704.
- Mao, Q. M., Johnston, A., Prince, I. G., and Hearn, M. T. W. (1991). High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins: CXIII. Predicting the performance of non-porous particles in affinity chromatography of proteins, *J. Chromatogr. A*, **548**, 147–163.
- Martín Del Valle, E. M., Serrano, M. A., and Cerro, R. L. (2003). Use of ceramic monoliths as stationary phase in affinity chromatography, *Biotechnol. Progr.*, **19**(3), 921–927.
- Ngah, W. W., Endud, C. S., and Mayanar, R. (2002). Removal of copper (II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads, *React. Funct. Polym.*, **50**(2), 181–190.
- Pathange, L. P., Bevan, D. R., Larson, T. J., and Zhang, C. (2006). Correlation between protein binding strength on immobilized metal affinity chromatography and the histidine-related protein surface structure, *Anal. Chem.*, **78**(13), 4443–4449.
- Plieva, F. M., Savina, I. N., Deraz, S., Andersson, J., Galaev, I. Y., and Mattiasson, B. (2004). Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles, *J. Chromatogr. B*, **807**(1), 129–137.
- Rezwan, K., Meier, L. P., and Gauckler, L. J. (2005). Lysozyme and bovine serum albumin adsorption on uncoated silica and AlOOH-coated silica particles: The influence of positively and negatively charged oxide surface coatings, *Biomaterials*, **26**(21), 4351–4357.
- Shen, S. S., Yang, J. J., Liu, C. X., and Bai, R. B. (2017). Immobilization of copper ions on chitosan/cellulose acetate blend hollow fiber membrane for protein adsorption, *RSC Adv.*, **7**(17), 10424–10431.
- Sun, X., and Chai, Z. (2002). Urea-formaldehyde resin monolith as a new packing material for affinity chromatography, *J. Chromatogr. A*, **943**(2), 209–218.
- Vega, M. A., Martín del Valle, E. M., Cerro, R. L., and Galán, M. A. (2014). Productivity model for separation of proteins using ceramic monoliths as a stationary phase, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **53**(40), 15456–15466.
- Vereshchagina, T. A., Fedorchak, M. A., Sharonova, O. M., Fomenko, E. V., Shishkina, N. N., Zhizhaev, A. M., Kudryavtsev, A. N., Frank, L. A., and Anshits, A. G. (2016).  $Ni^{2+}$ -zeolite/ferrosphere and  $Ni^{2+}$ -silica/ferrosphere beads for magnetic affinity separation of histidine-tagged proteins, *Dalton Trans.*, **45**(4), 1582–1592.
- Viklund, C., Svec, F., Fréchet, J. M., and Irgum, K. (1996). Monolithic, “molded”, porous materials with high flow characteristics for separations, catalysis, or solid-phase chemistry: Control of porous properties during polymerization, *Chem. Mater.*, **8**(3), 744–750.
- Vunnum, S., and Cramer, S. (1997). IMAC: Nonlinear elution chromatography of proteins, *Biotechnol. Bioeng.*, **54**(4), 373–390.
- Wang, L., Shen, S., He, X., Yun, J., Yao, K., and Yao, S. J. (2008). Adsorption and elution behaviors of bovine serum albumin in metal-chelated affinity cryogel beds, *Biochem. Eng. J.*, **42**(3), 237–242.
- Xi, F., and Wu, J. (2004). Macroporous chitosan layer coated on non-porous silica gel as a support for metal chelate affinity chromatographic adsorbent, *J. Chromatogr. A*, **1057**(1), 41–47.
- Yang, H., Deng, C., and Zhang, X. (2016). Preparation of  $Ti^{4+}$ -immobilized modified silica capillary trapping column for on-line selective enrichment of phosphopeptides, *Talanta*, **153**, 285–294.
- Zabka, M., Minceva, M., and Rodrigues, A. E. (2006). Experimental and modeling study of adsorption in preparative monolithic silica column, *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, **45**(2), 150–160.
- Zhu, J., and Sun, G. (2014). Facile fabrication of hydrophilic nanofibrous membranes with an immobilized metal–chelate affinity complex for selective protein separation, *Appl. Mater. Interfaces.*, **6**, 925–932.