

Bioseparación

Cromatografía de gel

www.elmaky.com
Enero 1997

INDICE

1. Introducción
2. Cromatografía de gel
3. Aplicaciones
4. Bibliografía

1. INTRODUCCIÓN:

La secuencia de operaciones por la que el producto de un bioreactor debe pasar son:

- **Separación de partículas insolubles:** La separación de células o partículas es conveniente para separar las células (ya sea para utilizarlas posteriormente o para romperlas para recuperar productos intracelulares), recuperación y recirculación de células al bioreactor.
 - * Filtración.
 - * Centrifugación.
 - * Sedimentación.
 - * Decantación.
- **Primera separación:** Durante ésta etapa la concentración del producto deseado se incrementa considerablemente, y sustancias de muy diversa polaridad son separadas. Operaciones unitarias:
 - * Extracción del disolvente.
 - * Adsorción.
 - * Precipitación.
 - * Ultrafiltración.
- **Purificación:** Se quitan selectivamente impurezas al mismo tiempo que se aumenta la concentración del producto deseado.
 - * Precipitación fraccional. (La precipitación de una proteína depende del pH)
 - * Cromatografía.
 - * Adsorción.
- **Separación del producto final:** Se debe proporcionar el producto deseado en una forma apta para el consumo o transporte.
 - * Centrifugación.
 - * Secado.
 - * Cristalización.
 - * Liofilización.

A continuación se citan brevemente algunas operaciones unitarias:

- **Filtración:** Se utiliza un medio poroso para retener las partículas insolubles y dejar pasar la solución. Dependiendo del tamaño del poro del filtro se dejarán pasar partículas o células más grandes o más pequeñas.
- **Centrifugación:** Dentro de una centrifugadora se aprovecha que las partículas sólidas se mueven hacia las paredes de ésta debido a la fuerza centrífuga de un campo de velocidades giratorio.
- **Sedimentación:** Cuando la densidad del sólido es mayor que la de la solución se produce la sedimentación del sólido. También puede ocurrir que estos sólidos tiendan a agregarse y no sedimentar, para éstos casos con la ayuda de cationes polivalentes se consigue sedimentarlos.
- **Otras tecnologías en la recuperación de células:**
 - * Flotación.
 - * Deposición electrocinética.

- **Extracción:** Cuando el producto que se desea recuperar es más soluble en otro disolvente que en la solución que sale del bioreactor, se puede utilizar la extracción, teniendo en cuenta que este disolvente y la solución de salida del bioreactor sean insolubles o parcialmente insolubles. En la extracción se aprovecha la diferencia de solubilidad de un soluto en dos disolventes diferentes.
- **Adsorción:** Involucra el paso del soluto a una fase sólida, ya que éste tiene más afinidad por la fase sólida que por la líquida.
- **Precipitación:** La precipitación consiste en añadir un agente precipitante para que cierto o ciertos solutos precipiten.
- **Cromatografía:** Se trata de la introducción de una pequeña cantidad de solución dentro de una columna cromatográfica, separándose en pequeñas cantidades de componentes casi puros.
- **Ósmosis inversa:** La ósmosis ocurre cuando una solución y un volumen de disolvente están separados por una membrana semipermeable. En estas circunstancias se produce la difusión del disolvente, a través de la membrana, hacia la fase de solución, para intentar igualar los potenciales químicos de los solutos en cada una de las fases. Se aplica una presión, a la fase de solución, hasta que la ósmosis se pare, se dice que esta presión aplicada es la presión osmótica. Si esta presión osmótica es superada, el disolvente recorre el camino contrario, es decir, desde la fase solución hasta la fase disolvente.
- **Ultrafiltración:** Tiene el mismo principio que la ósmosis inversa pero con poros de membrana más grandes, dejándose pasar algunas moléculas, pero reteniendo proteínas u otras macromoléculas.
- **Electroforesis:** Es el movimiento de especies cargadas dentro de un campo eléctrico. Se utiliza para la separación de proteínas. Variando el pH del medio se varía la carga de las proteínas por tanto proteínas que por ejemplo a pH 1 tienen carga positiva pueden que a pH 2 tengan carga negativa, lo que permite su separación.

2. CROMATOGRAFÍA DE GEL:

El método de Cromatografía de gel también llamada gel-filtración o coladera-molecular, explota las diferentes propiedades físicas debidas a la diferencia de tamaño molecular. El rango en el que se utiliza este método es en el de pesos moleculares que oscilen entre menos de 100 daltons y 150 millones de daltons. Debido a tener un campo tan amplio de efectividad, este método es muy apreciado entre los bioquímicos. Este método de separación es el de mayor aceptación en la separación de miles de proteínas, ácidos nucleicos, enzimas, polisacáridos y otras biomoléculas. Para el fraccionamiento no se acostumbra a utilizar columnas de una longitud superior a 100cm, siendo de 50cm en el caso de separación de diversos grupos.

