



UNIVERSIDAD
DE ALMERÍA

**Caracterización y aplicación del reactor flujo de
vórtices enfocado a la adsorción y purificación de
proteínas**

Abril 2023



Departamento de Ingeniería Química.
Doctorado en Biotecnología y Bioprocesos Industriales
Aplicados a la Agroalimentación y Medioambiente.

Tesis Doctoral

**Caracterización y aplicación del reactor flujo de
vórtices enfocado a la adsorción y purificación de
proteínas**

**Characterization and application of the vortex flow
reactor for adsorption and purification of proteins**

Autora:

Rosa María Redondo Miranda

Directoras:

María José Ibáñez González

Tania Mazzuca Sobczuk

AGRADECIMIENTOS

Siento que debo agradecerles todo a mis directoras, por su profesionalidad y por su disposición en todo momento, pero también por animarme y hacerme ver que esto era posible. Estoy segura que sin ser vosotras mis directoras no hubiera llegado hasta aquí, millones de gracias.

No me olvido de todas las personas que habéis contribuido de alguna forma a que este documento se haga realidad, familia, amigos y compañeros. Por regalarme tiempo y apoyo, gracias.

Jose a ti, además, te debo una mención especial por las “horas extra como papi”, por aguantar mis nervios, mis dudas y creer en mí, gracias.

Y gracias a ti mi pequeño, por tus te quiero, tus abrazos y tus risas que me dan fuerza para todo lo que la vida me ponga por delante, te quiero mi vida.

RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo principal llevar a cabo el diseño, caracterización y evaluación del reactor de flujo de vórtices (RFV) para su aplicación en la cromatografía de adsorción en lecho expandido (LE) de biomoléculas, específicamente proteínas. El mercado de las proteínas está en continuo crecimiento, especialmente por la creciente demanda del mercado de las proteínas terapéuticas, (como los anticuerpos monoclonales) o las proteínas utilizadas en pruebas diagnósticas (como la β -ficoeritrina, B-PE), estando la sofisticación de sus aplicaciones claramente asociada a su grado de pureza.

Habitualmente, la etapa de purificación incluye un considerable número de etapas previas, con la finalidad de acondicionar el alimento que contiene la proteína según las condiciones requeridas. Esto incrementa significativamente los tiempos de procesado y los costes del proceso, suponiendo entre el 50 y el 80% de los costes totales del bioproducto. Además, disminuye el rendimiento del proceso, ya que las operaciones preliminares pueden repercutir en una pérdida importante del producto. De este modo, la innovación y optimización del proceso productivo para la purificación de proteínas, persigue simplificar el número de etapas, obteniendo productos de alta pureza con altos rendimientos al menor coste posible. Específicamente, se utiliza la cromatografía de adsorción como una tecnología que viene a solucionar los problemas que supone la alimentación de extractos que contienen partículas sólidas o fluidos viscosos.

En las secciones iniciales del cuerpo de este trabajo, apartados 4.1.1 y 5.1, se describe la invención del RFV para su aplicación en procesos de purificación de proteínas. El RFV está formado por dos cilindros concéntricos, entre los cuales se expande el lecho de partículas de adsorbente. El flujo axial facilita la expansión del lecho para mejorar el contacto alimento-adsorbente y la rotación del cilindro interno permite mejorar la fluidodinámica del sistema, para favorecer la transferencia de materia, evitando canales preferentes. La rotación del cilindro interno está siempre por encima de la rotación crítica, a partir del cual en la zona anular se forman vórtices, que son los responsables de la mejora de la eficacia de la adsorción. La rotación del cilindro interno interviene en el número de Taylor adimensional (Ta) y la rotación crítica en el número de Taylor crítico (Ta_c). El reactor de flujo de vórtices en lecho expandido (RFV-LE) trabaja con relaciones $Ta/Ta_c > 1$ para asegurar la formación de los vórtices. El RFV permite la introducción del alimento sin la necesidad de ser pre-tratado, lo cual contribuye a aumentar la eficacia y

rendimiento del proceso.

A continuación, en los apartados 5.2 y 5.3, se caracteriza la fluidodinámica del sistema, centrada en la etapa de adsorción. La relación de aspecto entre la altura del lecho expandido y el espacio anular (entre ambos cilindros del reactor), así como la velocidad de rotación y la velocidad axial del fluido que pueden imponerse al sistema, permiten un ajuste preciso de las condiciones fluidodinámicas. Se persigue identificar, de forma teórica o mediante estudio visual, un régimen de vórtices de Taylor en el lecho, acompañado de un comportamiento flujo pistón del reactor.

Seguidamente, en el apartado 5.4, se caracteriza la transferencia de materia durante la adsorción trabajando en el régimen fluidodinámico establecido.

A continuación, en el apartado 5.5 se realiza la purificación de proteínas en dos procesos que parten de alimentos de características diametralmente opuestas: en un caso se utiliza un extracto concentrado de células rotas para exponer la proteína intracelular (B-PE) al adsorbente, y en el otro, un caldo de cultivo que contiene una baja concentración de anticuerpo extracelular (IgG2a) en un gran volumen de fluido.

Finalmente, se aborda un estudio de viabilidad del RFV (apartado 5.6) y los criterios que se estima necesario considerar para poder escalar el RFV a otros requerimientos de producción (apartado 5.7).

El plan experimental para abordar este trabajo se resume a continuación:

- 1) Diseñar el reactor flujo de vórtices a partir de datos bibliográficos.
- 2) Caracterizar el rango de condiciones de operación que influyen de forma directa en el comportamiento del RFV con el fin de lograr un proceso eficiente con un elevado rendimiento. Para ello se estudian:
 - la estabilidad del lecho expandido,
 - el régimen laminar de vórtices de Taylor de forma teórica y visual,
 - el comportamiento fluidodinámico mediante el modelo de dispersión axial, y
 - la transferencia de materia en la etapa de adsorción.
- 3) Aplicar el RFV-LE para reducir el número de etapas. Se plantea y estudia su aplicación tanto a proteínas intracelulares como extracelulares. Con este fin se realizan dos evaluaciones:
 - a) Evaluación de la eficacia del sistema diseñado en la adsorción de proteínas de

síntesis intracelular, concretamente la proteína B-PE, abordando:

- la producción de B-PE a partir del cultivo de *P. cruentum*,
 - la ruptura celular y extracción de B-PE mediante ciclos de congelación-descongelación,
 - la caracterización reológica del extracto concentrado de B-PE, y
 - la adsorción y elución de B-PE en el RFV mediante el adsorbente Streamline DEAE.
- b) Evaluación de la eficacia del RFV diseñado en la adsorción y purificación de anticuerpos excretados al medio de cultivo, concretamente el anticuerpo IgG2a, abordando:
- la producción del anticuerpo IgG2a a partir de hibridomas de ratón,
 - la determinación del pH de elución del anticuerpo, y
 - la adsorción y elución de IgG2a en el RFV mediante el adsorbente Streamline rProtein A.
- 4) Evaluar la viabilidad operativa del RFV-LE para la purificación de proteínas.
- 5) Analizar el posible escalamiento del RFV para discernir su posible viabilidad.

Los resultados obtenidos muestran que, el RFV diseñado puede trabajar en régimen de flujo de vórtices a velocidades axiales entre 200 y 300 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$, con alturas de lecho expandido entre 20 y 30 cm y relación Ta/Ta_c entre 1,2 y 2,6. Las condiciones de operación, que se establecen para las dos aplicaciones evaluadas, son de una altura del lecho sedimentado de 20 cm, una relación $Ta/Ta_c = 1,5$ y una velocidad del flujo axial de 200 y 300 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$ para la purificación de B-PE y IgG2a, respectivamente.

En definitiva, se demuestra que, la rotación del cilindro interno del RFV, permite establecer un régimen de vórtices de Taylor que favorece la transferencia de materia durante la adsorción y admite utilizar alimentos sin clarificar. La combinación entre la velocidad de rotación y velocidad de flujo axial establecidas, permite ajustar los tiempos de residencia manteniendo un lecho fluidizado estable.

En conclusión, la utilización del RFV reduce el número de etapas previas a la purificación, obteniéndose biomoléculas de alta pureza con altos rendimientos: 78,1% de B-PE con pureza igual o superior al 95% y 93,1% de anticuerpo IgG2a de alta pureza.

ABSTRACT

The main objective of this study is to design, characterise and evaluate the vortex flow reactor (VFR) in order to use it in the adsorption chromatography in an expanded bed (EB) for biomolecules, specifically in proteins. The market for proteins is under continuous development, especially due to the growing demand for therapeutic proteins (such as monoclonal antibodies) or proteins used for diagnostic tests (such as β -phycoerythrin, β -PE) in the market. The sophistication of its applications is clearly associated with its degree of purity.

The purification stage typically includes a considerable amount of previous stages with the aim of conditioning the food containing the proteins to the required conditions. This significantly increases processing times and process costs, representing between 50 and 80% of the total costs of the bioproduct production. In this way, the innovation and optimisation of the productive process for the purification of proteins pursue simplifying the number of stages, obtaining high purity products with high efficiency/yield and the lowest possible costs. Adsorption chromatography is specifically used as a technology that resolves the problems entailed by feeding extracts with solid particles or viscous fluids.

The initial sections of this work's body, sections 4.1.1 and 5.1, describe the invention of the VFR for its application in protein purification procedures. The VFR consists of two concentric cylinders demarcating the area in which the adsorbent particle bed expands. The axial flow facilitates the bed's expansion to better the food-adsorbent contact, and the internal cylinder's rotation improves the system's fluid dynamics, which benefits the matter transfer avoiding preferment channels. The inner cylinder rotation is always above the critical rotation from which vortices form within the annular zone, and they are responsible for improving the adsorption efficiency. The internal cylinder rotation is considered by the dimensionless Taylor number (Ta), and the critical rotation by the critical Taylor number (Ta_c). The expanded bed vortex flow reactor (VFR-EB) works with Ta/Ta_c ratios > 1 to ensure vortex formation. The VFR-EB enables the introduction of foods without prior processing, which increases the efficiency and yield of the process.

Afterwards, in sections 5.2 and 5.3 the fluid dynamics is characterised, focusing on the adsorption stage. The aspect relation between the expanded bed's height and the annular space (between the reactor's cylinders), as well as the rotational speed and axial velocity of the fluid that can oppose the system allow a precise adjustment of the fluid dynamics conditions. The objective is to identify either theoretically or through visual study a Taylor vortex regime in the bed, accompanied by piston-flow behaviour in the reactor.

Next, in section 5.4 the mass transference is characterised during the adsorption while working in the preestablished fluid dynamics regime.

Following this, in section 5.5 the protein purification takes place in two different processes starting from foods with diametrically opposed features: one of them a concentrated extract of broken cells exposing their intracellular proteins (B-PE) to the adsorbent and the other a culture liquid with a low extracellular antibody concentration (IgG2a) in a great fluid volume.

Finally, a VFR viability analysis (section 5.6) and the criteria that are estimated necessary to consider in order to scale up the VFR to other requirements in production (section 5.7) are addressed.

The experimental plan to broach this study is summarised below:

- 1) Design the vortex flow reactor from bibliographical data.
- 2) Characterise the range of operating conditions that influence the VFR's behaviour directly conducive to achieving an efficient process with a profound yield. Therefore, being necessary to study:
 - the stability of the expanded bed,
 - the laminar regime of Taylor vortex, both theoretically and visually,
 - the fluid dynamics behaviour by the axial dispersion model, and
 - the matter transfer in the adsorption stage.
- 3) Apply the VFR-EB to decrease the number of stages. Both intracellular and extracellular proteins are considered and studied. With this purpose, two evaluations are carried out.
 - a) Assessment of the designed system's efficacy on the intracellular synthesis proteins, concretely the protein B-PE, addressing:

- the B-PE production from *P. cruentum* culture,
 - the cellular rupture and B-PE extraction employing freeze-thaw cycles,
 - the rheological characterisation of B-PE concentrated extract, and
 - the adsorption and elution of B-PE in the VFR with Streamline DEAE as adsorbent.
- b) Assessment of the efficacy of VFR designed in the adsorption and purification of antibodies excreted to the culture medium, specifically the antibody IgG2a, broaching:
- the production of antibody IgG2a from mice hibridoma,
 - the determination of the antibody's elution pH, and
 - the adsorption and elution of IgG2a in the VFR by Streamline rProtein A as adsorbent.
- 4) Assess the operational viability of VFR-EB for protein purification.
- 5) Analyze the possible scaling of VFR in order to discern its possible viability.

The obtained results exhibit that the designed VFR is able to operate on vortex flow regimes in axial velocity between 200 and 300 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$, with heights of expanded bed between 20 and 30 cm and T_a/T_{ac} ratio of between 1.2 and 2.6.

The established operating conditions for the two assessed applications are a height of 20cm, a T_a/T_{ac} ratio = 1,5 and an axial flow velocity of 200 and 300 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$ for the purification of B-PE and IgG2a, respectively.

It is definitely demonstrated that the rotation of the internal cylinder of the VFR allows establishing a Taylor vortex regime that favours matter transfer during adsorption and admits non-clarified foods usage. The combination between the established rotational speed and the axial flow velocity allows to adjust of the residence times, maintaining a stable fluid bed.

In conclusion, using the VFR reduces the number of previous stages to purification, obtaining high-purity biomolecules with a high yield: 78.1% of B-PE with a purity equal or superior to 95% and 93.1% of antibody IgG2a of high purity.

Tabla de Contenidos

NOMENCLATURA.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	18
2. ANTECEDENTES	22
2.1. Purificación de proteínas	23
2.1.1. Cromatografía en lecho empacado para la purificación de proteínas.....	26
2.1.2. Cromatografía de lecho expandido para la purificación de proteínas.	28
2.2. Reactor de flujo de vórtices	31
2.2.1. Historia y Fundamentos.....	31
2.2.2. Comportamiento fluidodinámico del RFV en continuo	35
2.2.3. Fabricación industrial del RFV	40
2.2.4. Aplicaciones del RFV en continuo.....	42
2.2.5. RFV enfocado a la purificación de biomoléculas.....	45
2.3. Proteínas purificadas en el RFV en este trabajo	47
2.3.1. Las ficobiliproteínas y los procesos de purificación más comunes.....	47
2.3.2. Los anticuerpos y las técnicas de purificación más comunes.....	51
3. OBJETIVOS.....	55
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
4.1. Equipos	58
4.1.1. Reactor de flujo de vórtices.....	58
4.1.2. Bombas peristálticas	62

Tabla de contenidos

4.1.3.	Colectores de tubos.....	63
4.1.4.	Agitadores.....	63
4.1.5.	Balanzas.....	64
4.1.6.	Centrífugas	64
4.1.7.	Espectrofotómetros.....	64
4.1.8.	Liofilizador	65
4.1.9.	Medidor de pH.....	65
4.1.10.	Viscosímetro.....	66
4.1.11.	Birreactores para el cultivo de microalgas y células animales	67
4.2.	Adsorbentes	69
4.2.1.	Características del adsorbente Streamline DEAE	69
4.2.2.	Características del adsorbente Streamline rProtein A	70
4.3.	Medida de la viscosidad de las muestras de alimento	71
4.4.	Medida de la densidad de las muestras de alimento	72
4.5.	Preparación de disoluciones tampón.....	73
4.5.1.	Tampón de acetato de sodio a pH 5,5 fuerza iónica 50, 250 y 1000 mM	73
4.5.2.	Tampón tris-HCL 50 mM pH 7,5.....	74
4.5.3.	Tampón citrato de sodio 100 mM pH 3, 4, 5 y 6.....	74
4.5.4.	Tampón fosfato de sódico 200 mM pH 7,5.....	75
4.6.	Caracterización del RFV: ensayos de fluidodinámica, transferencia de materia y observación visual	75
4.6.1.	Parámetros de la función de distribución de tiempos de residencia.....	75

Tabla de contenidos

4.6.2.	Coefficiente de dispersión axial.....	79
4.6.3.	Isoterma de adsorción de ASB en la resina Streamline DEAE.....	80
4.6.4.	Determinación de la capacidad dinámica de adsorción en el RFV-F3 entre la resina Streamline DEAE y la proteína patrón ASB.....	81
4.6.5.	Estudio visual de la formación de vórtices y desplazamiento axial de los vórtices en el RFV-F1.....	83
4.7.	Procedimiento para la obtención y purificación de B-PE.....	86
4.7.1.	Cultivo de <i>Porphyridium cruentum</i>	87
4.7.2.	Procedimiento de extracción de B-PE a partir del cultivo <i>P. cruentum</i> ...	88
4.7.3.	Determinación del contenido en sólidos totales	88
4.7.4.	Medida de la eficiencia de extracción de B-PE.....	89
4.7.5.	Determinación de la concentración de B-PE y su pureza.....	89
4.7.6.	Purificación de B-PE en el RFV.....	90
4.8.	Procedimiento para la obtención y purificación del anticuerpo IgG2a	93
4.8.1.	Cultivo de hibridomas de ratón	93
4.8.2.	Determinación del pH de elución de IgG2a en Streamline rProtein A	94
4.8.3.	Purificación del anticuerpo IgG2a en el RFV	96
4.8.4.	Determinación cualitativa de anticuerpos monoclonales	98
4.8.5.	Cuantificación de anticuerpos IgG2a.	99
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	102
5.1.	Diseño del RFV enfocado a la purificación de biomoléculas en LE	103
5.2.	Caracterización del lecho expandido en el RFV.....	104

Tabla de contenidos

5.2.1.	Estudio de estabilidad del lecho expandido formado en el RFV.....	104
5.2.2.	Predicción del régimen fluidodinámico del lecho fluidizado en el RFV mediante correlaciones referenciadas en bibliografía	109
5.2.3.	Estudio visual del régimen fluidodinámico del RFV	113
5.3.	Caracterización del patrón de flujo para el fluido axial circulando a través del RFV-LE	117
5.3.1.	Estudio de la distribución de tiempos de residencia.....	117
5.3.2.	Explicación del patrón de flujo del fluido axial a través del RFV-LE mediante el modelo de dispersión axial.....	122
5.4.	Estudio de transferencia de materia en la etapa de adsorción en el RFV-LE	126
5.5.	Evaluación del uso del RFV en cromatografía de adsorción.....	134
5.5.1.	Aplicación del RFV en la purificación de B-PE a partir de un extracto concentrado de células rotas de <i>Porphyridium cruentum</i>	135
5.5.2.	Aplicación del RFV en la recuperación y purificación del anticuerpo extracelular IgG2a a partir de un cultivo de hibridoma.....	147
5.6.	Evaluación de la viabilidad del RFV en lecho expandido	157
5.7.	Propuesta de criterios de escalamiento del RFV-LE	161
6.	CONCLUSIONES.....	164
7.	BIBLIOGRAFÍA	167

NOMENCLATURA

Abreviaturas	Descripción
APC	aloficocianinas
ASB	albúmina de suero bovino
B-PE	β - ficoeritrina
DTR	distribución del tiempo de residencia
LE	lecho expandido
mAbs	anticuerpos monoclonales
PC	ficocianinas
RFV	reactor de flujo de vórtices
RFV-LE	reactor de flujo de vórtices en lecho expandido
VC	volúmenes de columna

Símbolo en Latin	Descripción	Unidades
[APC]	concentración de APC	$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
[ASB]	concentración de ASB	$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
[ASB] ₀	concentración de ASB inicial	$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
[ASB] _e	concentración de ASB en el sobrenadante	$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
[BPE]	concentración de B-PE	$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
[IgG2a]	concentración de IgG2a	$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
[IgG2a] ₀	concentración de IgG2a alimento	$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
[PC]	concentración de PC	$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
A ₂₈₀	absorbancia a 280 nm	
A ⁵⁴⁵ _{muestra}	absorbancia a 545 nm de la muestra	
A ⁵⁴⁵ _{sobrenadante}	absorbancia a 545 nm del sobrenadante	
A ₅₆₅	absorbancia a 565 nm	
A ₆₂₀	absorbancia a 620 nm	
A ₆₅₀	absorbancia a 650 nm	
A ⁷⁵⁰ _{muestra}	absorbancia a 750 nm de la muestra	
Bi	número adimensional de Biot	
C	concentración	$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
C ₀	concentración inicial	$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
C _b	concentración de biomasa	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
C _{max}	concentración máxima	$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
C _s	contenido en sólidos	$\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Nomenclatura

d	longitud del espacio anular	cm
D_{AB}	coeficiente difusión a través de la capa límite	$m^2 \cdot s^{-1}$
D_{ax}	coeficiente de dispersión axial	$m^2 \cdot s^{-1}$
$D_{cultivo}$	velocidad de dilución	h^{-1}
d_p	diámetro promedio de las partículas	m
D_p	coeficiente difusión en el interior del poro	$m^2 \cdot s^{-1}$
d_{pmin}	diámetro mínimo de las partículas de adsorbente	m
g	aceleración gravitacional	$m \cdot s^{-2}$
H	altura del lecho expandido	cm
H_0	altura del lecho sedimentado	cm
H_1	altura del lecho expandido estabilizado	cm
H_2	altura del lecho expandido en la etapa de adsorción	cm
H_3	altura del lecho expandido en la etapa de lavado	cm
K	coeficiente de consistencia	$Pa \cdot s^n$
k	constante de afinidad de adsorción	
k_f	coeficiente de transferencia de materia externa	$m \cdot s^{-1}$
L	altura del cilindro externo del RFV	cm
M_F	masa tubo Falcon	g
M_{FF}	masa tubo falcon más muestra	g
M_{H_2O}	masa de agua	g
n	índice de flujo	
P	productividad	$g \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$
P_{BPE}	productividad de B-PE	$g \cdot L^{-1} \cdot dia^{-1}$
Pe	número de Péclet	
Pe^*	número de Péclet correlación	
q	capacidad de adsorción	$mg \cdot mL^{-1}$
Q	capacidad dinámica de adsorción	$mg \cdot mL^{-1}$
qmax	capacidad máxima de adsorción	$mg \cdot mL^{-1}$
r_e	radio interno cilindro externo del RFV	cm
Re	número de Reynolds	
Re_p	número de Reynolds partículas	
r_i	radio externo cilindro interno del RFV	cm
S	area de la superficie del espacio anular del RFV	cm^2
Sc	número de Schmidt	
t	tiempo	min
\bar{t}	tiempo de residencia medio	min

Nomenclatura

t_a	tiempo de adsorción	h
Ta	número de Taylor	
Ta _c	número de Taylor crítico	
t_c	tiempo de clarificación	h
t_p	tiempo de procesado	h
U	velocidad del flujo axial	cm·h ⁻¹
u_{mf}	velocidad mínima de fluidización	cm·h ⁻¹
u_t	velocidad terminal	cm·h ⁻¹
ν	viscosidad cinemática de la fase líquida	m ² ·s ⁻¹
V _{ads}	volumen de adsorbente	mL
V _b	Volumen de alimento procesado	mL
V _d	velocidad de deriva	cm·h ⁻¹
V _i	volumen de la disolución de ASB	mL
V _p	volumen del picnómetro	mL
V _v	velocidad de la unidad de vórtices	cm·h ⁻¹
X _{BPE}	fracción de B-PE en la biomasa	

Simbolos Griegos	Descripción	Unidades
Γ	relación de aspectos	
μ	viscosidad dinámica	Pa·s
γ	rapidez de deformación	s ⁻¹
ε	porosidad del lecho expandido	
ε_0	porosidad del lecho sedimentado	
η	relación de radios del RFV	
θ	tiempo adimensional	
ρ	densidad de la fase líquida	kg·m ⁻³
ρ_{H_2O}	densidad del agua	g·mL ⁻¹
ρ_p	densidad de las partículas	kg·m ⁻³
σ^2	varianza del tiempo de residencia	min ²
σ_θ^2	varianza adimensional	
τ	esfuerzo de corte	Pa
ω	velocidad angular	rpm

1. INTRODUCCIÓN

Introducción

Las biomoléculas y especialmente las proteínas son bioproductos altamente requeridos en la industria biotecnológica. Las proteínas aportan propiedades como la actividad enzimática, interacción específica de reconocimiento u otras acciones terapéuticas de gran valor para diferentes sectores como el farmacéutico o el alimentario. Hay más de 200 productos biofarmacéuticos en el mercado, que incluyen: hormonas, factores del crecimiento, vacunas y anticuerpos entre otros (Goey et al., 2018). Con objeto de aumentar la productividad de estos bioproductos, existe un extenso trabajo en las etapas de producción de la biomolécula. La selección de líneas celulares, el uso de la ingeniería genética para su mejora, la optimización de los medios de cultivo, el escalado de los sistemas, los protocolos de cultivo celular mejorados y el empleo de bases de datos ómicas son, hoy en día, tecnologías bien establecidas en la industria biotecnológica. Todo ello permite mejorar la capacidad productiva de los organismos y microorganismos, llegando incluso a superar los límites biológicos (Campos-Pinto et al., 2017).

Dado que, en la mayoría de los casos, la recuperación de las biomoléculas se lleva a cabo a partir de un caldo que contiene una gran cantidad de impurezas y partículas en suspensión, habitualmente, la purificación incluye un considerable número de etapas previas para acondicionar el alimento a las necesidades de la técnica a emplear (Barnfield Frej et al., 1994). Esta característica incrementa enormemente los costes de producción y los tiempos de procesado, así como su rendimiento, ya que las operaciones preliminares pueden repercutir en una pérdida importante del producto. Por este motivo, uno de los objetivos que persigue la innovación y optimización del proceso productivo en la purificación de las proteínas es simplificar el número de etapas para obtener productos de alta pureza al menor coste posible (Spalding, 1991). De este modo, se aumenta la estabilidad y el rendimiento del proceso, manteniendo la calidad y pureza del producto, a la vez que se disminuye el tiempo de procesado, el equipamiento necesario, la pérdida de producto y el coste de mano de obra (Beck, 1999).

En la recuperación de proteínas la técnica de cromatografía de adsorción en columna es de las más comúnmente utilizadas (Chang y Chase, 1996). La molécula de interés circula en el alimento a través de un lecho de partículas de adsorbente. El flujo a través de un lecho empacado tiene comportamiento flujo pistón, lo cual favorece la retención de las moléculas de interés, razón por la cual se trata de una metodología ampliamente utilizada. En la cromatografía de lecho empacado una de las variables más importantes a tener en cuenta es la pérdida de carga a través del lecho. El lecho empacado actúa como un filtro

Introducción

de profundidad donde no solo quedan retenidas las partículas de interés en el adsorbente, sino que también quedan acumuladas células y restos celulares, provocando una disminución de la velocidad del flujo, llegando hasta el bloqueo de la columna. Esta técnica es un claro ejemplo donde es necesaria la clarificación previa del extracto para eliminar la presencia de partículas sólidas. Algunas de las operaciones preliminares más empleadas en este tipo de procesos, como paso único o incluso combinadas, son la centrifugación y la filtración

Una alternativa a la cromatografía en lecho empacado, que surge con el objetivo de eliminar etapas en el proceso de purificación de proteínas, es la adsorción en fase estacionaria en un tanque agitado. En este proceso el adsorbente se pone en contacto directo con la materia prima sin clarificar. Esta opción puede ser interesante cuando la cantidad de producto a recuperar es muy pequeña en proporción al volumen de muestra en el que se encuentra. El inconveniente es que el tanque agitado actúa como una sola etapa de contacto en el proceso de separación, lo que conlleva un tiempo de procesamiento largo (Barnfield Frej et al., 1994). De esta forma, hace falta una mayor cantidad de adsorbente para llegar al mismo grado de adsorción que el que se alcanza mediante cromatografía en columna. Además, el uso del tanque agitado implica una etapa adicional de separación del adsorbente de la materia prima una vez finalizada la etapa de adsorción, dado que para ello se necesita someter a la mezcla a una etapa de filtración o centrifugación.

Otra alternativa es la cromatografía en lecho expandido (LE), donde la materia prima es introducida por la parte inferior de la columna cromatográfica que contiene en su interior el material adsorbente en forma de partículas sólidas finamente divididas. La velocidad del flujo axial debe ser suficiente para lograr la fluidización del adsorbente. El buen funcionamiento de este tipo de sistemas depende en gran medida del estricto control de la fluidización del adsorbente. Los sistemas de cromatografía en LE aportan la posibilidad de trabajar con materias primas con presencia de sólidos y sin la necesidad de ser clarificadas, dado que la pérdida de carga deja de tener un papel protagónico (Gailliot et al., 1990). Sin embargo, el problema ahora no se presenta en el lecho sino en la entrada, debido a la obstrucción del plato poroso por la introducción de células y restos celulares. El plato poroso u otro soporte similar es necesario para mantener el adsorbente dentro de la columna. Otras causas importantes que provocan obtener bajos rendimientos son: la aparición de canales preferente del flujo a través del lecho, el fraccionamiento del lecho

Introducción

o, en el peor de los casos, el colapso del lecho (D'Souza et al., 2017). Además, en este tipo de procesos la retromezcla es inevitable, por lo que la cromatografía en LE se comporta como una columna con un bajo número de etapas de contacto (Barnfield Frej et al., 1994).

Como alternativa a los procesos utilizados tradicionalmente emerge el reactor de flujo de vórtices (RFV). Una de las ventajas de los RFV es que permiten trabajar con multitud de regímenes y condiciones de flujo para llevar a cabo una amplia variedad de procesos tanto químicos como bioquímicos. Esta versatilidad se debe al control preciso de dos variables de operación del reactor (rotación del cilindro interno y velocidad axial) que influyen de forma directa en el comportamiento fluidodinámico del mismo. En la bibliografía hay algunos trabajos que evalúan la viabilidad del RFV en los procesos de adsorción de biomoléculas. Según estos hay dos formas de operar, una consiste en conseguir la fluidización de la resina mediante la alta rotación del cilindro interno (Ma y Cooney, 2004; Moore y Cooney, 1995), donde predomina el flujo rotacional (formación de vórtices) sobre el flujo axial. Esta forma de trabajar presenta dos inconvenientes: la baja carga de adsorbente dentro del reactor (los vórtices tienden a expulsar la resina fuera de ellos) y el aumento de la temperatura del fluido por el calor generado por la elevada rotación del cilindro interno. La otra forma de operar en el RFV consiste en conseguir la fluidización de la resina mediante el flujo axial (Ibáñez-González y Cooney, 2007), siendo el movimiento rotacional suave (con formación de vórtices) el que estabiliza el lecho expandido con velocidades de rotación bajas. Esta segunda forma presenta la ventaja de utilizar una mayor cantidad de resina dentro del reactor y es la base para el diseño del reactor flujo de vórtices en lecho expandido (RFV-LE) aplicado a la adsorción de proteínas como tecnología prometedora. Entre las ventajas que aporta se encuentra la de aunar en una sola etapa la clarificación, concentración y purificación de bioproductos, con las ventajas adicionales de evitar obstrucciones en la entrada del alimento, canales preferentes y retromezcla dentro del lecho expandido.

2. ANTECEDENTES

2.1. Purificación de proteínas

A diferencia de los productos químicos utilizados tradicionalmente, los bioproductos suelen ser moléculas mucho más grandes, que van desde 15 a 200 kDa (Carta y Jungbauer, 2020; Ho y Gibaldi, 2013), y tienen una estructura mucho más compleja que es fundamental para su función biológica.

Uno de los bioproductos con alta pureza más requeridos por la industria biotecnológica son las proteínas, las cuales son las macromoléculas más abundantes y diversas en estructura y función. Su actividad enzimática, interacción de reconocimiento específico y actividad terapéutica, entre otras funciones, las hacen industrialmente muy atractivas. Una de las líneas de aplicación más importantes de las proteínas es como biofármacos (proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales o vacunas), representan el grupo de fármacos con un mayor desarrollo en la industria farmacéutica (Owczarek et al., 2019). Se estima que constituyen alrededor del 10% del mercado de fármacos y se prevé que alcancen una proporción aún mayor en el futuro (Usmani et al., 2017). Actualmente, el mercado de los biofármacos, aumenta con una tasa de crecimiento anual del 13,8%. En 2017, el mercado de productos biofarmacéuticos logró los 186.470 millones de \$ y se pronostica que llegue a los 526.008 millones de \$ en 2025 (Sohail, 2018).

En la última década, se han alcanzado progresos notables en la producción de biomoléculas con productividades significativamente superiores, gracias a los avances realizados en biología molecular e ingeniería genética; también se han mejorado los medios de cultivo, las estrategias para el suministro de nutrientes, control del proceso y el diseño de biorreactores. De esta forma se ha pasado de producciones de unos pocos miligramos a varios gramos por litro (Azevedo et al., 2009; Gottschalk, 2008). En cambio, las técnicas de purificación de biomoléculas no han avanzado al mismo ritmo, provocando que esta etapa se convierta en una etapa crítica para la viabilidad de los procesos de obtención de bioproductos. En muchos casos, la etapa de purificación representa entre el 50 y el 80% de los costes totales del proceso productivo (Guiochon y Beaver, 2011).

En sus inicios, la purificación de proteínas se centraba en las diferencias de solubilidad, mediante el uso de técnicas como la precipitación y cristalización. El primer gran cambio de enfoque en la purificación que se referencia en este campo es el desarrollo de la cromatografía de intercambio iónico, para la separación de aminas de una solución

Antecedentes

(Whintehom, 1923). El término de cromatografía por afinidad es introducido por Cuatrecasas et al. en 1968 en un artículo en el que se describe brevemente la técnica de purificación de enzimas mediante sustratos e inhibidores inmovilizados, convirtiéndose en una pequeña revolución en el área de la purificación de proteínas. Durante los 20 años posteriores a la introducción de la cromatografía el protocolo para la purificación de proteínas se basaba en una combinación de técnicas: la precipitación con sulfato de amonio, uno o dos pasos de intercambio iónico, filtración en gel y, finalmente, un paso de cromatografía de afinidad. De este modo, la cromatografía en general se introduce como una herramienta esencial para llevar a cabo un gran número de procesos de purificación de proteínas (Labrou, 2021). Además, la disponibilidad de diferentes herramientas de cromatografía, que proporcionan selectividades diferentes, hace que sea una técnica poderosa para la purificación de cualquier biomolécula.

Las diferentes técnicas de cromatografía se identifican dependiendo de los mecanismos de separación que utilicen. En la Tabla 2.1. se especifican las técnicas cromatográficas comúnmente utilizadas, los principios de separación y las condiciones de elución que se asocian a cada una de ellas. Todos los tipos de cromatografía pueden ser empleados en el proceso de captura de la biomolécula de interés, tanto de forma individual como secuencial según el proceso.

Tabla 2.1.- Principales técnicas cromatográficas utilizadas en procesos de purificación.

Nombre	Principio de Separación	Elución
Cromatografía de intercambio iónico	Interacciones electrostáticas	Incremento del gradiente de fuerza iónica o cambio de pH
Cromatografía de afinidad	Adsorción específica	Desplazamiento competitivo o cambio de pH
Cromatografía de interacción hidrofóbica	Interacciones hidrofóbicas	Disminución del gradiente de fuerza iónica
Cromatografía de exclusión molecular	Tamaño y forma de la molécula	Isocrático

La cromatografía de intercambio iónico es, generalmente, el primer paso para la separación de proteínas. Se distingue entre el intercambio catiónico o aniónico en función

de la carga de la fase estacionaria. En el intercambio catiónico la fase sólida tiene carga negativa, por eso atrae a las moléculas cargadas positivamente. En el intercambio aniónico los grupos funcionales de la fase sólida están cargados positivamente, por lo que retiene aniones. Este tipo de cromatografía es la más empleada en general (Anspach et al., 1999; Ewert, 2016).

La cromatografía de afinidad utiliza un ligando de afinidad como fase estacionaria para retener el analito de una forma selectiva. El ligando de afinidad puede consistir en una amplia variedad de agentes de unión, que van desde una proteína o una enzima hasta un anticuerpo, un antígeno, etc. Debido a la naturaleza altamente selectiva de muchos ligandos de afinidad se utiliza para aislar moléculas específicas, incluso cuando están presentes en muestras biológicas complejas. Por todo ello, esta técnica es altamente interesante en la purificación de muestras biológicas y agentes biofarmacéuticos (Hage et al., 2012).

La cromatografía de interacción hidrofóbica se basa en la separación de las moléculas en función de las diferencias en su hidrofobicidad superficial. Las proteínas están formadas por aminoácidos que tienen cadenas laterales hidrofóbicas e hidrofílicas, las cuales definen su afinidad con el agua. Esta característica juega el papel principal en el plegamiento de proteínas. Las proteínas se unen a la resina hidrofóbica gracias a su hidrofobicidad, y generalmente requieren una gran concentración de sal (Queiroz et al., 2001).

En la cromatografía de exclusión molecular (también llamada cromatografía de filtración en gel), la separación se realiza en base al tamaño de las partículas o de su peso molecular. Las partículas pequeñas pueden penetrar en los poros de la fase sólida, esto se da en mayor o menor grado en función del tamaño de las mismas. Las partículas más grandes son las primeras en eluir, ya que no pueden penetrar en los poros. La cromatografía de exclusión molecular es una herramienta fundamental en la bioquímica de proteínas, por lo que habitualmente se utiliza en las últimas fases del proceso de purificación de proteínas (Burgess, 2018).

2.1.1. Cromatografía en lecho empacado para la purificación de proteínas

Las primeras columnas de cromatografía se basan en la utilización de un lecho empacado o lecho fijo, el cual suele estar formado por partículas porosas del adsorbente. Estas partículas, generalmente resinas, están formadas por una matriz polimérica porosa que contiene los grupos activos.

El desarrollo de la cromatografía en lecho empacado consiste en una serie de etapas ordenadas de forma consecutiva. Primero, se carga el adsorbente (fase estacionaria), después la columna es acondicionada con una disolución del tampón adecuado, para reemplazar al aire que se sitúa entre las partículas de la resina, y así establecer las condiciones adecuadas para favorecer la adsorción de la molécula objetivo en la matriz cromatográfica. En la segunda etapa, la muestra (alimento) se introduce en la columna, por la parte superior. Idealmente toda la carga de la molécula de interés del alimento queda retenida en la superficie de la fase sólida estacionaria de forma reversible. Posteriormente, se lleva a cabo el lavado de la columna con un tampón (fase móvil), para eliminar cualquier componente que haya podido quedar retenido sin unirse a la superficie del sólido o bien moléculas unidas mediante interacciones débiles. Al introducirse el eluyente (solvente), los solutos se desprenden del sólido y abandonan la columna de forma separada, en función de las interacciones que se produzca con la superficie del sólido y con el eluyente. Habitualmente, se introduce un paso más donde se pasa a través del lecho un tampón de higienización; este ayuda a conservar el sólido cromatográfico y evitar problemas de ensuciamiento. Por último, se vuelve a acondicionar la columna devolviéndola a las condiciones iniciales para poder reutilizarla.

La cromatografía en lecho empacado, bajo condiciones de operación apropiadas, alcanza eficiencias de separación muy altas, de esta forma se logra separar moléculas de mezclas complejas donde hay presencia de otras moléculas muy similares. Además, es un proceso suave, es decir las condiciones en las que se opera no afectan a la viabilidad de las biomoléculas de interés, a pesar de su elevada sensibilidad. Conectando varias técnicas cromatográficas se consiguen procesos muy versátiles. Otra ventaja a tener en cuenta es que logra concentrar moléculas de forma significativa. Y, por último, el equipamiento necesario está disponible fácilmente y, además, hay una gran variedad de adsorbentes en el mercado diseñados y adaptados a las condiciones óptimas de operación (Carta y Jungbauer, 2020).