Teoría del gel de filtración:

Para la separación se utiliza una parte fija que consta de partículas inertes las cuales contienen pequeños poros que controlan el tamaño. La columna es rellena con partículas de gel con poros de unas determinadas características

La fase móvil (solución) contiene solutos de moléculas de varios tamaños las cuales pasan a través de la fase fija en la columna bajo la influencia de un flujo continuo de solvente.

Las moléculas que son de mayor tamaño que los poros, no pueden difundirse dentro del gel y se sitúan en el espacio que hay entre gota y gota, mientras que las especies más pequeñas penetran el gel y se mueven con mayor lentitud. El volumen de la columna se estrecha rápidamente en su parte inferior, lo cual produce que el soluto atraviese rápidamente esta zona, y hace que el tamaño de la partícula sea directamente proporcional a la velocidad por la que atraviesa esta zona. Las moléculas pequeñas quedan atrapadas dentro del gel o entre las gotas del gel. Se ha de procurar que la separación no este gobernada enteramente por la exclusión molecular producida por el diámetro de poro(o diámetro de fibra si el gel está considerado como un conjunto de entrecruzados de fibra sólida).

En el caso en que predomine la exclusión, la constante de equilibrio se calcula como:

$$K_i = \exp\left[-\pi * L * (r_g + r_i)^2\right]$$

donde: K_i =constante de equilibrio

L =concentración de gel en cm^3/cm^3

r_g =radio del gel

r_i =radio de la especie

Caracterización física de la cromatografía de gel:

Dependiendo del comportamiento del soluto se realizan una serie de divisiones.

Límite de exclusión: se define como la masa molecular de las moléculas más pequeñas que no puedan difundirse al interior de el gel. El límite de exclusión de un gel típico(Sephadex G-50) es de 30.000 daltons. Los solutos con tamaño molecular mayor pasan a través del lecho de la columna sin entrar en los poros del gel.

Rango fraccionario: se denomina así al rango de medida en el cual se utiliza un tipo de gel específico. Sephadex G-50 posee un rango fraccionario de 1500 a 30.000 daltons, las moléculas cuyo tamaño fraccionario se halle dentro de este rango son separadas mediante este gel.

Agua recobrada y lecho volumen: se denomina agua recobrada al peso de agua en 1 gramo de gel seco. Para Sephadex G-50, este valor es de $5 \pm 0,3$ gramos, no incluyendo en este valor el agua de los alrededores de las partículas de gel. El volumen de lecho es aquel volumen final cogido por 1 gramo de gel seco cuando crece en agua. Para el Sephadex G-50, el volumen de lecho es de 9 a 11 mL/gramo de gel seco.

Forma y tamaño de la partícula de gel: Las partículas de gel han de ser esféricas para tener un lecho uniforme con una gran densidad de poros. El tamaño de partículas es

definido como el diámetro de gota(μm). El grado de resolución para una columna junto con el caudal dependerá del tamaño de partícula. Las partículas de gran tamaño(mallas de 50 a 100 y 100 a 300 μm) ofrecen altos caudales, pero una pobre separación cromatográfica. Lo contrario, partículas muy pequeñas(400 mallas de 10 a 40 μm) ofrecen un mayor grado de separación. El tamaño de partícula más usado para tener una buena relación caudal-resolución es de: 100 a 200 mallas con un diámetro de 50 a 100 μm .

Volumen de vacío: Se denomina así el espacio total alrededor de las partículas de gel en una columna empacada. Se determina midiendo el volumen de solvente requerido para separar soluto. Se pueden calibrar las columnas para el volumen de vacío mediante un colorante, el 'blue dextran', el cual tiene una masa molecular media de 2.000.000 de daltons.

Volumen de separación: Es el volumen necesario para separar una partícula de soluto de una columna empacada.

Propiedades químicas de los geles:

Existen cuatro tipos principales de gel: Dextran, poliacrilamida , agarosa, combinado de poliacrilamida-dextran.

1. Dextran: Basado en un polisacárido, fue el primer gel desarrollado. Suministrado por Pharmacia-LKB. Su nombre es el de Sephadex. Este gel es utilizado para las partículas medias, finas y superfinas. Su límite de exclusión no puede ser mayor de 600.000 daltons.
2. Poliacrilamida: Producida mediante una copolimerización. Suministrada por Bio-Rad Laboratories(Bio-gel P). Los límites de exclusión están entre 1800 y 400.000 daltons.
3. Agarosa: Posee la ventaja de tener límites de exclusión muy altos. La estructura del gel está estabilizada por puentes de hidrógeno. La suministra Bio-Rad Laboratories(Bio-gel A), así como Pharmacia-LKB.
4. El poliacrilamida-dextran: También denominada ultragel, permite un gran grado de separación. Se acostumbra a utilizar cuando se trabaja con caudales altos.

Selección de un gel:

La selección de un gel se realiza mediante la división en fracciones de alto peso molecular o de bajo peso molecular. En el caso de tener fracciones de igual o similar peso molecular en la mezcla multicomponente, se habrá de tener en cuenta el rango fraccionario.