Antecedentes

Las principales ventajas de las columnas de lecho empacado se deben a que ofrecen un área interfacial extensa para el desarrollo de las interacciones biomolécula-resina y biomolécula retenida-solvente. Esta condición es necesaria para que la transferencia de materia sea buena pero no es suficiente, ya que no garantiza que este contacto realmente se produzca. De hecho, cuando el fluido circula a través de un lecho las partículas de sólido, debido a su heterogénea distribución, pueden ofrecer canales de circulación por los cuales el fluido circule con menor dificultad (canales preferentes), creando así zonas muertas en la columna donde no se produce el contacto o no es eficiente. Si, además, el alimento es una mezcla heterogénea que contiene partículas, estas pueden quedar atrapadas en el lecho, aumentando la caída de presión a través de la columna y promoviendo la aparición de dichos canales preferentes que, como consecuencia, disminuyen la eficiencia del proceso. La acumulación de partículas puede llegar a provocar el bloqueo total del lecho a la entrada del mismo (Chase, 1994). Para resolver este problema, generalmente, se recurre a someter al alimento a una o más etapas de pretratamiento, siendo las más frecuentes la centrifugación y la filtración. El coste y la eficacia de tales métodos dependen, en gran medida, de la naturaleza física del material particulado que se va a eliminar. Las partículas de tamaño submicrónico, suspendidas en un líquido viscoso (por ejemplo, las partículas producidas cuando las células se rompen por procedimientos mecánicos), son particularmente difíciles de eliminar por centrifugación o por filtración. La introducción de etapas preliminares puede resultar en una reducción considerable en el rendimiento del producto, un aumento en el tiempo de procesado, consiguientes pérdidas adicionales por desnaturalización del producto, el aumento del capital y costes recurrentes. En resumen, no solo se encarece el proceso sino que no siempre es posible eliminar las partículas causantes de problemas durante la adsorción en lecho empacado (Barnfield Frej et al., 1994).

A pesar de los inconvenientes mencionados, la cromatografía en lecho empacado sigue siendo la tecnología que con más frecuencia se utiliza en la industria.

2.1.2. Cromatografía de lecho expandido para la purificación de proteínas.

La cromatografía en lecho fluidizado ya se utilizaba desde hace más de medio siglo para la purificación de productos de síntesis química como antibióticos, por ejemplo, estreptomicina y novobiocina (Belter et al., 1973; Murtaugh et al., 1961). A finales de la década de los 80 principios de los 90 aumenta el interés por utilizar la cromatografía en lecho fluidizado para la purificación de biomoléculas, especialmente proteínas a partir de caldos de fermentación sin clarificar (Gailliot et al., 1990). Existe un interés enorme por la cromatografía en columnas de lecho fluidizado para la purificación de proteínas, que aumenta hasta aproximadamente el 2007, para comenzar a disminuir hasta nuestros días. Sin embargo, no ha disminuido el interés en el tema de purificación de proteínas en general, para el cual existen unas 14000 publicaciones al año, mayoritariamente relacionadas con disciplinas afines a la biotecnología (dato obtenido de Web of Science, consultado en febrero de 2022).

En lecho fluidizado se ha demostrado que separa de forma exitosa compuestos de síntesis química, donde se parte de una muestra homogénea. Sin embargo, para mezclas complejas de productos de origen biológico el lecho fluidizado está en desventaja con respecto a el rendimiento de separación alcanzados en lecho sedimentado, donde las condiciones se asemejan más a un flujo pistón (Karau et al., 1997). Se proponen lechos estabilizados magnéticamente, como una alternativa para reducir la elevada mezcla axial en el lecho fluidizado (Burns y Graves, 1985), y se evalúa la implementación de deflectores para dividir el lecho fluidizado (van der Wiel, 1989). Sin embargo, se encuentran problemas de escalado, lo que conlleva la necesidad de equipamiento muy complejo y costoso (Pharmacia Biotech, 1997).

Se observa que los adsorbentes deben tener una mayor densidad y una distribución del tamaño de las partículas que les permita alcanzar una expansión del lecho adecuada y un lecho estable. Esto da como resultado un lecho fluidizado estratificado o clasificado que posteriormente pasa a denominarse lecho expandido (LE), aunque actualmente ambos términos se utilizan sin discriminar uno del otro. Como consecuencia, se han desarrollado nuevos materiales que han hecho que la cromatografía en LE sea mucho más fácil de aplicar, dando lugar a un gran interés científico. A mediados de los 90 se publican los primeros trabajos donde se utiliza la cromatografía en LE para la purificación de proteínas

(Chase, 1994). El trabajo experimental desarrollado, a lo largo de todos estos años en columnas cromatográficas en LE, sienta las bases para la producción de sólidos que se adecuen de la mejor forma posible a esta herramienta. Hasta día de hoy se siguen desarrollando nuevos materiales para lograr un alto rendimiento en las aplicaciones industriales de la cromatografía en LE. La tendencia es utilizar materiales de núcleo sólido denso, para permitir el procesamiento de caudales altos durante todo el ciclo de purificación, sin que sean arrastradas fuera de la columna y, de esta forma, alcanzar mayores productividades (Li et al., 2014).

El primer paso para llevar a cabo la cromatografía en LE es cargar el adsorbente en la columna, posteriormente, hay una primera etapa de estabilización (Figura 2.1). La disolución tampón se introduce por la parte inferior de la columna, ascendiendo hacia la parte superior de la misma. El caudal de entrada debe ser el adecuado para generar la expansión del lecho de la resina. En la parte inferior de la columna se sitúa un plato poroso el cual tiene dos finalidades, por un lado, retener el adsorbente dentro de la columna y, por otro lado, distribuir la corriente de entrada. En la etapa de adsorción o retención de la proteína de interés del alimento, la porosidad del LE o espacio entre las partículas de adsorbente, permite el paso de células y desechos celulares sin bloquear el lecho (Hjorth et al., 1998). Dependiendo de la funcionalidad de la resina empleada se da una interacción específica entre las proteínas de interés y la matriz de la resina favoreciendo su retención, mientras que el resto de bioproductos fluyen hacia la salida de la columna, situada en la parte superior de la misma. Después de la etapa de adsorción se procede a la etapa de lavado con el tampón adecuado, para promover la eliminación de las biomoléculas no deseadas que hayan podido quedar retenidas en el lecho expandido. Finalmente, se inicia la etapa de elución donde, habitualmente, se cambian las condiciones del proceso, el eluyente se introduce por la parte superior de la columna de forma que la etapa de elución se lleva a cabo en lecho sedimentado.

Aunque actualmente esta tecnología es ampliamente utilizada para la recuperación de biomoléculas directamente a partir de cultivos de bacteria, de levaduras, de células animales, extractos de microalgas, leche y cualquier otro tipo de extracto biológico, los estudios reportan la acumulación de partículas, células y agregados celulares en la malla de entrada a la columna. Este inconveniente tiene como resultado el bloqueo parcial de la entrada a la columna, lo que conlleva la formación de turbulencias y una distribución del flujo alterada, dando lugar a la aparición de canales preferentes o zonas muertas (Anspach

et al., 1999; Hubbuch et al., 2002). Para solucionar el problema de bloqueo a la entrada de la columna se han estudiado diferentes soluciones como introducir el flujo a contracorriente, para deshacer el bloqueo, y diferentes tipos de mallas o placas perforadas (Barnfield Frej et al., 1997). También se ha evaluado un cambio de configuración para eliminar la malla o plato poroso (Zafirakos y Lihme, 1999), que consiste en una entrada lateral y un sistema de agitación en la base de la columna pero, igualmente, se observa la presencia de zonas muertas y una disminución del rendimiento del sistema respecto al uso de mallas o platos porosos. Otra opción evaluada es la aplicación de un distribuidor de aspas perforado que gira saliendo el extracto biológico por los orificios (Arpanaei et al., 2008), en este caso se han reportado problemas en la distribución del flujo.

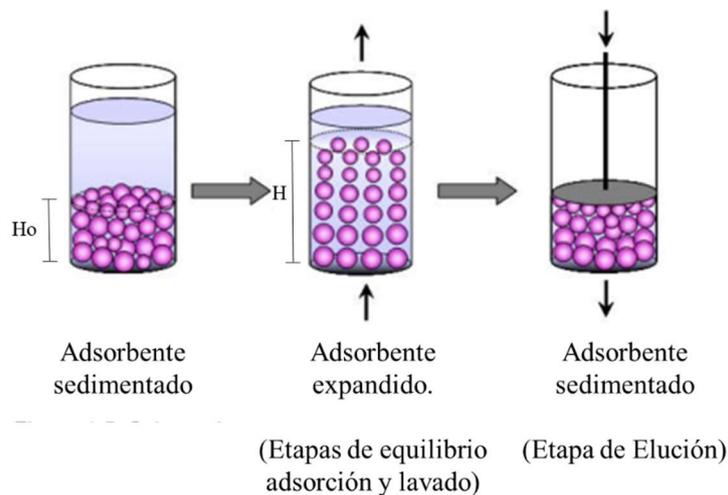


Figura 2.1.- Esquema de las etapas que conforman la cromatografía en lecho expandido.

A pesar de los beneficios que aporta la cromatografía en lecho expandido, los inconvenientes no solucionados y la complejidad de aplicación a escala industrial hacen que, a día de hoy, la cromatografía en lecho sedimentado, mejorada mediante la introducción de resinas macroporosas, siga siendo la metodología más empleada para llevar a cabo la purificación de proteínas. Las resinas macroporosas presentan una estructura porosa con canales interconectados que facilitan el flujo de fluido y permiten caudales elevados. El diámetro y el tamaño del poro pueden ser ajustado de forma independiente en toda la longitud del lecho, para conseguir una mayor área superficial disponible para la adsorción, además de proporcionar una menor pérdida de carga. De

esta forma, se logra el aumento de la capacidad de adsorción de las columnas cromatográficas, para mejorar su rendimiento y el aumento del caudal, que mejora la productividad (Vega et al., 2017).

Otra alternativa, para solventar los problemas asociados a las columnas cromatográficas en LE, es el RFV (RFV-LE). En este tipo de reactores se puede trabajar en LE igual que en una columna, pero en este caso no solo interviene el flujo axial para lograr expandir y estabilizar el lecho, sino que hay una variable más, la rotación del cilindro interno, que ofrece la posibilidad de conseguir una gran cantidad de regímenes de flujo y un ajuste preciso de los mismos (Sczechowski et al., 1995; Vedantam and Joshi, 2006). Los RFV, además, pueden trabajar con alimentos sin clarificar, ya que la entrada del alimento se realiza por un lateral del reactor sin necesidad de incorporar ningún soporte para retener la resina en el interior del reactor, evitando problemas de bloqueo. Otro punto importante es que tampoco se generan canales preferentes o bloqueo del lecho, gracias al movimiento de las partículas que se genera dentro del espacio anular que conforma el RFV (Ibáñez-González y Cooney, 2007). En el siguiente apartado se describe con detalle el diseño, funcionamiento y aplicabilidad del RFV en distintos campos incluyendo la purificación de biomoléculas.

2.2. Reactor de flujo de vórtices

2.2.1. Historia y Fundamentos

El reactor de flujo de vórtices está formado por un cilindro interno y una carcasa cilíndrica externa concéntricos. El cilindro interno y la carcasa externa pueden girar (ω e ω_e , respectivamente) en sentido contrario o de forma conjunta, incluso girar uno solo. El espacio anular (d) es la diferencia entre el radio interno de carcasa externa (r_e) y el radio externo del cilindro interno (r_i), Figura 2.2.

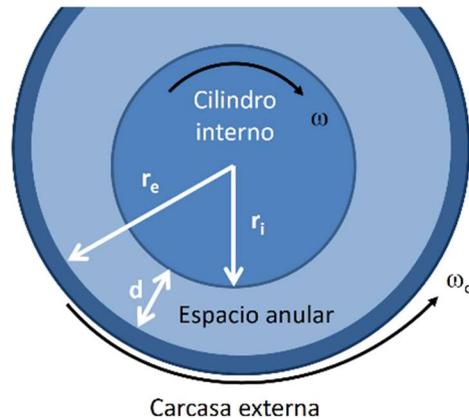


Figura 2.2-. Imagen transversal del reactor flujo de vórtices

El flujo de los fluidos contenidos entre dos cilindros coaxiales se estudia por primera vez por Isaac Newton en 1687 (Archibald, 1729), quien plantea la hipótesis de que el flujo está compuesto de líneas de corriente concéntricas. Stokes en 1848 (Craik, 2005), mediante el uso de partículas de polvo proporciona un método para visualizar el fenómeno descrito por Newton. Además, Stokes propone que la rotación del cilindro interno a altas velocidades de giro, superiores a la velocidad de giro del cilindro externo, da lugar a la producción de remolinos circulares en el seno del fluido contenido entre ambos cilindros. Margules (1881) es el primero en aplicar este conocimiento, y determina que el flujo formado por la rotación de dos cilindros concéntricos que giran podía ser utilizado para determinar la viscosidad de fluidos. Mallock (1888) construye el primer viscosímetro formado por cilindros concéntricos (Figura 2.3.a), dicho sistema se utiliza para determinar la viscosidad del agua. Unos años después, este mismo autor publica otro trabajo con el mismo sistema para determinar la viscosidad de diferentes fluidos (Mallock, 1896).

Couette en 1890 diseña un equipo formado por dos cilindros concéntricos que pueden moverse de forma independiente (Figura 2.3.b). El equipo se diseña para la medida de la viscosidad de un fluido. El autor analiza el comportamiento de un fluido entre dos cilindros concéntricos, donde uno de ellos se mueve. El estudio describe el régimen conocido a día de hoy como régimen de Couette, en el cual un fluido es parcialmente arrastrado por la rotación de uno de los cilindros que lo contienen (Donnelly, 1991). En la Figura 2.4. Se describe gráficamente el flujo de Couette para un sistema formado por un cilindro interno móvil y una carcasa o cilindro externo estático. Debido a las fuerzas

viscosas, producidas por la fricción del cilindro interno, se genera un perfil de velocidades del fluido, que resultan en una serie de capas concéntricas. La velocidad de las capas formadas es mayor en la zona próxima al cilindro interno y va disminuyendo conforme se aproximan al cilindro externo (Schrimpff et al., 2021).

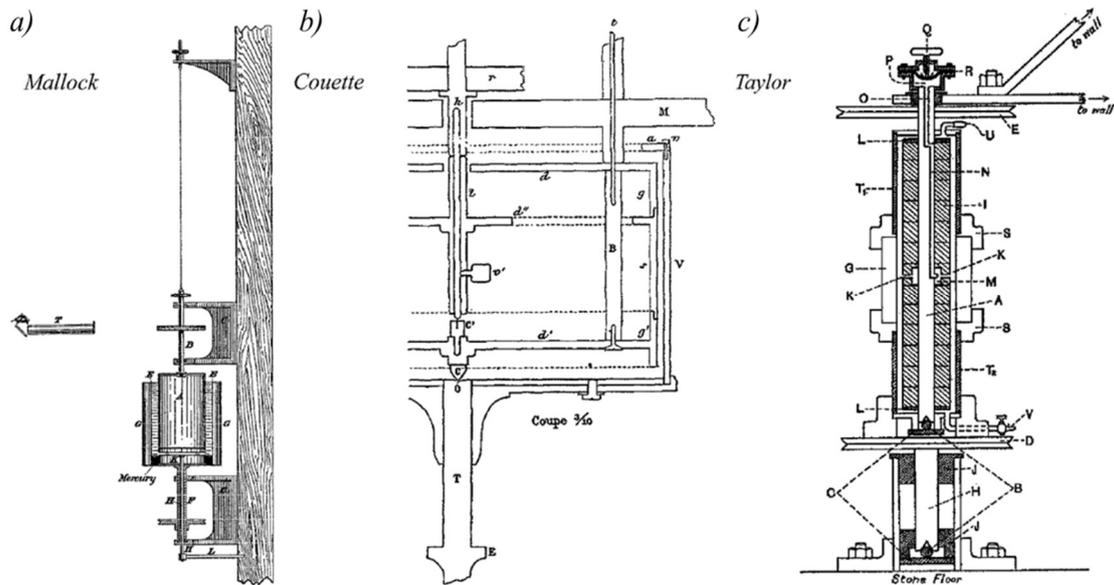


Figura 2.3.- Figuras originales de los primeros sistemas diseñados para el estudio del comportamiento de los fluidos entre dos cilindros. a) viscosímetro de Mallock, donde los dos cilindros pueden rotar (Mallock, 1896, 1888), b) diseño de Couette, en el que los dos cilindros pueden rotar de forma independiente (Couette, 1890) y c) diseño experimental de Taylor en el que ambos cilindros pueden girar de forma independiente (Taylor, 1923).

Taylor (1923) estudia un sistema donde tanto el cilindro interno como el externo pueden girar de forma independiente (Figura 2.3.c). Taylor demuestra que cuando la carcasa externa está quieta por encima de cierta velocidad de rotación del cilindro interno, denominada velocidad de rotación crítica, se genera una inestabilidad. Como consecuencia provoca que el flujo circular de Couette se bifurque formando un conjunto de vórtices contrarrotativos, con forma toroidal, que llenan el espacio anular entre ambos cilindros (Figura 2.5). Este comportamiento recibe el nombre de flujo de Taylor-Couette o simplemente flujo de vórtices de Taylor.

Antecedentes

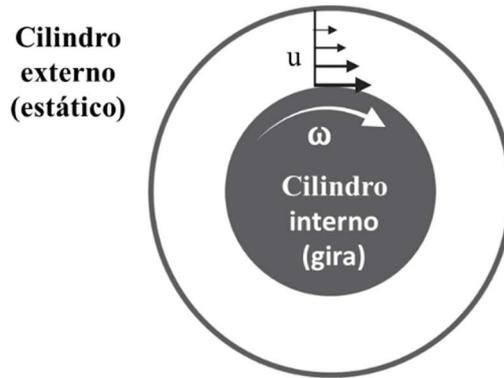


Figura 2.4.- Representación esquemática del flujo de Couette entre dos cilindros concéntricos donde el cilindro externo se mantiene estático mientras el cilindro interno gira a una velocidad angular ω , donde u representa el perfil del gradiente de velocidades formado en el fluido.

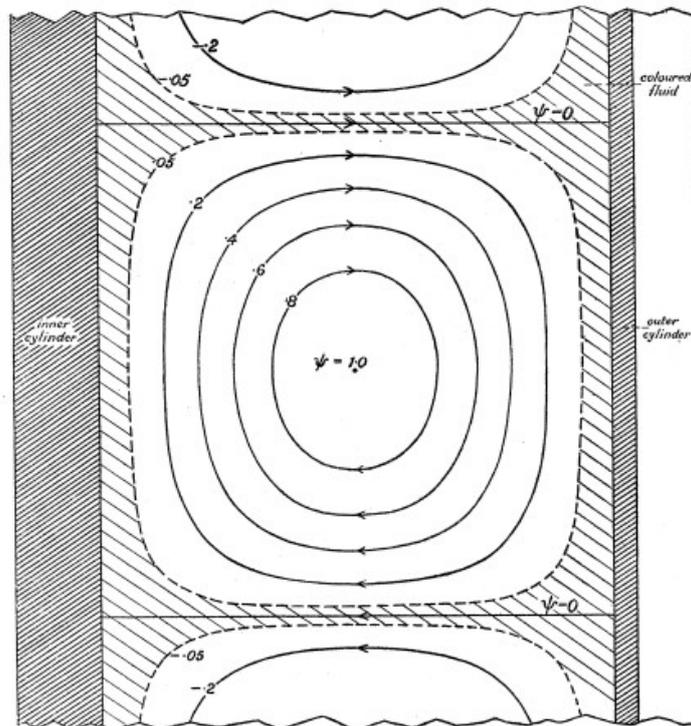


Figura 2.5.- Líneas de trayectoria del movimiento dentro de los vórtices formados tras aparecer la inestabilidad (Taylor, 1923).

2.2.2. Comportamiento fluidodinámico del RFV en continuo

En los RFV que operan en continuo el comportamiento fluidodinámico viene determinado por el número de Taylor y por el número de Reynolds axial.

El número de Taylor (Ta) es un número adimensional que relaciona las fuerzas centrífugas y las fuerzas viscosas, y es especialmente útil, en este caso, para analizar el movimiento que se produce en el fluido en la zona anular, es decir, entre los cilindros concéntricos. Existen diferentes ecuaciones en la literatura para el cálculo de este número adimensional (Schrimpf et al., 2021). Una de las ecuaciones más utilizadas es la ecuación 2.1 para reactores de vórtices en los que la carcasa externa es estacionaria y solo gira el cilindro interno (Richter et al., 2008; Wereley and Lueptow, 1999).

$$Ta = \frac{\omega \cdot r_i \cdot d}{\nu} \quad (2.1)$$

donde d (m) es el ancho anular, r_i (m) es el diámetro del cilindro interno, ω (s^{-1}) es la velocidad angular del cilindro interno y ν ($m^2 \cdot s^{-1}$) es la viscosidad cinemática del fluido empleado.

Para la relación entre las fuerzas de inercia por convección y las fuerzas viscosas generadas por el flujo axial se utiliza el número de Reynolds axial (Re), según se expresa en la ecuación 2.2, donde U ($m \cdot s^{-1}$) corresponde a la velocidad axial superficial y ε es la porosidad del espacio anular ($\varepsilon = 1$ para fluidos y ε entre 0 y 1 para lechos porosos o fluidizados).

$$Re = \frac{U \cdot d}{\nu \cdot \varepsilon} \quad (2.2)$$

En cada RFV existe un valor del número de Taylor por encima del cual no es posible que el gradiente de presión radial y las fuerzas viscosas equilibren los cambios en la fuerza centrífuga, causados por pequeñas perturbaciones en el flujo, haciendo que el movimiento del fluido se vuelva inestable. Este fenómeno se debe a que el fluido cerca del cilindro interno experimenta una fuerza centrífuga mayor que el fluido más cercano al cilindro externo, el cual se mantiene estático. La diferencia de fuerzas hace que el fluido sea impulsado desde la parte interna de la zona anular hacia la parte externa. Al aumentar la velocidad de rotación la fuerza centrífuga aumenta, llegando a ser de la misma magnitud

que la fuerza viscosa estabilizadora del flujo de corte, creando la inestabilidad del flujo. De esta forma se generan los pares de vórtices contrarrotativos, también llamados unidades de pares de vórtices de Taylor o, simplemente, vórtices de Taylor (Figura 2.6). El ancho de los vórtices individuales es aproximadamente igual al espacio anular entre los cilindros cuando el espacio anular es pequeño, es decir, $d/r_i \approx 0$ (Szechowski et al., 1995). Al valor particular del Ta a partir del cual aparecen estos vórtices se le denomina Taylor crítico (Ta_c).

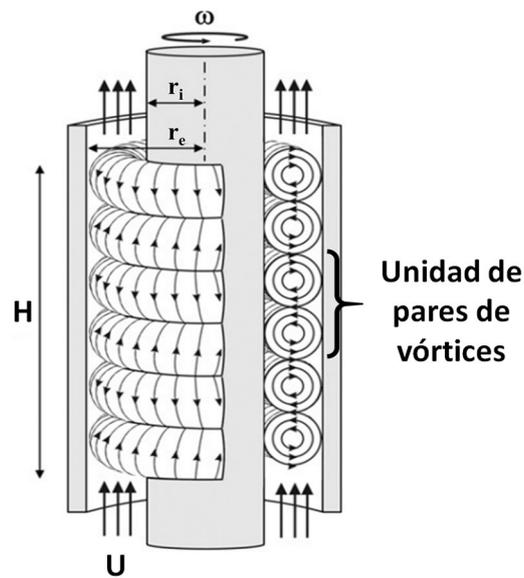


Figura 2.6.- Esquema de los vórtices de Taylor formados en un RFV con flujo axial y rotación del cilindro interno.

Existen diversas correlaciones empíricas y derivadas de la teoría que permiten estimar el valor del Ta_c . Una de ellas es la ecuación 2.3 (Lee y Lueptow, 2001):

$$Ta_c = 41,02 \cdot \left(\frac{d}{r_i}\right)^{-0,5} + 25,75 \cdot \left(\frac{d}{r_i}\right)^{0,5} + 1,85 \cdot \left(\frac{d}{r_i}\right)^{1,5} \quad (2.3)$$

Tal y como se muestra en la ecuación anterior, el valor de Ta_c depende de la geometría del reactor que se utiliza, concretamente del espacio anular y del radio del cilindro interno, por lo que su valor está determinado por el diseño físico del reactor.

Por otra parte, la ecuación 2.1 muestra que Ta varía en función de la velocidad de rotación del cilindro interno y de la viscosidad cinemática del fluido empleado. Esto indica que un mismo reactor puede adoptar diferentes valores de Ta y, por lo tanto, de la relación

Antecedentes

Ta/Ta_c , según la velocidad de rotación del cilindro interno impuesta, así como de las características de los fluidos con los que opera.

La relación Ta/Ta_c y Re permiten estimar el régimen del fluido en el reactor. La relación entre el número de Taylor y el número de Reynolds axial representa la relación entre la aceleración centrífuga y advectiva, que se utilizan para caracterizar el flujo. Cuando Ta es inferior a Ta_c el régimen de fluido que predomina en la zona anular del reactor es laminar de Couette, en cambio, cuando se le superpone un flujo axial el nuevo flujo recibe el nombre Couette-Poiseuille (Sczechowski et al., 1995). Cuando Ta es superior al valor de Ta_c tiene lugar la transición entre el flujo estable de Couette-Poiseuille hacia el flujo de vórtices de Taylor. Esto ocurre a medida que el número de Taylor se vuelve significativamente mayor a Ta_c , debido al aumento en la velocidad de rotación del cilindro interno (Sczechowski et al., 1995), tal y como se muestra en la Tabla 2.2. El flujo de vórtices de Taylor aparece cuando la relación entre Ta y Ta_c se encuentra entre 1 y 15. El flujo de vórtices ondulados o en espiral, aparece para una relación Ta/Ta_c entre 15 y 30 (Kataoka et al., 1975). El flujo se vuelve más turbulento, pero retiene el movimiento del vórtice cuanto el valor de la relación Ta/Ta_c está entre 30 y 160. Dependiendo de la relación de los radios de los dos cilindros concéntricos se produce un flujo completamente turbulento cuando Ta/Ta_c aproximadamente es 250 (Kataoka et al., 1975; Kaye y Elgar, 1958). El tipo de flujo no se ve afectado para valores de Re comprendidos entre 0 y 20.

Tabla 2.2.- Relación entre el valor de Ta/Ta_c y el tipo de flujo que se genera en el RFV (Moore, 1994).

Valor relación Ta/Ta_c	Tipo de Flujo
$Ta/Ta_c < 1$	Laminar Couette-Poiseuille
$1 < Ta/Ta_c < 15$	Laminar de vórtices de Taylor
$15 < Ta/Ta_c < 30$	Vórtices ondulado y en espiral
$30 < Ta/Ta_c < 160$	Vórtices turbulento
$Ta/Ta_c > 250$	Turbulento

Una de las características que hacen interesante el RFV es la posibilidad de trabajar en varios regímenes de flujo en función de los parámetros que se establezcan en el sistema. En la Figura 2.7 se visualiza la transición entre los tipos de flujo que tienen lugar en el

Antecedentes

RFV al ir aumentando, de forma progresiva, el valor de Ta desde régimen laminar vórtices de Taylor hasta flujo turbulento. El flujo de vórtices de Taylor (Figura 2.7.a) es de gran interés, ya que, debido a sus propiedades combina muy buenas condiciones de mezclado con retromezcla limitada (Schrimpf et al., 2021). Majji y Morris (2018) realizan un estudio con una suspensión diluida de partículas con una flotabilidad neutra, para ver el compartamiento de las mismas en la transición del régimen laminar de vórtices de Taylor a vórtices de Taylor ondulados. Las partículas están expuestas a los gradientes de velocidad dentro de los vórtices y a las interacciones con las paredes del RFV. La zona de equilibrio de las partículas se va desplazando desde el centro del vórtice hacia afuera con el incremento de Ta o aumento de la fuerza de los vórtices, que tienden a alejar las partículas de su centro (Figura 2.7.e).

Con valores de Re moderados, que corresponden a velocidades de flujo axial bajas, los vórtices se desplazan en el espacio anular sin producir cambios en su estructura. Al aumentar la velocidad axial se produce una distorsión de los vórtices tomando una geometría helicoidal (Lueptow et al., 1992; Richter et al., 2008).

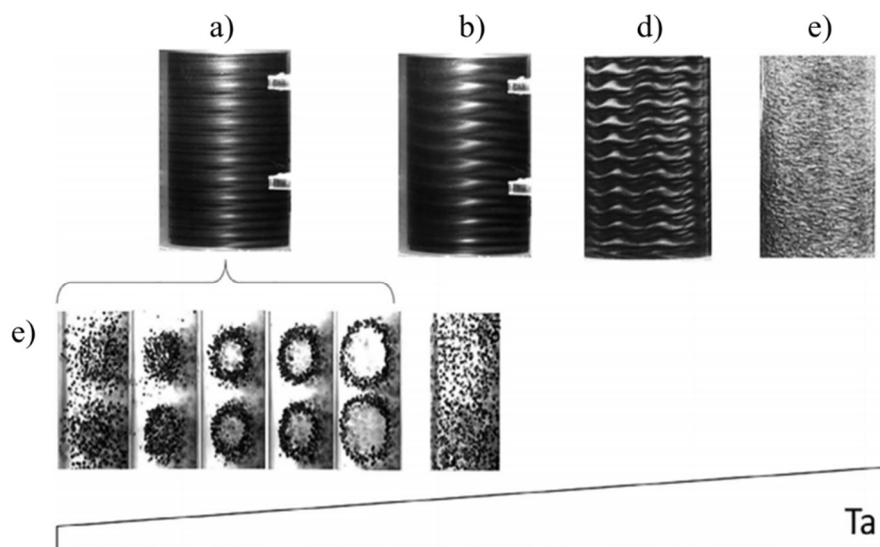


Figura 2.7.- Imágenes de los tipos de flujo más representativos causados por el aumento del número de Ta , alcanzados en un RFV estable. a) flujo laminar de vórtices de Taylor, b) flujo de vórtices ondulados, c) flujo de vórtices turbulento, d) flujo turbulento, e) distribución de las partículas de la resina según la magnitud de Ta .

Antecedentes

En la literatura existen varios trabajos que han relacionado el comportamiento fluidodinámico del RFV en función de los valores de Re y Ta (Giordano et al., 1998; Recktenwald et al., 1993; Snyder, 1962). Wereley y Lueptow (1999) observan que el flujo axial estabiliza el flujo de Couette de tal manera que la transición al flujo de vórtices de Taylor ocurre con un número de Ta más alto que sin flujo axial.

Giordano et al. (2000) establecen que en régimen laminar de vórtices de Taylor, cuando las rotaciones son bajas, los vórtices se mueven a una velocidad próxima o ligeramente superior a la velocidad del flujo axial. En estas circunstancias existe poca retromezcla entre las unidades de pares de vórtices, por lo que RFV se comporta como un reactor flujo pistón. En cambio, para valores de Re bajos, comprendidos entre 0,2 y 1,1 (Giordano et al., 1998), la rotación predomina sobre el flujo axial, los vórtices se mueven a una velocidad por debajo de la velocidad del flujo axial y llega un momento en que, conforme se aumenta la rotación, los vórtices se quedan parados o dejan de moverse en el reactor. En estas circunstancias aumenta la retromezcla entre las unidades de pares de vórtices por el aumento de la rotación y por el movimiento del flujo axial en forma de by-pass bordeando los vórtices. Cuando esto ocurre el RFV se comporta como un reactor mezcla perfecta. A medida que aumenta el valor de Re la velocidad de desplazamiento de los vórtices es menos sensible al cambio de rotación. La elección del número de Ta y Re determina si el comportamiento del reactor es flujo pistón o mezcla perfecta o un régimen intermedio. Así, por ejemplo:

- Ma y Cooney (2004) logran la fluidización de las partículas de adsorbente con velocidades altas de rotación ($Ta = 4667$). La velocidad del flujo axial es baja ($Re = 0,9$) para aumentar el tiempo de residencia. En este caso la adsorción se realiza de forma semejante a un reactor mezcla perfecta.
- Ibáñez-González y Cooney (2007) logran la fluidización con la velocidad del fluido axial ($Re = 2,9$ y $18,2$). La rotación del cilindro interno es baja y no puede fluidizar las partículas, pero sí homogeneizar el LE realizándose la adsorción como si fuese un reactor flujo pistón.

Las necesidades del proceso determinan si se opera en unas condiciones u otras. Cuando se utilizan velocidades de flujo axial bajas y velocidades de rotación altas se aumenta el tiempo de residencia del fluido dentro del reactor, lo cual interesa cuando el proceso a realizar es relativamente lento, mientras que, si el proceso ocurre de forma rápida

conviene minimizar el tiempo de residencia para lograr tiempos de procesamiento más cortos.

Ya en 1975 Kataoka et al. definen que el comportamiento de un RFV como un reactor continuo de flujo pistón ideal se debe al establecimiento de unas condiciones que contribuyen a que los vórtices proporcionen una mezcla radial intensa, pero con poco intercambio axial. De esta forma, los vórtices actúan como una serie de pequeños reactores discontinuos de tipo tanque agitado, los cuales se forman en la parte inferior del RFV y ascienden por el mismo gracias al gradiente de presión axial. El comportamiento de reactor de flujo pistón se puede equiparar a una serie determinada de reactores discontinuos móviles, igual al número de vórtices formados en el RFV (Sczechowski et al., 1995). Desde un punto de vista operativo, cuando el RFV se comporta como un reactor de flujo pistón, la mezcla entre vórtices es baja y se debe evitar la formación de ondulaciones, ya que estas favorecen la mezcla entre vórtices (Ashwin and Mann, 1995).

El número adimensional que se utiliza para estimar si el comportamiento del sistema puede asemejarse al flujo pistón es el número de Péclet, que se define mediante la siguiente ecuación:

$$Pe = \frac{U \cdot L}{D_{ax}} \quad 2.4$$

donde L (m) es la longitud del reactor y D_{ax} ($m^2 \cdot s^{-1}$) es la dispersión axial. Se considera que cuando el fluido tiene un comportamiento equiparable al que tendría en un reactor de tanque agitado ideal el número adimensional de Péclet (Pe) es igual a 0, mientras que para reactor de flujo pistón ideal el número de Pe tiende a infinito (Levenspiel, 2012).

2.2.3. Fabricación industrial del RFV

Existen multitud de estudios en la bibliografía sobre el comportamiento del fluido en el RFV y aplicaciones de este tipo de sistema, pero a pesar de todo el trabajo realizado y de los resultados prometedores obtenidos en muchos casos, a día de hoy el RFV no está sólidamente implantado en la industria. Posiblemente este hecho se deba a la complejidad de su diseño y a las diferencias operativas que presenta respecto a los reactores clásicos. La empresa Laminar (Corea del Sur), fundada en 2010, es una de las pocas empresas que

Antecedentes

fabrican RFV en una amplia variedad de tamaños y especificaciones, desde escala laboratorio (0,02 L) a gran producción (10000 L), con alto grado de automatización y control (Figura 2.8). Según su propia página web es el primer reactor comercial que opera en régimen laminar de vórtices de Taylor (Laminar, 2022).

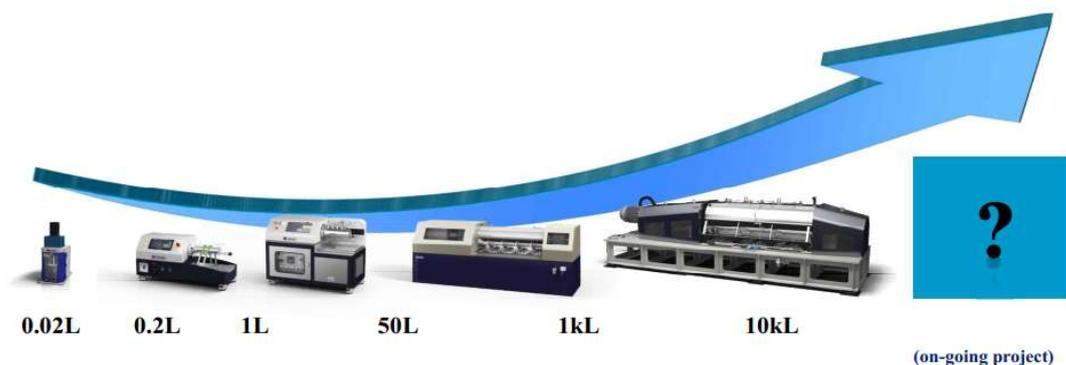


Figura 2.8.- Equipos patentados y basados en la tecnología del flujo de vórtices Taylor, fabricados por la empresa Laminar (Laminar, 2022).

Laminar posee 18 patentes registradas a nivel global para 26 aplicaciones comerciales y de laboratorio de sus reactores. Sus equipos se distribuyen en universidades, laboratorios gubernamentales e instalaciones corporativas de I+D en Estados Unidos, Francia, Alemania, Arabia Saudí, Japón y Corea del Sur. En Europa el distribuidor oficial es Analytik Jena GmbH (Reino Unido).

El flujo laminar de vórtices de Taylor genera zonas de micro-mezclado homogéneo de forma que no hay zonas muertas en el interior del reactor. De esta forma se logra una mezcla 7 veces mayor y una transferencia de materia 4 veces mayor comparando con los resultados que se obtienen en reactores convencionales. Una de las aplicaciones para las que comercializan los RFV es para la producción de partículas. Las partículas que obtienen tienen una alta pureza, uniformidad de forma y tamaño y un rendimiento de conversión de los reactivos superior o igual al 95%. La empresa asegura que reducen los tiempos de los ciclos de reacción y que la capacidad productiva aumenta de entre 2 y 100 veces comparado con los reactores tradicionales.

Las aplicaciones para las cuales la empresa Laminar comercializa sus reactores se pueden ver en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3.- Aplicaciones de los reactores fabricados por la empresa Laminar (Laminar, 2022).

Sector	Producción
Farmacéutico	Medicamentos
	Síntesis de proteínas
	Enzimas
Alimentario	Aditivos proteicos
	Aminoácidos
	Materiales alimentarios funcionales
Petroquímico	Separación de isómeros
Química fina	Colorantes
	Surfactantes (detergentes, emulsionantes)
Electrónica y Semiconductores	Baterías secundarias
Medioambiente	Recuperación de productos químicos de alto valor
	Tratamiento de aguas

2.2.4. Aplicaciones del RFV en continuo

El hecho de que el RFV aporte una variable operacional extra (la rotación del cilindro interno) sobre los sistemas tradicionales, brinda la posibilidad de operar en diferentes regímenes de flujo, con un control efectivo de las propiedades de transporte de materia y calor, una distribución del tiempo de residencia controlable y una mezcla suave pero eficiente. Por lo tanto, se puede ajustar a una fluidodinámica concreta de forma muy precisa según las necesidades deseadas para una tarea específica. Si bien el diseño y el control del reactor flujo de vórtices son más sofisticados que los diseños de reactores tradicionales, resulta comparativamente ventajoso dado el amplio rango de aplicaciones

Antecedentes

en los que permite su utilización (Schrimpf et al., 2021), algunas de ellas referenciadas y otras, como la de este trabajo, aun sin explorar .

En la Tabla 2.4 se detallan las principales aplicaciones en las que se emplea el RFV en continuo, las ventajas comparativas que aporta a estos procesos y sus respectivas referencias bibliográficas.

Tabla 2.4.- Recopilatorio de algunas de las principales aplicaciones en las que se han evaluado en los RFV.