Aplicaciones:

1. Purificación de macromoléculas. Este tipo de separación no es caro, es simple y rápido.
2. Purificación de biomoléculas. Es probablemente su utilización más extendida debido a la habilidad del gel para agrupar las moléculas según su tamaño.
3. Para la estimación del peso molecular de las moléculas.

Cromatografía de gel en soluciones orgánicas:

Hasta el momento se ha estado hablando de geles hidrófilos y solventes acuosos. Es de interés conocer que también se han producido geles cromatográficos de solutos no hidrofílicos los cuales pueden ser usados con solventes orgánicos, siendo algunos de estos geles y solventes los siguientes:

Empresa fabricante:	Nombre del gel:
Pharmacia-LKB	Sephacrose CL Sephadex LH
Bio-Rad	Bio Beads S
Dow Chemical	Styragel

Solventes orgánicos: Acetona, Etanol, Dimetilsulfóxido, Dimetilformamida, Tetrahidrofurano, Hidrocarburos clorados y Acetonitrilo.

3. APLICACIONES DE LA CROMATOGRAFÍA DE GEL

La cromatografía de gel se destaca por su importancia en la purificación de proteínas, ácidos nucleicos, enzimas, polisacáridos, y otras biomoléculas. Adicionalmente, esta técnica se puede aplicar en la determinación de pesos moleculares y análisis cuantitativos de interacciones moleculares. Más detalladamente, las principales aplicaciones de la cromatografía de gel son:

- **DESALACIÓN**

Sales inorgánicas, disolventes orgánicos y otras moléculas pequeñas se utilizan ampliamente para la purificación de macromoléculas. Mediante la cromatografía de gel, éstas moléculas pequeñas se pueden eliminar de forma rápida, barata y simple. Un método especialmente atractivo para la desalación de muestras pequeñas (del orden de 0.1 ml o menos) de disoluciones de proteínas o ácidos nucleicos es el uso de columnas giratorias. Estas columnas están empaquetadas con geles de poliacrilamida. Existen de dos medidas, unas que excluyen los ácidos nucleicos de más de 5 pares de bases o proteínas mayores a 6000 daltons, y otras que excluyen ácidos nucleicos de más de 20 pares de bases o proteínas mayores a 30000 daltons.

- **PURIFICACIÓN DE BIOMOLÉCULAS**

Este es el uso más popular de la cromatografía de gel, debido a la habilidad de un gel a fraccionar moléculas en base a su tamaño. La filtración de gel es un método complementario a otras técnicas que separan las moléculas en base a la polaridad y carga.

- ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR

El volumen evacuado para un soluto particular es proporcional al tamaño de la molécula de soluto. Esto indica la posibilidad de estimar el peso molecular de un soluto en base a sus características de evacuado en una columna de gel. Una representación de la concentración de las proteínas vs. el volumen recogido, son los datos obtenidos en un experimento de filtración con un gel. El volumen evacuado, V_e , para cada proteína se puede estimar al realizar la figura. Un gráfica del logaritmo de la masa molecular vs. volumen evacuado para las proteínas en la zona lineal cubre un rango de peso molecular de 10000 a 100000 daltons. Las moléculas por debajo de 10000 daltons no son evacuadas en un volumen evacuado proporcional al tamaño, ya que se difunden en el interior de las partículas de gel y se retarda su salida. Moléculas superiores a 100000 daltons se excluyen desde el gel en el volumen restante.

Una solución de una proteína desconocida se cromatografía en la columna calibrada en condiciones idénticas a aquellas para las que el volumen estándar y evacuado se ha medido. Este método de estimación del peso molecular se usa mucho porque es simple, preciso, barato y rápido. El gel debe ser escogido de tal forma que el peso molecular desconocido está dentro de la zona lineal de la curva. Si la proteína interacciona con el gel por procesos de adsorción o iónicos, el peso molecular estimado será menor que el valor inicial. Se asume que la forma de la molécula desconocida es esférica.

- CROMATOGRAFÍA DE GEL EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

Los geles que se han estudiado son hidrófilos, y el interior de su matriz mantiene su integridad sólo en disolventes acuosos. Para los disolventes no hidrófilos se han producido geles que pueden utilizarse con disolventes orgánicos. Estos disolventes que se pueden utilizar en la cromatografía de gel son etanol, acetona, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, tetrahidrofurano, hidrocarburos clorinados y acetonitrilo. Los nombres comerciales de los diferentes geles son Sepharose CL y Sephadex LH (Pharmacia-LKB), Bio Beads S (Bio-Rad), y Styragel (Dow Chemical).

4. BIBLIOGRAFIA

· J. E. Bailey, D. F. Ollis, *Biochemical engineering Fundamentals*; McGraw Hill Inc, 2nd Edition, 1986.

· R. F. Boyer, *Modern experimental biochemistry*; The Benjamin/Cummings Publishing company, 2nd Edition..