Aplicación	Descripción	Referencia bibliográfica
Reacciones homogéneas catalizadas	<ul style="list-style-type: none"> - El control preciso del tiempo de residencia beneficia a este tipo de reacciones ya que comúnmente son más largos y les favorece una retromezcla baja. - El ajuste de la retromezcla influye en el perfil de concentraciones a lo largo del eje del reactor, lo que permite la optimización del proceso. 	<ul style="list-style-type: none"> (Behr y Färber, 2015) (Färber et al., 2016, 2015)
Reacciones fotocatalíticas	<ul style="list-style-type: none"> - La alta uniformidad de la mezcla en el espacio anular permite la formación de una suspensión uniforme de partículas heterogéneas, haciendo posible el acceso a una única fuente de radiación. - Se han desarrollado procesos para el cultivo de microalgas y para el tratamiento de aguas a través de procesos fotocatalíticos. 	<ul style="list-style-type: none"> (Dutta y Ray, 2004) (Gao et al., 2015) (Kong et al., 2013) (Ray, 1999) (Sengupta et al., 2001) (Subramanian y Kannan, 2010)
Bioreactores	<ul style="list-style-type: none"> - La baja fuerza de cizallamiento generada en comparación con la agitación convencional hace que sea una tecnología muy interesante cuando hay material sensible (por ejemplo, células o soportes inmovilizados). - Estas características lo hacen muy interesante tanto para el cultivo de células animales como para llevar a cabo reacciones enzimáticas. 	<ul style="list-style-type: none"> (Ameer et al., 1999) (Ferreira et al., 2007) (Hubacz et al., 2013) (Manikandan et al., 2021) (Masuda et al., 2013) (Resende et al., 2005, 2004) (Zhu et al., 2010)

Antecedentes

Cristalización	<ul style="list-style-type: none">- La uniformidad de las condiciones fluidodinámicas dentro del reactor hace que se den unas condiciones favorables para la formación de cristales de un tamaño controlado. (Aljishi et al., 2013) (Kim y Kim, 2017) (Kim et al., 2014) (Nguyen y Kim, 2017) (Park y Yang, 2015)
Síntesis de polímeros	<ul style="list-style-type: none">- La mezcla interna de los vórtices y la elevada relación superficie-volumen favorecen el desarrollo de reacciones altamente exotérmicas. (Kádár et al., 2010)- El control exhaustivo de las condiciones fluidodinámicas junto con las bajas fuerzas de cizallamiento dan lugar a una distribución del tamaño de las partículas ordenado, generando un producto de tamaño homogéneo. (Kataoka et al., 1995) (Liu et al., 2011) (Wei et al., 2001)
Agregación y floculación de sólidos	<ul style="list-style-type: none">- La baja fuerza de cizallamiento favorece el control del tamaño de las partículas o flóculos formados. (Alamer et al., 2020) (Park y Yang, 2015) (Tran et al., 2016)
Formación de partículas	<ul style="list-style-type: none">- Se emplea en la producción de partículas para baterías, microláminas de grafeno, formación de floculos, coagulados, etc. (Vlieghe et al., 2014) (Yu et al., 2011)
Alimentaria	<ul style="list-style-type: none">- La buena transferencia de color y el mezclado eficiente con bajas fuerzas de cizallamiento hacen este reactor muy interesante para diferentes aplicaciones en la industria alimentaria. (Giordano et al., 2000) (Hubacz et al., 2017)- Se han desarrollado procesos de gelatinización del almidón, desinfección de zumo por ultravioleta, isomerización enzimática de glucosa-fructosa, entre otros. (Milly et al., 2008)

El presente trabajo cubre un nicho que ha sido levemente abordado en literatura como es la purificación de proteínas en el RFV, donde la versatilidad del mismo puede ser puesta a prueba para la recuperación de proteínas tanto de producción intra como extra celular.

2.2.5. RFV enfocado a la purificación de biomoléculas

A principios de los noventa Moore (1994) publica el primer trabajo del RFV utilizado para la adsorción de biomoléculas. El RFV incluye una variable extra de operación respecto a las columnas de lecho expandido, la velocidad de giro del cilindro interno, que provoca la expansión del lecho del adsorbente Streamline DEAE. La velocidad del flujo axial puede ser modificada de forma independiente para ajustar el rendimiento del proceso (Giordano et al., 1998), lo que le permite a Moore trabajar con flujos axiales bajos, algo que es muy difícil de conseguir en reactores de lecho fluidizado. De esta forma, Moore evalúa la capacidad dinámica de adsorción del RFV utilizando curvas de ruptura de la proteína de albúmina de suero bovino (ASB). Se observa que la adsorción de proteínas está limitada por la transferencia de masa externa, entre el fluido y el adsorbente, una condición que habitualmente limita el rendimiento del reactor. Sin embargo, el rendimiento de la adsorción en el RFV se puede ajustar aumentando la fracción de volumen de partículas utilizadas hasta un 50%. La formación de los vórtices da lugar a múltiples etapas de contacto, cuando opera en régimen de flujo de vórtices de Taylor, lo que aumenta la eficiencia de la adsorción (Moore y Cooney, 1995). Según los datos obtenidos se logra superar el rendimiento de un lecho fluidizado tradicional, aproximándose al rendimiento de un lecho empacado. El inconveniente es que el flujo axial puede causar el arrastre del adsorbente provocando problemas de bloqueo de la membrana de nailon situada a la salida del reactor.

Para evitar los problemas de arrastre de la resina Ma y Cooney (2004) disminuyen la velocidad del flujo axial ($33 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$) y diseñan una salida del reactor en la parte superior del mismo que ocupa toda la zona anular, disminuyendo la velocidad axial de salida y evitando que las partículas de adsorbente sean arrastradas. En este estudio se emplea el RFV para la purificación de $\alpha 1$ -antitripsina recombinante humana a partir de un cultivo de *Escherichia coli*. Las partículas de resina fluidizadas por la velocidad de rotación del cilindro interno (330 rpm) solo ocupan un 5% del volumen total del reactor, lo que da lugar a una productividad muy baja. En este diseño, al igual que en el de Moore (1994), se utiliza una membrana de nailon a la salida del reactor con el objetivo de retener el adsorbente, evitando que salga fuera del reactor arrastrado por la propia fuerza de los vórtices. El inconveniente de la utilización de la membrana de nailon a la salida es que imposibilita el uso de fluidos con partículas sin previa clarificación ya que estas taponan

Antecedentes

la membrana bloqueando la salida del reactor. Para solucionar el problema de bloqueo de la membrana de nailon situada en la salida del reactor Ibáñez-González y Cooney (2007) cambian las condiciones de trabajo del RFV para evitar el arrastre del adsorbente (Figura 2.9). En este caso es el flujo axial quien provoca la expansión del adsorbente y no la rotación del cilindro interno como en los casos anteriores. En estas condiciones el adsorbente no es arrastrado, por lo que se elimina la membrana de nailon a la salida del RFV. Debido a que el reactor tiene solo una longitud de 14,7 cm, la adsorción en LE es solo eficiente a una velocidad axial de $100 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ pero con productividades bajas. Para aumentar la productividad y trabajar de forma eficiente para velocidades axiales más elevadas (200 y $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$) se necesita aumentar la longitud del RFV. Una de las ventajas que aporta trabajar en LE en el RFV, enfocado a los procesos de purificación de biomoléculas, es que debido a la alta porosidad que se da en el lecho expandido no existe la necesidad de someter el caldo de cultivo a un pre-tratamiento para eliminar las partículas que pueda contener. Mientras el producto deseado es adsorbido y retenido por el adsorbente, las células, restos celulares o cualquier otra partícula que contenga el medio de cultivo, pasa a través del lecho saliendo fuera del reactor. La reducción de las etapas del proceso conlleva una reducción de los costes operativos y una disminución de las pérdidas de producto. Además, la agitación provocada por la rotación del cilindro interno tiene una fuerza de cizallamiento baja, comparada con los sistemas de agitación convencionales, lo cual es especialmente importante cuando hay presencia de células o partículas sensibles en el fluido (Giordano et al., 1998).

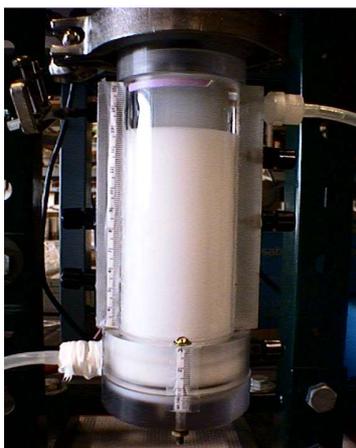


Figura 2.9.- Imagen del RFV utilizado por Ibáñez-González y Cooney (2007) con una altura del LE de 12 cm.

2.3. Proteínas purificadas en el RFV en este trabajo

Las proteínas pueden ser acumuladas en el interior de las células o bien ser excretadas al medio, de este modo se pueden clasificar como intracelulares o extracelulares. Esta clasificación es muy importante a la hora de definir su recuperación, ya que precisa el material de partida para el cual se debe diseñar el proceso de obtención y purificación de las proteínas.

Cuando se trata de proteínas intracelulares el primer paso será extraerlas de la célula para que estén accesibles para su interacción con el adsorbente empleado en la purificación. De este modo se obtendrá un caldo de cultivo con la proteína de interés fuera de la célula y una gran cantidad de restos celulares, formados por partículas sólidas de diferentes tamaños. En cambio, esta etapa no será necesaria cuando ya se encuentren excretadas al exterior de la célula, economizando pasos del proceso.

A continuación, se describen las dos proteínas que se emplean en este trabajo: la β -ficoeritrina (B-PE) y el anticuerpo IgG2a. Se han seleccionado por sus características interesantes en la industria biotecnológica, como se expone más adelante, pero también porque proporcionan la posibilidad de experimentar con una proteína intracelular, como es la B-PE, y una extracelular, como es el anticuerpo monoclonal IgG2a.

También se incluye en el próximo apartado información sobre las técnicas habitualmente empleadas para su purificación y qué ventajas aporta el empleo del RFV como novedad en este proceso.

2.3.1. Las ficobiliproteínas y los procesos de purificación más comunes

Las microalgas, macroalgas y cianobacterias son organismos fotosintéticos que pueden encontrarse tanto en ambientes salinos como en aguas dulces. Estos han sido reconocidos como valiosas fuentes de carbono, con aplicación en la alimentación humana y animal (Torres-Tijji et al., 2020), también se utilizan en la biorremediación, para la producción de compuestos de alto valor añadido (Costa et al., 2020) y productos biofarmacéuticos (Chew et al., 2017), entre otros. De la extensa gama de productos de alto valor que pueden ser producidos por estas células, algunos de los más interesantes son los pigmentos,

Antecedentes

lípidos, ácidos grasos, proteínas, polisacáridos y compuestos fenólicos (Stengel et al., 2011).

Las ficobiliproteínas son una familia de proteínas pigmentadas que actúan como pigmentos accesorios fotosintéticos en diversas microalgas, algas y cianobacterias, las algas rojas y las cryptomonadales. Los pigmentos naturales presentes en las biliproteínas son de especial interés. Estos pigmentos naturales se utilizan en la industria farmacéutica, además de utilizarse como colorantes proteicos en la industria alimentaria y cosmética (Sekar and Chandramohan, 2008). Aunque algunos autores señalan que el principal potencial de las biliproteínas es su uso como colorantes naturales (Spolaore et al., 2006), hay cada vez una cantidad mayor de investigaciones que ha demostrado además sus propiedades beneficiosas para la salud, lo que ha promovido que se plantee una amplia gama de aplicaciones farmacéuticas (Gaignard et al., 2019).

Las ficobiliproteínas se clasifican en tres grupos en función de sus características espectroscópicas tal y como se puede ver en la Tabla 2.5 (Bermejo et al., 2003).

Tabla 2.5.- Clasificación de las ficobiliproteínas y caracterización según color, cromóforos y máximos de absorción.

Nombre	Color	Cromóforo	Máximos de adsorción (nm)
Ficocianina	Azul	Ficocianobilina (PCB)	610-620
Alocianinas	Azul	Ficocianobilina (PCB)	650-655
Ficoeritrinas	Rojo	Ficoeritrobilina (PEB)	540-570

La ficoeritrina, que es roja y fluorescente, se puede utilizar en ensayos de inmunidad basados en fluorescencia y como marcadores no radiactivos en microscopía y ensayos de ADN (de Jesus Raposo et al., 2013). La B-PE es una macromolécula biológica soluble en agua que está compuesta por subunidades α y β , las cuales son cadenas polipeptídicas de aproximadamente 17-20 kDa con una estequiometría 1: 1, así como un tercer tipo de polipéptido con una masa molecular aparente de 30-33 kDa llamada γ -subunidad (Swanson y Glazer, 1990). La conformación nativa de la ficoeritrina es la de agregados $(\alpha\beta)_6\gamma$ en forma de disco muy estables que forman parte de los ficobilisomas (Wilbanks and Glazer, 1993). Las conformaciones estructurales de B-PE dependientes del pH al

Antecedentes

que han sido extraídas de *P. cruentum* han sido determinadas por Camara-Artigas et al. (2012), representada en la Figura 2.10.

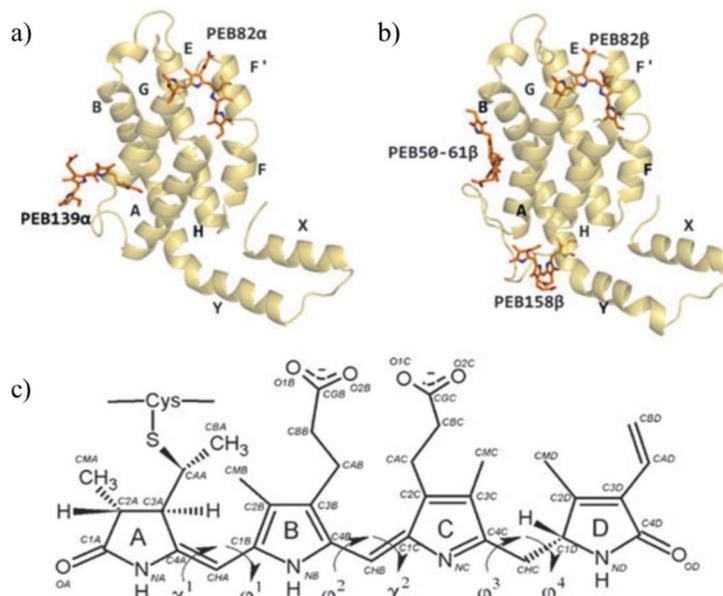


Figura 2.10.- a) y b) Representación en cinta de la cadena de B-PE obtenida de *P. cruentum*
a) cadena α b) cadena β c) molécula de B-PE (Camara-Artigas et al., 2012)

La microalga unicelular *Porphyridium* pertenece a la familia Porphyridiaceae, vive en agua de mar, agua salobre y agua dulce y suelo húmedo (Li et al., 2019). De las nueve especies documentadas de *Porphyridium*, *Porphyridium cruentum* ha sido ampliamente estudiada como especie modelo. Esta alga roja puede acumular compuestos de alto valor como B-PE, ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) y polisacáridos intracelulares, muy importantes en la alimentación, cosmética y medicamentos (Dvir et al., 2020). La B-PE muestra varias actividades biológicas interesantes como es actividad antioxidante, antitumoral y la mejora de la inmunidad (Li et al., 2019). Además, la B-PE está ampliamente reconocida como un pigmento rojo anaranjado raro en la naturaleza debido a su fuerte coloración y actividad antioxidante similar a la de la ficocianina azul de *Spirulina* (Li et al., 2021).

Actualmente la B-PE se utiliza ampliamente como colorante fluorescente para citometría de flujo y tinción inmunofluorescente (por ejemplo, Invitrogen, Columbia Bio-sciences,

AnaSpec). La B-PE absorbe luz en un amplio rango de longitudes de onda del espectro visible y transfiere la energía de excitación, mediante procesos no radiactivos, hacia los centros de reacción, localizados en las membranas fotosintéticas, donde se convierte en energía química (Glazer et al., 1976). Esta característica es la que hace que sea interesante como marcador fluorescente en análisis celular, en inmunoensayo o en histoquímica (Kronick y Grossman, 1983). El precio de mercado de la B-PE de alta pureza ($A_{545}/A_{280} > 5.0$) está alrededor de los 741,6 \$/mg (Li et al., 2021).

A mediados de la década de los 70 se publicaron los primeros trabajos donde se lograba una purificación exitosa de las biliproteínas (Gantt y Lipschultz, 1974). Se evalúa la purificación de esta biomolécula bien por doble electroforesis en gel de acrilamida, por centrifugación en gradiente de sacarosa y por filtración en columna de Sephadex G-200 seguida de electroforesis en gel de acrilamida.

Las ficobiliproteínas son proteínas intracelulares, por lo que el primer paso para llevar a cabo la purificación de estas debe incluir la ruptura celular. Para ello se utilizan diferentes técnicas, la más común utiliza ultrasonidos (Bermejo et al., 2001, 1997), pero también se utiliza acetona (Hilditch et al., 1991), rivanol (Tcheruov' et al., 1993), medios mecánicos (Galland-Irmouli et al., 2000) y tratamiento con lisozimas (Jung y Dailey, 1989). En general, el método para la obtención de la ficobiliproteína purificada incluye una combinación compleja de múltiples pasos y difíciles de escalar (Ficner et al., 1992; Grabowski y Gantt, 1977; Tang et al., 2016). Un proceso habitual de purificación de las ficobiliproteínas incluye diferentes técnicas como son la centrifugación, precipitación con amino sulfato, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel y cromatografía en hidroxiapatita cerámica (Bermejo et al., 1997; Ficner et al., 1992).

Como alternativa en los últimos años se han desarrollado procesos de purificación de biliproteínas en lecho expandido. De esta forma se consigue reducir el número de etapas del proceso. Una de las ventajas de esta técnica es la posibilidad de trabajar con el extracto celular poco clarificado, por lo tanto, en algunos casos se puede eliminar la etapa de clarificación. Se han publicado varios artículos con resultados interesantes en los que se ha conseguido obtener un buen rendimiento y reducir el número de etapas (Bermejo et al., 2007 y 2003). A día de hoy aún no se han conseguido implantar procesos a escala industrial que permitan la obtención de la ficoeritrina a gran escala, a pesar del interés que existe en este producto en varios sectores (Lee et al., 2021).

2.3.2. Los anticuerpos y las técnicas de purificación más comunes

Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas, son glicoproteínas producidas por linfocitos B, que constituyen el componente humoral del sistema inmunitario. Son proteínas cuya función consiste en detectar elementos extraños denominados antígenos. Están formados por cuatro cadenas polipeptídicas, dos de ellas son más largas, por este motivo se identifican como cadenas pesadas o cadenas H, y dos más cortas, cadenas ligeras o cadenas L. Estas están apareadas de forma que la molécula consta de dos mitades cada una de ellas formada por una cadena pesada y una cadena ligera, adoptando la forma de Y. Las cadenas se encuentran unidas por puentes de sulfuro (S-S). Esta distribución hace que se puedan distinguir tres fragmentos dentro de la molécula: una subunidad Fc (Fragmento cristalizante del anticuerpo) y dos subunidades Fab (fragmento de unión a antígenos). En la Figura 2.11 se encuentra representada la estructura de un anticuerpo.

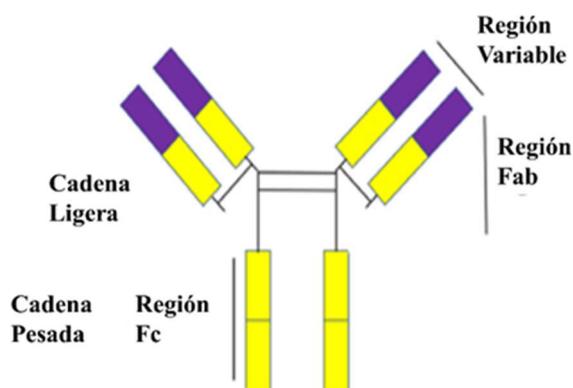


Figura 2.11.- Estructura de un anticuerpo unido a la proteína A (Ramos-de-la-Peña et al., 2019).

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) tienen un lugar importante dentro de la industria biotecnológica y especialmente dentro de la industria biofarmacéutica. Esto se debe a sus más que demostradas capacidades terapéuticas como medicamento y como agente de diagnóstico. La capacidad de interactuar de forma específica con un determinado analito dentro de una mezcla compleja, como pueden ser los fluidos biológicos, es la característica que los hace tan interesantes. Como resultado, los anticuerpos son la clase de nuevo fármaco que más se está desarrollando en los últimos años. Desde la aprobación

y comercialización del primer mAbs (Muromonab-CD3) en 1986, en Estados Unidos por la Administración de Alimentos y Medicamentos (US FDA), no han dejado de aprobarse nuevas terapias con mAbs, tanto en Estados Unidos como en Europa. A nivel mundial se aprobaron 65 nuevos anticuerpos en 2021. A mediados de 2022 se aprobó la comercialización de 1231, haciendo que el mercado de los mAbs siga creciendo a un ritmo rápido a corto plazo. En la actualidad, los medicamentos basados en anticuerpos se sitúan entre los más populares. Según las ventas de medicamentos de 2021 y 2022 los anticuerpos están entre los 50 medicamentos principales a nivel mundial. El mercado mundial de fármacos de anticuerpos ha mantenido una tasa de crecimiento superior al 10% durante los últimos ocho años consecutivos, superando los 200.000 millones de dólares por primera vez en 2021. El comercio de mAbs supone más del 50% del mercado biotecnológico total (Wang et al., 2022).

La investigación en la producción y purificación de anticuerpos está en constante desarrollo con el fin de abastecer al mercado con la cantidad de producto demandado y la calidad necesaria, para su aplicación tanto en procesos terapéuticos como de diagnóstico. La purificación de los mAbs debe realizarse de manera eficiente para que su producción sea económicamente competitiva. Por esta razón, cobra importancia desarrollar procesos de purificación de anticuerpos menos costosos y con tiempos de ejecución más cortos (Langer y Rader, 2017).

La cromatografía de afinidad con proteína A se ha ganado un lugar relevante en la purificación de anticuerpos, debido a la elevada afinidad y los altos niveles de pureza que se pueden alcanzar. La proteína A es un componente de la pared celular de las bacterias, su obtención se lleva a cabo a partir de *Staphylococcus aureus* o *Escherichia coli*. Esta proteína posee una elevada afinidad por la región Fc de los anticuerpos (Ramos-de-la-Peña et al., 2019). La fuerte unión entre la proteína A y algunos anticuerpos de mamífero se atribuye a cinco dominios de unión E, D, A, B y C (Figura 2.12) homólogos a IgG. Cada uno de ellos consta de 3 hélices que se dirigen a la región Fc del anticuerpo, situados entre las regiones C_{H3} y C_{H2} (Choe et al., 2016).

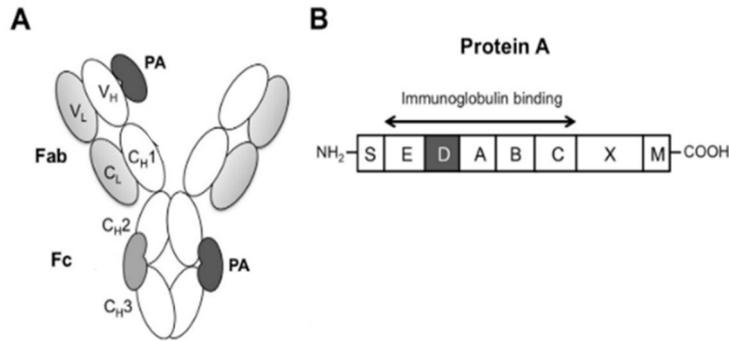


Figura 2.12.- A) estructura de un anticuerpo, B) dominio de unión de la proteína A al anticuerpo. PA representa la unión entre el dominio D de la proteína A y el anticuerpo en la región Fc y Fab (Dong et al., 2015).

Habitualmente, previo al desarrollo de la cromatografía de afinidad con proteína A es necesario llevar a cabo la clarificación del cultivo celular, para eliminar las impurezas que puedan interferir negativamente en la cromatografía. Posteriormente, se ponen en contacto el caldo de cultivo clarificado que contiene el anticuerpo con la proteína A inmovilizada a pH neutro, con el fin de favorecer la interacción entre ligandos. Seguidamente se realiza un lavado también a pH neutro, para eliminar la mayor cantidad posible de impurezas que hayan podido quedar retenidas como son restos celulares, ADN, RNA, agregados, etc. Para la elución de los anticuerpos se introduce una fase móvil a pH bajo (normalmente pH 3), de forma que logre romper el enlace entre los ligandos y anticuerpos. Por último, se lleva a cabo la limpieza y regeneración de la proteína A. La pureza de los anticuerpos obtenidos tras la cromatografía con proteína A es superior al 90%. Para alcanzar una pureza superior y para que se encuentre en las condiciones necesarias para su aplicación se somete a un proceso de pulido, que suele ser una etapa de cromatografía de intercambio iónico. Finalmente, se lleva a cabo la eliminación de virus mediante ultrafiltración, diafiltración y nanofiltración además del tratamiento con solventes/detergentes (Chahar et al., 2020).

La cromatografía con proteína A, a pesar de ser la más utilizada para la purificación de anticuerpos tanto a escala laboratorio como en producción industrial, presenta aspectos mejorables referidos al alto coste de la resina, la lixiviación de ligandos y la inestabilidad provocada por una vida útil corta. Estos son los principales desafíos a superar (Ramos-de-la-Peña et al., 2019).

A día de hoy, se han desarrollado múltiples líneas de investigación con el fin de conseguir reducir los costes de la purificación de anticuerpos y alcanzar el nivel productivo al que se ha llegado en la fase de producción de anticuerpos. Una de las alternativas que se ha evaluado es la cromatografía de afinidad en LE (Feuser et al., 1999; González et al., 2003). A pesar de que en algunos casos se logra la eliminación de la etapa de clarificación siguen apareciendo problemas de canales preferentes, con la consecuente disminución de la eficacia del proceso. D'Souza y colaboradores (2017) en su trabajo estudian la fase móvil más adecuada para reducir el ensuciamiento en la adsorción en lecho expandido. Dado el alto costo y la vida útil limitada de la proteína A otros autores han enfocado sus investigaciones en reducir el coste de la resina, en el conjunto de la purificación mediante la maximización de su vida funcional (Teeters et al., 2009; Zhang et al., 2017). También se han evaluado otros ligandos como alternativa a la proteína A. La proteína G la cual comprende un único polipéptido con múltiples dominios. Sin embargo, la proteína G muestra algunas desventajas frente a la proteína A, las más importantes son: la necesidad de utilizar un pH de elución inferior (pH ~2,5), posee un comportamiento no específico elevado, formación alta de agregados, baja estabilidad de almacenamiento y costes incluso más elevados que los relacionados con la resina de proteína A (Choe et al., 2016; Kruljec y Bratkovič, 2017).

Se han desarrollado una multitud de sistemas de purificación de anticuerpos, muchos de los cuales intentan automatizarlo, disminuir el tiempo de procesamiento y trabajar con hasta cinco muestras en paralelo (Becker et al., 2019; Luan et al., 2018; Schmidt et al., 2016). Algunos de los nuevos métodos desarrollados para la purificación de mAbs se basan en la precipitación con polielectrolitos aniónicos (Sieberz et al., 2014), sistemas acuosos de dos fases (Azevedo et al., 2009; Campos-Pinto et al., 2017; Silva et al., 2014) o cromatografía con ácido fenilborónico (Rosa et al., 2016). No obstante, todos estos trabajos tienen una característica común que es la necesidad de incluir un paso previo de preparación de la muestra. Las muestras deben ser clarificadas, ya sea por filtración o por centrifugación o combinación de ambas, antes de ser introducidas en el sistema de purificación.

3. OBJETIVOS

Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el diseño y caracterización del RFV-LE para la adsorción de biomoléculas a partir de un enfoque experimental que permita evaluar la eficacia del sistema propuesto. Se pretende desarrollar una tecnología integradora para la recuperación directa de biomoléculas a partir de caldos de cultivo celulares sin previa clarificación. Con el fin de alcanzar esta meta se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar el reactor de flujo de vórtices para la purificación de proteínas.
- Determinar el rango de variables de operación del RFV para conseguir un LE estable, con la formación de vórtices de Taylor y que opere en condiciones de flujo pistón. Estas condiciones son consideradas como determinantes para lograr un proceso de adsorción de biomoléculas eficiente.
- Evaluar la aplicación del RFV-LE en los procesos de purificación para reducir el número de etapas. Para ello se emplean dos tipos de proteínas distintas:
 - a) B-PE, proteínas de síntesis intracelular.
 - b) Anticuerpo IgG2a, proteína de síntesis extracelular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Equipos

4.1.1. Reactor de flujo de vórtices

El reactor flujo de vórtices (Figura 4.1) está compuesto por un cilindro externo de material acrílico transparente, hueco y estático (1) y un cilindro interno de acero inoxidable (2); ambos cilindros se encuentran situados de forma concéntrica dejando un espacio anular entre ambos. El espacio anular (d) es la diferencia entre el radio interno del cilindro externo (r_e) y el radio externo del cilindro interno (r_i). El cilindro interno está sujeto a la base del reactor (3) mediante un rodamiento (4) y por la parte superior a un motor (5) conectado a su correspondiente controlador que permite fijar la velocidad de giro del cilindro interno.

El cilindro externo o carcasa externa tiene múltiples puertos de entrada/salida (6) distanciados 2 cm entre sí, cada uno de ellos conectado a una válvula. A 2 mm por encima de la base del reactor, se ubican tres puertos. El puerto de entrada del alimento al reactor (7) cuenta con una válvula que se acciona de forma manual. En el lado opuesto se encuentra el puerto de salida del eluato (8), equipado con otra válvula. Además, este puerto está provisto de una membrana de nailon (9) que retiene el adsorbente dentro del reactor. El puerto (10) situado entre los dos primeros se utiliza para retirar el adsorbente del RFV a través de una válvula. La configuración de estos puertos permite utilizar el RFV en la cromatografía de adsorción de lecho expandido. La carcasa está provista de una escala de medida cuyo origen se sitúa en la base del reactor, la cual permite visualizar rápidamente la altura del lecho de adsorbente.

En la Figura 4.2 se muestran las imágenes de los RFV utilizados (RFV-F3 y RFV-F1). Por su parte, en la Tabla 4.1 se detallan las dimensiones geométricas y parámetros más relevantes de ambos reactores. La relación de radios (η) se calcula según el cociente entre el radio externo del cilindro interno y el radio interno del cilindro externo (r_i/r_e). La relación de aspecto es el cociente entre la altura del LE y la anchura del espacio anular (H/d) y se representa por el símbolo Γ , este parámetro representa el número de vórtices generados para cada geometría, según la altura del lecho expandido.

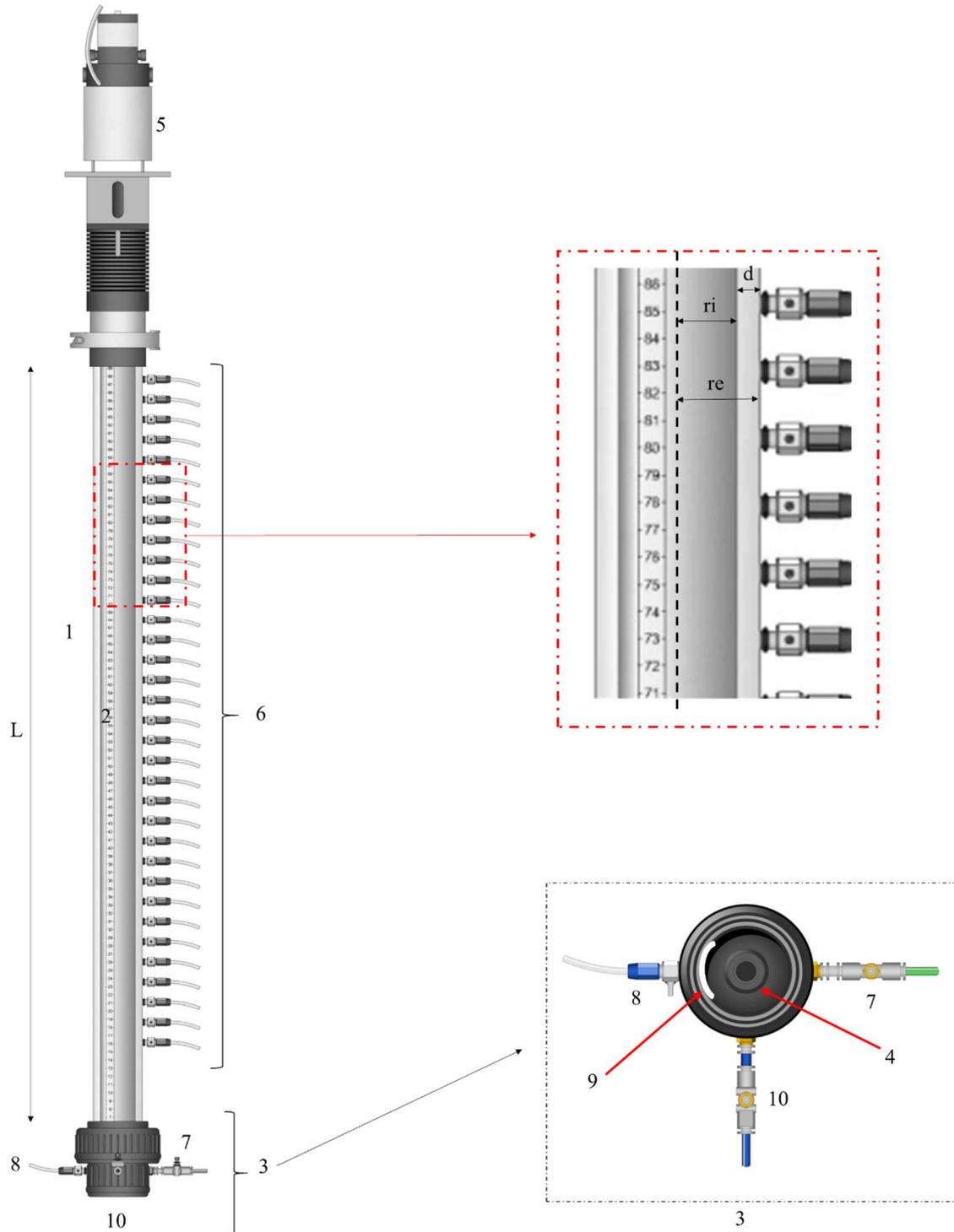


Figura 4.1.- Representación del RFV. (1) cilindro exterior, (2) cilindro interno, (3) base del reactor, (4) rodamiento, (5) motor de velocidad regulable, (6) puertos de entrada o salida a la zona anular del reactor, (7) puerto de entrada del alimento, (8) puerto de salida del eluato, (9) membrana de nailon, (10) puerto para la retirada del adsorbente.

a)



b)



Figura 4.2.- Fotografías de los reactores de flujo de vórtices empleados en este trabajo: (a) RFV-F3 (b) RFV-F1.

Tabla 4.1.- Descripción de los principales parámetros geométricos del RFV-F3 y RFV-F1.

Dimensiones geométricas	Unidades	RFV-F3	RFV-F1
r_e (radio interior del cilindro externo)	cm	2,60	0,95
r_i (radio externo del cilindro interno)	cm	2,15	0,50
L (altura del cilindro externo)	cm	95	95
H (altura del lecho expandido)	cm	37-75	47-56
d (ancho del espacio anular, $r_e - r_i$)	cm	0,45	0,45
d/r_i	*	0,209	0,90
η (relación de radios r_i/r_e)	*	0,83	0,53
Γ (relación de aspectos H/d)	*	82-167	104-124
S (área de la superficie del espacio anular)	cm ²	7,39	2,05

**Parámetros adimensionales*

Dos configuraciones diferentes permiten abordar el proceso cromatográfico en el RFV. Para albergar las etapas de estabilización, adsorción y lavado, el RFV trabaja en LE (Figura 4.3.a) y la entrada de alimento se realiza por el puerto (7) y la salida por uno de los puertos situados por encima de la parte superior del LE (6) En esta configuración el cilindro interno gira a velocidad angular constante (ω). En la etapa de elución (Figura 4.3.b) la entrada se realiza por uno de los puertos (6) situados unos centímetros por encima del lecho sedimentado mientras que la salida se efectúa por el puerto (8). En esta configuración el cilindro interno se mantiene estático.

Como puede observarse en la Figura 4.2 la altura a la que se encuentra situado el primer puerto (6) en ambos reactores difiere levemente, 10 cm y 12cm desde la base para el RFV-F1 y RFV-F3 respectivamente. Los motores que mueven el cilindro interno por su parte son Heidolph RZR 2102 control Z en el RFV-F1 y Electro-Craft E652-M en el RFV-F3.

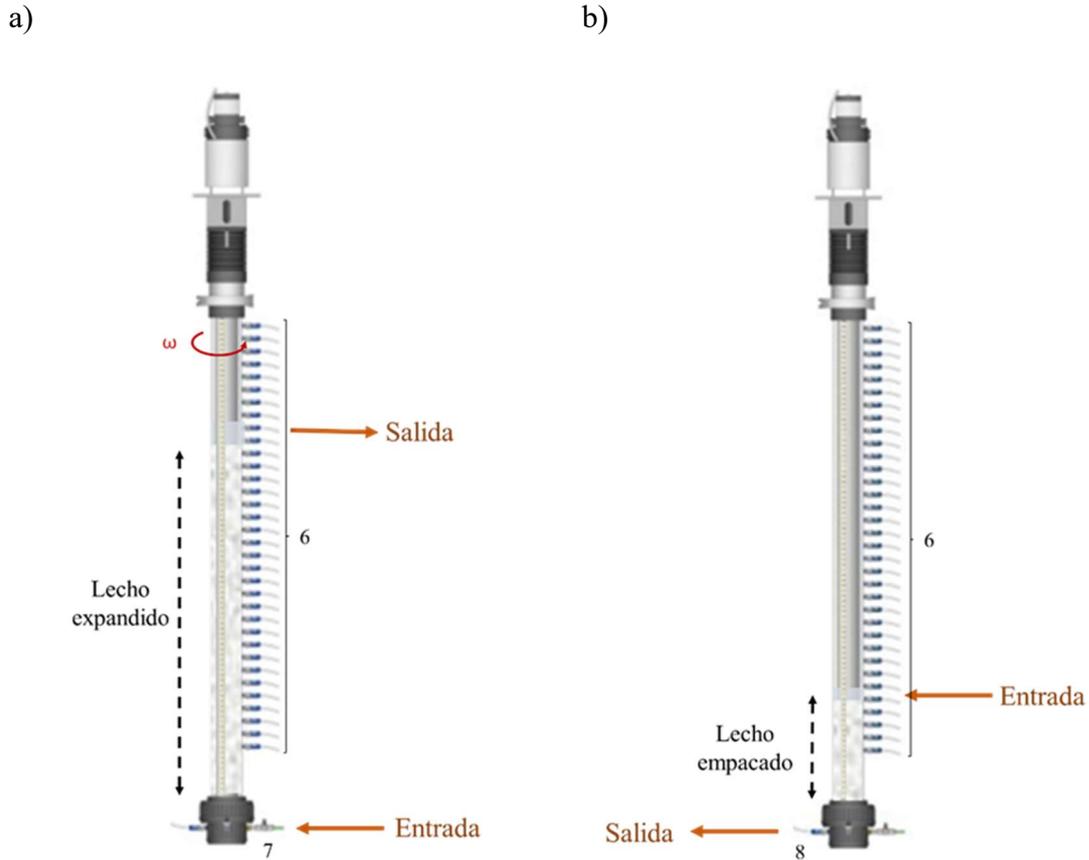


Figura 4.3.- Configuración del RFV para llevar a cabo las diferentes etapas del proceso: a) configuración en lecho expandido (RFV-LE) para la estabilización, adsorción y lavado; b) configuración en lecho sedimentado para la etapa de elución.

4.1.2. Bombas peristálticas

Dos bombas peristálticas son las encargadas de impulsar el líquido, colocadas a la entrada y a la salida de los RFV. El modelo Watson Marlow 323S (UK), conectado al RFV-F3, presenta cabezal de bomba regulable (desde 3 rpm hasta 400 rpm) al que se le acopla un tubo de silicona con un diámetro interno de 1,6 mm y grosor de 1,8 mm. El caudal se puede regular desde $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a $220 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Por su parte, el modelo Gilson Minipulse 3 (USA), conectado al RFV-F1, con un cabezal de 8 canales y velocidad regulable (desde 0 hasta 48 rpm) se le acopla un tubo de silicona con un diámetro interno de 3,17 mm y grosor de 0,85 mm. Los tubos de silicona utilizados en ambas bombas

presentan buena resistencia química, flexibilidad, incoloros, no tóxicos y utilizables entre -50°C y +230°C.

4.1.3. Colectores de tubos

El colector de fracciones, RediFrac (EEUU) puede recoger hasta 95 fracciones en tubos de 10-18 mm de diámetro. La recogida se puede realizar de diferentes formas, basadas en el tiempo o en el recuento de gotas. En este trabajo las muestras se recogen durante un periodo de tiempo fijo.

Para las muestras de menor volumen se ha utilizado el colector de tubos FC203B de Gilson (EEUU) con capacidad de hasta 128 tubos de 12 mm, también permite la recolección en microplacas y tubos de menor diámetro. Puede seleccionarse la opción de recolección por pico, tiempo o gota. Además, ofrece la posibilidad de fijar diferentes volúmenes de recolección fijando intervalos de tiempo.

La forma de operar con ambos colectores es la misma. El tubo de silicona de la bomba peristáltica de salida del RFV se coloca en el brazo del colector de fracciones. El brazo presenta un sensor de tubos y un sensor de gotas junto al orificio de salida del líquido. El sensor de tubos se apoya en la parte superior del tubo de recogida para situar el flujo de líquido directamente en el centro del tubo y a su vez, el sensor de gotas puede detectar las mismas al caer al tubo. Si el sensor de gotas no las detecta, el colector de tubos se detiene o no comienza.

4.1.4. Agitadores

- Agitador orbital Heidolph UNIMAX 1010 (Alemania) que permite una velocidad de agitación de entre 30 y 500 rpm, con posibilidad de temporizador o trabajo continuo.
- Agitador orbital K3E OVAN (España) de sobremesa permite una velocidad de rotación de entre 200 y 1000 rpm.
- Agitador magnético Agimatic-S Selecta (España) con velocidad regulable de 60 a 1600 rpm y un volumen máximo de agitación de 10 L.

4.1.5. Balanzas

- Granatario modelo CB-Junior Cobos (España) con calibración interna. Rango de pesaje hasta 3000 g con una precisión de $\pm 0,01$ g.
- Balanza analítica electrónica QUINTIX 224-1S de Sartorius (Alemania) con calibración interna automática. Rango de pesaje hasta 220 g con una precisión de $\pm 0,0001$ g.

4.1.6. Centrífugas

- Para volúmenes de hasta 50 mL se utiliza la centrífuga Sigma 4-15 de Sartorius (Alemania) que permite utilizar tubos tipo Falcon de 15 y 50 mL. Velocidad de giro regulable en un rango entre 100 y 15.000 rpm.
- Para volúmenes pequeños se centrifuga en tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL en la centrífuga Mini Spin Plus de Eppendorf (Alemania), proporciona una velocidad de giro entre 800 y 14.000 rpm, en incrementos de 100 rpm.

4.1.7. Espectrofotómetros

Se utiliza un espectrofotómetro ultravioleta-visible, modelo Jasco V-630 (Japón), de doble haz que permite la medida de absorbancia utilizando cubeta o célula de fluido de 10 mm, ambas de cuarzo. El software Spectra Manager II permite cambiar el modo de medida (espectros, cinéticas y medidas de absorbancia) y procesar los datos desde el ordenador. El V-630 puede medir el espectro de absorción en un rango de longitud de onda de 190 a 1100 nm. Las fuentes de luz utilizadas son una lámpara de deuterio (190 a 350 nm) para la región ultravioleta y una lámpara halógena (330 a 900 nm) para la región visible. La luz se divide en dos haces, uno va a la muestra a medir (cubeta o celda de fluido) y el otro al blanco de referencia (solvente puro) colocado en una cubeta. La luz atraviesa la muestra y el blanco de referencia, incide sobre el fotodiodo de silicio (S1337) que la convierte en una señal eléctrica y después en una señal digital que se envía al

ordenador. La señal procesada por el ordenador se muestra en el monitor como datos digitales dando lugar a un espectro o a una medida de absorbancia a lo largo del tiempo.

Para la medida de absorbancia en microplacas se utiliza el espectrofotómetro Synergy MX Bio Tek (EEUU). Se trata de un sistema monocromador con un alto nivel de discriminación espectral y exploración espectral gracias a su diseño de rejilla cuádruple. El rango de longitud de onda de absorbancia es de 230 a 999 nm, ajustable en incrementos de 1 nm y tiene un ancho de banda de 2 nm (230-285 nm) y 4 nm (> 285 nm). Tiene un ajuste en altura automatizado, que se adapta a diferentes alturas de microplacas con una resolución de 100 µm. El equipo funciona a través del software Gen5 que proporciona un análisis de los datos adaptable.

4.1.8. Liofilizador

Liofilizador Cryodos 50 Telstar (España) permite el uso de frascos, viales, ampollas o a granel. El liofilizador está compuesto por una bomba de vacío modelo Varian DS 102 provista de lastre de aire, un sistema frigorífico compuesto por un compresor hermético de una etapa de refrigeración conjunta por circulación de aire y un condensador de hielo de acero inoxidable.

4.1.9. Medidor de pH

Las medidas de pH se llevaron a cabo en un potenciómetro Professional-Meter PP-15, con un rango de medida de 0 a 14 y un error de $\pm 0,002$. Se emplea un electrodo de vidrio para la medida del pH con sensor de temperatura integrado PY-P11. Para su calibración se han utilizado tampones de referencia de pH 4,01, 7,00 y 9,00. Todo de la marca Sartorius (Alemania).

4.1.10. Viscosímetro

El viscosímetro de cilindros concéntricos Brookfield DV-II+ (EEUU) (Figura 4.4) consiste en un motor de velocidad controlable capaz de medir el momento de torsión que se ejerce al girar un husillo en el seno de un líquido a una velocidad determinada. El control del viscosímetro se realiza a través del controlador acoplado al motor. El viscosímetro aporta datos de velocidad de deformación (s^{-1}), esfuerzo de corte (mPa), viscosidad dinámica ($mPa \cdot s^{-1}$) y el momento de torsión (%). El momento o esfuerzo de torsión tiene que ser superior al 10% para obtener valores fiables.

a)



b)



Figura 4.4.- Viscosímetro empleado en la experimentación: a) detalle del enganche de husillo al motor, husillo (ULA) y cilindro externo; b) sistema montado para la medida de la viscosidad de las muestras.

En este trabajo las condiciones son tales que siempre se utiliza el husillo 00' "Ultra Low Adapter" (ULA), de acero inoxidable de 25,15 mm de diámetro y 90,74 mm de altura. El husillo se une al motor mediante un enganche y se introduce en un recipiente cilíndrico encamisado de 27 mm de diámetro y 135 mm de altura que contiene la muestra (16 mL).

4.1.11. Birreactores para el cultivo de microalgas y células animales

El cultivo de la microalga *Porphyridium cruentum* se realiza en un fotobiorreactor tipo columna de burbujeo de 20 L de capacidad útil, con una configuración similar a la que se puede observar en el esquema que se muestra en la Figura 4.5. El reactor está rodeado simétricamente por cuatro lámparas fluorescentes de techo TLD 36W/54 (Phillips, Países Bajos) que actúan como fuente de luz. La temperatura de la columna se regula gracias a la circulación de agua a través de la camisa termostatazada que rodea al reactor. La aireación (procedente de un compresor) pasa a través de un filtro de 0,2 μm y se introduce a través de un orificio situado en la base del reactor. El reactor está provisto de una sonda de pH conectado a una electroválvula normalmente cerrada que se abre bajo el mando del controlador, para permitir la entrada de CO_2 gaseoso cuando el pH del cultivo se eleva por encima del valor establecido.

La configuración de la Figura 4.5 muestra asimismo el tanque de adición de medio de cultivo fresco, la cual se realiza a través de una bomba peristáltica a la velocidad de dilución establecida en el experimento. Al aumentar el volumen del cultivo dentro del reactor, se supera el nivel del orificio del rebosadero y el cultivo se dirige, por gravedad, hasta el tanque de cosechado, hasta que el nivel del cultivo se iguala al nivel del rebosadero del biorreactor.

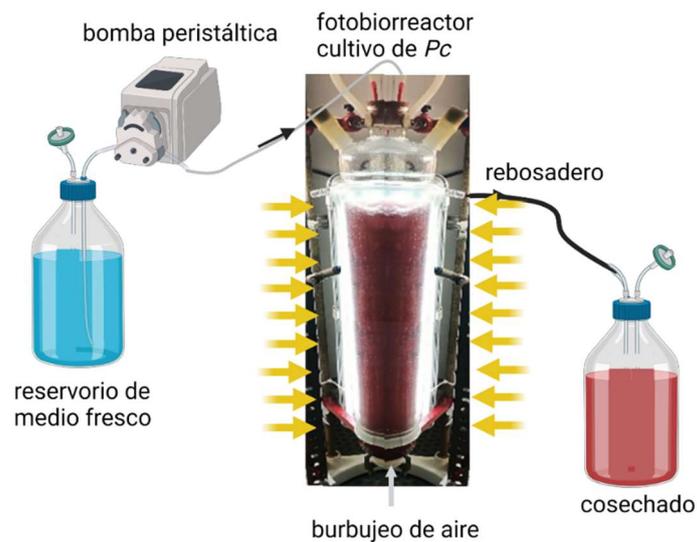


Figura 4.5.- Biorreactor utilizado para el cultivo de *Porphyridium cruentum*.

Materiales y Métodos

Para el cultivo en discontinuo de células de hibridoma de ratón transgénico 55/6 se emplea el sistema BiostatQ multif fermentador (Braun AG, Alemania). Este sistema está compuesto por 4 fermentadores de vidrio de 600 mL con volumen útil de entre 250 y 400 mL (Figura 4.6). Cada biorreactor está formado por un vaso de vidrio con una camisa termostática y una tapa de acero inoxidable con cierre hermético a la que están unidas el burbujeador y la barra de agitación. Además, la tapa tiene una serie de orificios que permite la incorporación de sondas y la toma de muestras manteniendo la esterilidad del sistema.

El equipo ofrece la posibilidad de trabajar de forma independiente con cada uno de los biorreactores, los cuales están conectados a un controlador para el control de la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno disuelto, el caudal y la mezcla de gas (aire y O₂) que entra al sistema y la intensidad de la agitación. Para ello el biorreactor dispone de una sonda de temperatura, una sonda de pH y una sonda de oxígeno disuelto puestas en contacto con el cultivo a través de la tapa del biorreactor. La entrada de gases se hace a través de un filtro de venteo de 0,2 µm. La agitación se lleva a cabo con una hélice de 4 palas accionada de forma magnética.



Figura 4.6.- Biorreactores para el cultivo del hibridoma 55/6 conectado al controlador.

4.2. Adsorbentes

Se emplean dos adsorbentes de la línea Streamline: DEAE y rProtein A, ambos de Cytiva (Danaher corporation, EEUU). Estos adsorbentes están especialmente diseñados para la cromatografía de adsorción en lecho expandido.

4.2.1. Características del adsorbente Streamline DEAE

La resina Streamline está formada por un 6% de agarosa reticulada que ha sido modificada con un núcleo de cuarzo cristalino inerte, proporcionando una alta densidad. Es un adsorbente intercambiador de aniones débiles. El tamaño de las partículas entre 100 y 300 μm , los cristales de cuarzo ocluidos en su interior hacen que su densidad sea de 1,2 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

El dietilaminoetil (DEAE), grupo funcional $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$, está cargado positivamente, por lo que atrae moléculas cargadas negativamente. El número de grupos de ligandos que se cargan varía con el pH de trabajo, encontrándose el rango de pH operativo entre 3 y 9. Las características físicas y químicas de la resina Streamline DEAE (Tabla 4.2) le otorgan las siguientes propiedades:

Tabla 4.2.- Características de la resina Streamline DEAE proporcionadas por el fabricante Cytiva.

Característica	Descripción
Ligando	Dietilaminoetil-celulosa
Porosidad	$4\cdot 10^6$ Da
Matriz	Macroporosa Agarosa reticulada al 6% Núcleo de cuarzo cristalino
Rango de tamaño de las partículas	100 - 300 μm
Media del tamaño de las partículas	200 μm
Densidad media de las partículas	1,2 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

El protocolo de limpieza y regeneración de la resina Streamline DEAE consiste en pasar secuencialmente los siguientes disolventes en cantidades que se corresponden al triple del volumen de resina empleado en el experimento:

- NaCl 2M,
- agua destilada,
- NaCl 1M + NaOH 0,5M, y
- agua destilada

Este protocolo se realiza una vez finalizado cada experimento. La resina se conserva en etanol al 20% (v/v).

4.2.2. Características del adsorbente Streamline rProtein A

La matriz base que forma este adsorbente está compuesta por un derivado de agarosa al 4% altamente reticulado, la cual ha sido modificada mediante la inclusión de un núcleo metálico inerte. De esta forma se consigue la densidad elevada necesaria para lograr lechos expandidos estables.

La proteína A recombinante se produce en *E. coli* y está especialmente diseñada mediante la fusión de un residuo de cisteína al C-terminal, lo que favorece un acoplamiento orientado a la matriz. El acoplamiento da lugar a una baja fuga de ligandos, ya que proporciona una alta capacidad de unión a IgG debido a la mayor interacción entre la proteína A y la región Fc del anticuerpo. De esta forma se genera un enlace tioéter estable entre el ligando y la base de la matriz. La especificidad de la proteína A recombinante para la región Fc de IgG es similar a la de la proteína A original, dando lugar a una excelente purificación en un solo paso.

Según las propiedades físico-químicas del adsorbente Streamline rProtein A (Tabla 4.3), este se caracteriza por:

- permitir la captura de inmunoglobulinas a partir de materias primas no clarificadas,
- poseer una alta capacidad de unión debido al acoplamiento orientado del ligando

y la matriz base especialmente diseñada para tal función,

- contener proteína A recombinante altamente purificada, obtenida a partir de *E. Coli*, y
- lograr una baja fuga de ligandos.

Tabla 4.3.- Características de la resina Streamline rProtein A proporcionadas por el fabricante Cytiva.

Característica	Descripción
Ligando	Proteína A recombinante
Composición	Agarosa reticulada al 4% Núcleo metálico inerte
Rango de tamaño de las partículas	80- 162 μm
Media del tamaño de las partículas	121 μm
Densidad media de las partículas	1,3 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

El protocolo de limpieza y regeneración de la resina Streamline rProtein A consiste en pasar secuencialmente los siguientes disolventes en cantidades que se corresponden al doble del volumen de resina empleado en el experimento:

- urea 2M,
- ácido acético 1M, y
- agua destilada

Este protocolo se realiza una vez finalizado cada experimento. La resina se conserva en etanol al 20% (v/v).

4.3. Medida de la viscosidad de las muestras de alimento

La viscosidad del cultivo celular se determina usando un viscosímetro rotacional (Brookfield DV-II + Pro, modo LVF, EE.UU.) con el husillo 00'. La determinación de los parámetros reológicos de los cultivos celulares se realiza siempre por duplicado en

muestras a temperatura ambiente. La clasificación del comportamiento del fluido (newtoniano o no newtoniano) se obtiene mediante el análisis de la relación entre la rapidez de deformación ($\dot{\gamma}$) y el esfuerzo de corte (τ) o reograma, y la aplicación del Modelo de Ley de Potencia, representado por la siguiente ecuación:

$$\tau \text{ (Pa)} = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (4.1)$$

donde τ es el esfuerzo de corte (Pa), K es el coeficiente de consistencia ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$), n es el índice de flujo y $\dot{\gamma}$ es la rapidez de deformación (s^{-1}).

El índice de flujo (n) y el coeficiente de consistencia (K) se obtienen graficando $\log \tau$ (esfuerzo de corte) versus $\log \dot{\gamma}$ (tasa de deformación cortante), siendo n la pendiente de la recta y $\log K$ la ordenada. El índice de flujo define el comportamiento de los fluidos como newtonianos ($n=1$) o no newtonianos ($n \neq 1$).

La viscosidad del extracto de B-PE concentrado de *P. cruentum* después de realizar la ruptura celular se determina utilizando velocidades de rotación de 20-80 rpm con incrementos de 10 y 20 rpm. En el caso del cultivo de hibridoma 55-6 la viscosidad se mide en el caldo de cultivo sin filtrar, utilizando velocidades de rotación de 50-90 rpm con incrementos de 10 rpm.

4.4. Medida de la densidad de las muestras de alimento

Para la medida de la densidad se utiliza un picnómetro Pobel de 25 mL, el cual está formado por un matraz con forma de pera de boca esmerilada y un tapón autoenrasante. Primero se lleva a cabo la calibración del picnómetro para conocer con exactitud el volumen del mismo y evitar errores de medida. Para ello el picnómetro se pesa vacío en una balanza de precisión (Sartorius Quintix 224-1S, Alemania). Posteriormente se llena con agua destilada, asegurándose de que no quedan burbujas de aire en el líquido, y se lleva a un baño termostático modelo Tectron Bio de JP Selecta (España) a 25°C durante 20 minutos. Por último, se pesa el conjunto picnómetro agua destilada y se calcula el volumen real del picnómetro según la ecuación 4.2.

$$V_p \text{ (mL)} = \frac{M_{\text{H}_2\text{O}}}{\rho_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (4.2)$$

donde V_p (mL) corresponde al volumen del picnómetro, M_{H_2O} (g) es la masa de agua a 25°C (diferencia entre el picnómetro con agua destilada y el picnómetro vacío) y ρ_{H_2O} ($g \cdot mL^{-1}$) es la densidad teórica del agua a 25°C. Los ensayos se realizan por triplicado y se obtiene el volumen real del picnómetro con la desviación estándar asociada, que en este caso es de $25,30 \pm 0,03$ mL.

Una vez conocido el volumen real del picnómetro se procede a medir la densidad del caldo de cultivo del hibridoma 55/6. El procedimiento seguido es el mismo que se sigue para hacer la calibración, es decir, se llena el picnómetro con la muestra deseada, se lleva al baño termostático a 25°C durante 20 minutos y posteriormente se pesa el conjunto picnómetro más muestra en la balanza de precisión. Al valor de la masa obtenido se le resta la masa del picnómetro. Con la ecuación 4.2 se calcula densidad de la muestra sustituyendo los valores de la masa de la muestra y el volumen real del picnómetro.

4.5. Preparación de disoluciones tampón

4.5.1. Tampón de acetato de sodio a pH 5,5 fuerza iónica 50, 250 y 1000 mM

Para la preparación de los diferentes tampones de acetato de sodio a pH 5,5 con diferentes fuerzas iónicas se utilizan diferentes concentraciones de acetato sódico y ácido acético. En la siguiente tabla se especifican las concentraciones necesarias para cada tampón. Para el ajuste del pH se utilizan KOH y H_3PO_4 .

Tabla 4.4.- Concentraciones necesarias de acetato sódico y ácido acético para la preparación de los tampones de acetato de sodio pH 5,5 de diferentes fuerzas iónicas.

Fuerza iónica (mM)	Acetato sódico ($g \cdot L^{-1}$)	Ácido acético ($g \cdot L^{-1}$)
50	69,41	9,22
250	70,83	8,68
1000	72,92	6,66

4.5.2. Tampón tris-HCL 50 mM pH 7,5

Para su preparación se necesitan 6,06 g de tris(hidroximetil)aminometano ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$) por cada litro de tampón deseado. El pH de la disolución se ajusta añadiendo HCl (37%) hasta alcanzar el valor adecuado.

Para preparar la disolución de 500 mM de NaCl en Tris-HCL 50 mM pH 7,5 se añaden 29,25 g NaCl puro por cada litro de Tris-HCL 50 mM pH 7,5.

4.5.3. Tampón citrato de sodio 100 mM pH 3, 4, 5 y 6

Se parte de dos soluciones madre:

- Solución A: Solución 0,1 M de ácido cítrico, para ello se disuelven 21,01 g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ en 1000 mL de agua destilada.
- Solución B: Solución 0,1 M de citrato de sódico, para ello se disuelven 29,41 g de $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 1000 mL de agua destilada.

En la Tabla 4.5. se detalla la relación de las soluciones A y B necesaria para preparar 100 mL del tampón de citrato de sodio del pH requerido.

Tabla 4.5.- Volumen necesario de las soluciones A y B para obtener 100 mL del tampón de citrato de sodio a pH 3, 4, 5 y 6.

pH	Solución A (mL)	Solución B (mL)
3	46,5	3,5
4	33,0	17,0
5	20,5	29,5
6	9,5	41,5

4.5.4. Tampón fosfato de sódico 200 mM pH 7,5

Primero deben prepararse dos soluciones madre:

- Solución A: Solución 0,2 M de fosfato sódico monobásico, para ello se disuelven 27,8 g NaH_2PO_4 1000 mL de agua destilada.
- Solución B: Solución 0,2 M de fosfato sódico dibásico, para ellos se disuelven 53,65 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 1000 mL de agua destilada.

Se mezclan 16 mL de la Solución A más 84 mL de la solución B por cada 100 mL de solución tampón deseada.

4.6. Caracterización del RFV: ensayos de fluidodinámica, transferencia de materia y observación visual

4.6.1. Parámetros de la función de distribución de tiempos de residencia

En la Figura 4.7 se muestra la configuración utilizada durante los ensayos de la distribución del tiempo de residencia (DTR), en el lecho expandido. Para ello se introduce una señal de trazador en forma de escalón a la entrada del RFV. El trazador es acetona (Sigma Chemical Co., USA) en disolución acuosa al 0,25% v/v. La detección de la señal de trazador a la salida del reactor se realiza mediante la medida de la absorbancia a 280 nm usando un espectrofotómetro con una celda de flujo continuo (Jasco V-630, Japón). Todos los ensayos se realizan por triplicado. Para obtener la recta de calibrado que permita la cuantificación del contenido de acetona a la salida del reactor, se preparan siete disoluciones de acetona de concentración conocida entre 0,025 y 0,30 % v/v. Cada una de las disoluciones se bombea con un caudal de $6,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ a la celda de flujo continuo del espectrómetro que opera en el modo “cinética”. Se registra el valor de absorbancia cada 10 segundos durante 100 segundos. El valor medido de cada disolución patrón da lugar a la siguiente recta de calibrado:

$$\% \text{ acetona (v/v)} = 0,4466 \cdot A_{280} + 0,0140 \quad r^2 = 0,9990 \quad (4.3)$$

Los pasos que se deben llevar a cabo para realizar el estudio de la distribución del tiempo de residencia en el sistema (Figura 4.7) son las siguientes:

- Carga de la resina. Se añade a la zona anular del reactor la cantidad de resina necesaria para alcanzar la altura del lecho sedimentado fijada (H_0).
- Estabilización del lecho expandido. Se introduce agua por la entrada inferior del RFV mediante una bomba peristáltica a una velocidad de flujo fijada, hasta conseguir un lecho expandido. Se pone seguidamente en marcha la rotación del cilindro interno hasta alcanzar la velocidad fijada. El puerto de salida de líquido está colocado varios centímetros por encima del LE del RFV para asegurar que el flujo de salida no arrastra el adsorbente. La corriente de salida se impulsa por la acción de una bomba peristáltica. Se mantienen las condiciones fijadas hasta lograr la estabilización del LE con altura (H_1).
- Entrada del trazador. Se sustituye la entrada de agua por la disolución de trazador. El flujo de salida pasa a través de la celda de flujo continuo del espectrofotómetro y se mide la absorbancia a 280 nm cada 10 segundos. El sistema se mantiene en estas condiciones hasta que la concentración a la salida es de al menos 95% de la concentración de entrada de trazador.
- Lavado en lecho sedimentado. Se para la bomba peristáltica de entrada de trazador al sistema y se para el motor que produce la rotación del cilindro interno, de esta forma la resina sedimenta. Se introduce agua por la parte superior del reactor y se recoge por la salida inferior hasta que no se detecta señal de trazador.

En el RFV-F3 la determinación de la distribución de los tiempos de residencia se hace utilizando un diseño factorial de dos factores con tres niveles de velocidad axial ($U= 100, 200$ y $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$) y con tres niveles de altura de lecho sedimentado ($H_0= 10, 20$ y 30 cm). La velocidad de rotación se mantiene constante a 25 rpm. La desviación estándar de cada parámetro se calcula para representar el error de los valores obtenidos. En la Tabla 4.6 se

detallan los caudales y volúmenes de resina Streamline DEAE que se emplean en la experimentación en función de la velocidad axial y altura del lecho sedimentado.

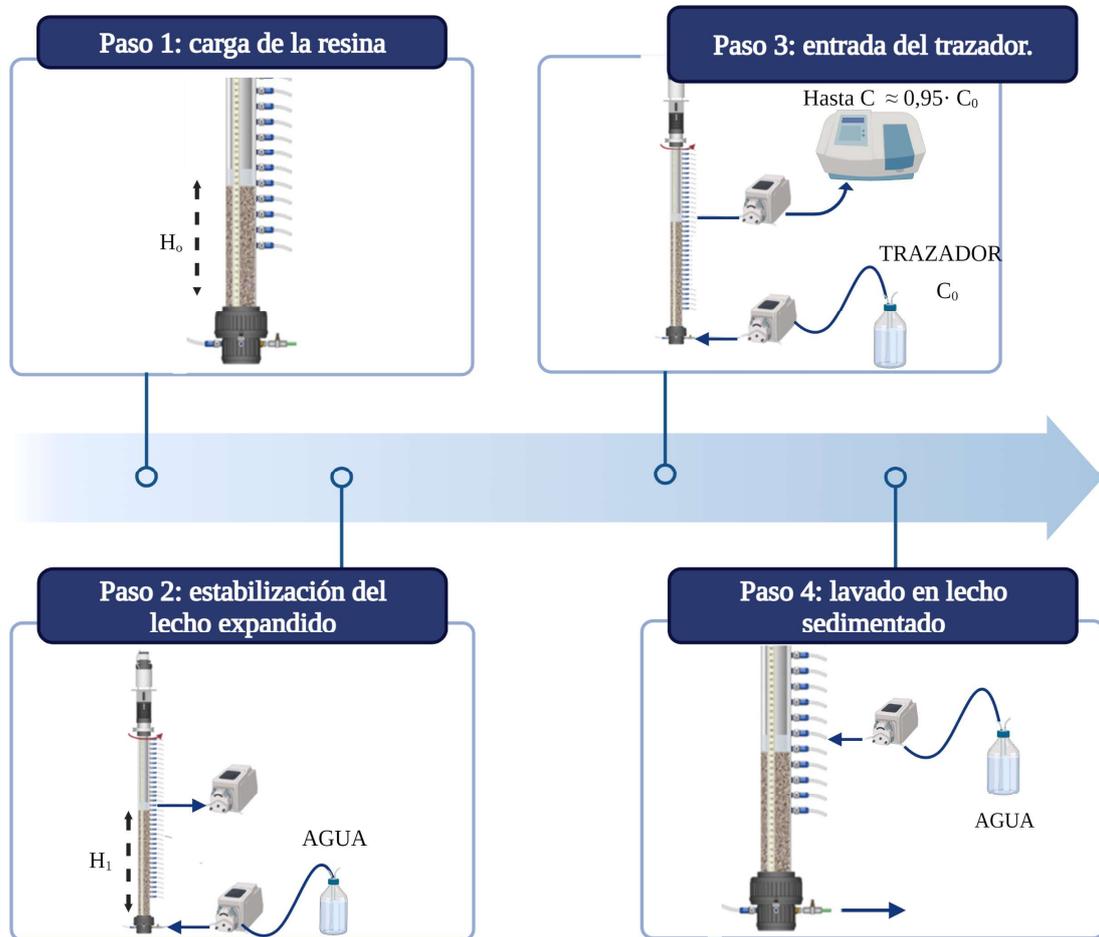


Figura 4.7.- Diagrama de las diferentes configuraciones necesarias para el estudio de la distribución del tiempo de residencia.

En el RFV-F1 se utiliza una altura de lecho sedimentado de 20 cm, correspondiente a 50 mL de Streamline rProtein A, y una velocidad de flujo axial fija de $300 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ ($10,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), evaluándose diferentes velocidades de rotación 20, 35, 50 y 75 rpm.

Para determinar la DTR en ausencia de adsorbente el reactor RFV-F1 se llena hasta 47 cm sólo con agua. La velocidad de rotación del cilindro interno es de 40 rpm y la velocidad superficial de entrada del fluido es de $300 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$, equivalente a un flujo de $10,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Tabla 4.6.- Condiciones en las que se realizan los experimentos para determinar la DTR en los RFV. Los caudales de fluido se calculan a partir de la velocidad axial (U). El volumen es la cantidad de resina introducida para alcanzar la altura del lecho sedimentado (H_0). La velocidad de rotación del cilindro interno (ω). Las resinas utilizadas son Streamline DEAE en el RFV-F3 y Streamline rProtein A en el RFV-F1.

Resina / reactor	U (cm·h ⁻¹)	Caudal (mL·min ⁻¹)	H ₀ (cm)	Volumen (mL)	ω (rpm)
Streamline DEAE/ RFV-F3	100	11,2	10	85	25
	200	22,4	20	135	
	300	33,6	30	262	
-----					20
Streamline rProtein A/ RFV-F1	300	10,2	20	50	35
					50
					75

Sin adsorbente/ RFV-F1	300	10,2	Agua: 47 cm		40

El análisis matemático de los datos experimentales permite calcular la amplitud de la función de distribución de tiempos de residencia y la varianza adimensional, necesaria para utilizar posteriormente el modelo de dispersión axial.

La medida de la amplitud del tiempo de residencia se expresa en min² y se calcula a partir de la siguiente ecuación (Levenspiel, 1972):

$$\sigma^2(\text{min}^2) = \left(\frac{\sum_{i=1}^n t_i^2 \cdot \Delta C_i}{C_{\text{max}}} \right) - \bar{t}^2 \quad (4.4)$$

Donde la ΔC_i es la diferencia entre $C_i - C_{(i-1)}$, siendo C_i y C_{i-1} (mg·mL⁻¹) las concentraciones del trazador en el instante t_i y t_{i-1} , respectivamente. C_{max} (mg·mL⁻¹) es la concentración máxima que alcanza el trazador a la salida del RFV y \bar{t} (min) es el tiempo de residencia medio, que se define mediante la ecuación 4.5.

$$\bar{t}(\text{min}) = \frac{\sum_{i=1}^n t_i \cdot \Delta C_i}{C_{\text{max}}} \quad (4.5)$$

La varianza adimensional (σ_θ^2) y el tiempo adimensional (θ) se calculan mediante las ecuaciones siguientes:

$$\sigma_\theta^2 = \frac{\sigma^2}{\bar{t}^2} \quad (4.6)$$

$$\theta = \frac{t}{\bar{t}} \quad (4.7)$$

4.6.2. Coeficiente de dispersión axial

Operando el RFV en flujo continuo, el número de Péclet (Pe) se relaciona con la varianza adimensional de acuerdo a la siguiente ecuación (Levenspiel, 1972):

$$\sigma_\theta^2 = 2 \cdot \left(\frac{1}{Pe}\right) + 8 \cdot \left(\frac{1}{Pe}\right)^2 \quad (4.8)$$

Por definición, el número de Péclet relaciona el transporte por convección de líquidos con la dispersión axial, derivando en la expresión:

$$D_{ax} = \frac{U \cdot H_1}{\varepsilon \cdot Pe} \quad (4.9)$$

donde U ($m \cdot s^{-1}$) representa la velocidad axial del líquido, H_1 (m) es la altura del lecho expandido, D_{ax} ($m^2 \cdot s^{-1}$) es el coeficiente de dispersión axial y ε corresponde a la porosidad del lecho expandido. La ε se calcula a partir de un balance de masa asumiendo que la masa de adsorbente en lecho sedimentado es igual a la masa de adsorbente en LE (ecuación 4.10).

$$\frac{H_1}{H_0} = \frac{(1-\varepsilon_0)}{(1-\varepsilon)} \quad (4.10)$$

donde H_0 (m) es la altura del lecho sedimentado y ε_0 es la porosidad del lecho sedimentado, cuyo valor para partículas esféricas en un lecho empacado puede asumirse 0,4 (Levenspiel, 1974).

La Figura 4.8 esquematiza la secuencia de cálculo empleado para la determinación del coeficiente de dispersión axial. Calculados σ^2 y \bar{t} a partir de los datos de los experimentos y con las ecuaciones 4.4 y 4.5 se calculan las variables adimensionales σ_θ^2 y θ mediante

las ecuaciones 4.6 y 4.7. Con el cálculo de Pe ecuación 4.8 y ε ecuación 4.10 se obtiene el valor de D_{ax} con la ecuación 4.9.

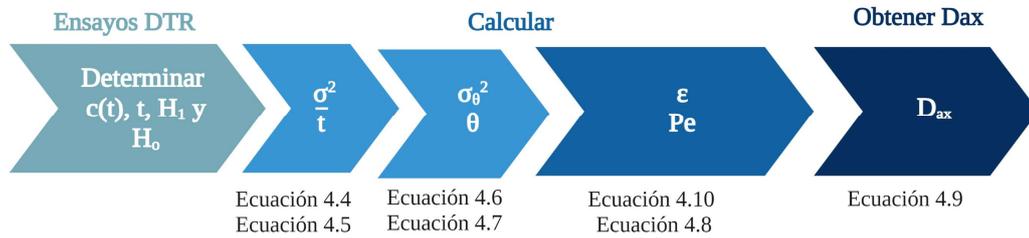


Figura 4.8.- Esquema de la secuencia de cálculo para la determinación de la dispersión axial (D_{ax}).

4.6.3. Isotherma de adsorción de ASB en la resina Streamline DEAE

La isoterma de adsorción de la resina Streamline DEAE, se realiza utilizando como proteína patrón albúmina de suero bovino (ASB) fracción V (A-7906), suministrada por Sigma Chemical Co. (EE.UU.), poniendo ambas sustancias en contacto durante un tiempo suficientemente largo. El punto isoeléctrico de la proteína ASB está situado en 4,7, de modo que para asegurar que la proteína esté cargada negativamente se utiliza un tampón de pH superior a su punto isoeléctrico. Para establecer la recta de calibrado del patrón se preparan cinco disoluciones de concentraciones conocidas de ASB entre 0,5 y 2,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. La recta de calibrado obtenida se escribe a continuación:

$$[\text{ASB}] (\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}) = 1,711 \cdot A_{280} - 0,022 \quad r^2 = 0,9993 \quad (4.11)$$

donde $[\text{ASB}] (\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ representa la concentración de ASB y A_{280} representa el valor de absorbancia obtenido para las muestras analizadas a una longitud de onda de 280 nm.

Por su parte, para la determinación de la isoterma se preparan 7 disoluciones de ASB con concentraciones comprendidas entre 0,4 y 5,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Porciones de 25 mL de cada una de estas disoluciones se ponen en contacto con 0,5 mL de resina en un vaso de precipitado (100mL) sobre un agitador orbital (Heidolph UNIMAX 1010, Alemania). La agitación se mantiene a 150 rpm y a temperatura ambiente ($25\pm 5^\circ\text{C}$) durante 12 h. Finalmente se determina la concentración de ASB en el

sobrenadante por espectrofotometría (280 nm) con ayuda de la recta de calibrado. El esquema de trabajo se representa en la Figura 4.9.

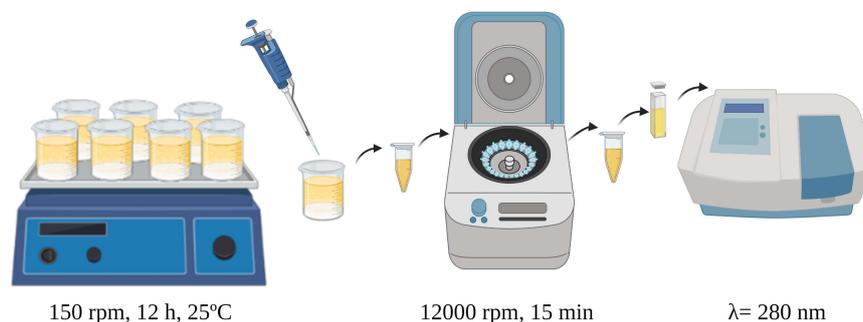


Figura 4.9.- Esquema de trabajo para determinar la isoterma de adsorción de la proteína patrón (ASB) en la resina Streamline DEAE. Cada vaso de precipitados contiene 25 mL de solución patrón de ASB y 0,5 mL de resina.

Sabiendo que la cantidad de proteína ASB que se encuentra en la disolución inicial antes del equilibrio es igual a la que se encuentra después del equilibrio, repartida entre las fases líquida y sólida, se determina la cantidad de proteína adsorbida por mL de resina empleada (ecuación 4.12).

$$q \text{ (mg} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)} = \frac{([\text{ASB}]_0 - [\text{ASB}]_e) \cdot V_i}{V_{\text{ads}}} \quad (4.12)$$

donde $q \text{ (mg} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)}$ corresponde a la cantidad de proteína adsorbida por volumen de adsorbente Streamline DEAE, $[\text{ASB}]_0 \text{ (mg} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)}$ es la concentración inicial de la solución patrón de ASB empleada en cada equilibrio, $[\text{ASB}]_e \text{ (mg} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)}$ es la concentración de ASB en el sobrenadante (equilibrio) después de 12 horas en agitación, $V_i \text{ (mL)}$ es el volumen de la solución de ASB y $V_{\text{ads}} \text{ (mL)}$ es el volumen de adsorbente Streamline DEAE.

4.6.4. Determinación de la capacidad dinámica de adsorción en el RFV-F3 entre la resina Streamline DEAE y la proteína patrón ASB

La capacidad dinámica de adsorción se determina operando en continuo y está definida como la cantidad de proteína que es capaz de adsorber 1 mL de resina. El final de la adsorción se establece cuando la concentración de salida de proteína es un 10% de la

concentración de entrada ($[ASB]/[ASB]_0$), esta condición indica el punto de ruptura de la resina.

La recta de calibrado de la ASB se realiza en continuo mediante el impulso de una bomba peristáltica, a un caudal de $6,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, hacia la célula en continuo del espectrofotómetro. Se emplean disoluciones de concentraciones conocidas de ASB de entre $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $2,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. En el espectrofotómetro se realizan diez medidas espaciadas 10 segundos entre sí (tiempo total 100 segundos) trabajando en modo “cinética”. Se determina la absorbancia media para cada una de las concentraciones empleadas.

La recta de calibrado obtenida se ajusta a la siguiente ecuación:

$$[ASB] (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = 1,5799 \cdot A_{280} + 0,0338 \quad r^2 = 0,9991 \quad (4.13)$$

En la Figura 4.10 se esquematiza el procedimiento seguido. Primero se carga la resina en el RFV-F3 hasta obtener un lecho sedimentado de 20 cm de altura. Se estabiliza el LE utilizando el tampón 50 Tris-HCl 50mM a pH 7,5 a la velocidad axial correspondiente (200 y $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$), con una rotación de cilindro interno de 25 rpm. Una vez se observa el lecho estable se sustituye el tampón por el alimento ($2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ASB). Se mide de forma continua la absorbancia del flujo de líquido a la salida del RFV. El experimento se detiene cuando $[ASB]/[ASB]_0$ alcanza el valor de 0,1 aproximadamente. La elución de la proteína ASB del adsorbente se realiza utilizando como eluyente una solución de NaCl al 500 mM en tampón Tris-HCl 50 mM a pH 7,5. Por último, se realiza el protocolo de limpieza y regeneración de la resina.

Para el cálculo de la capacidad dinámica de adsorción (Q , $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) se utiliza la ecuación propuesta por Chang y Chase (1996) (ecuación 4.14).

$$Q (\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}) = \frac{[ASB]_0 \cdot V_b}{V_{\text{ads}}} \quad (4.14)$$

donde $[ASB]_0$ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) es la concentración de ASB en el alimento, V_b (mL) es el volumen de alimento procesado hasta alcanzar el punto de ruptura ($[ASB]/[ASB]_0=0,1$) y V_{ads} (mL) es el volumen de adsorbente empleado.

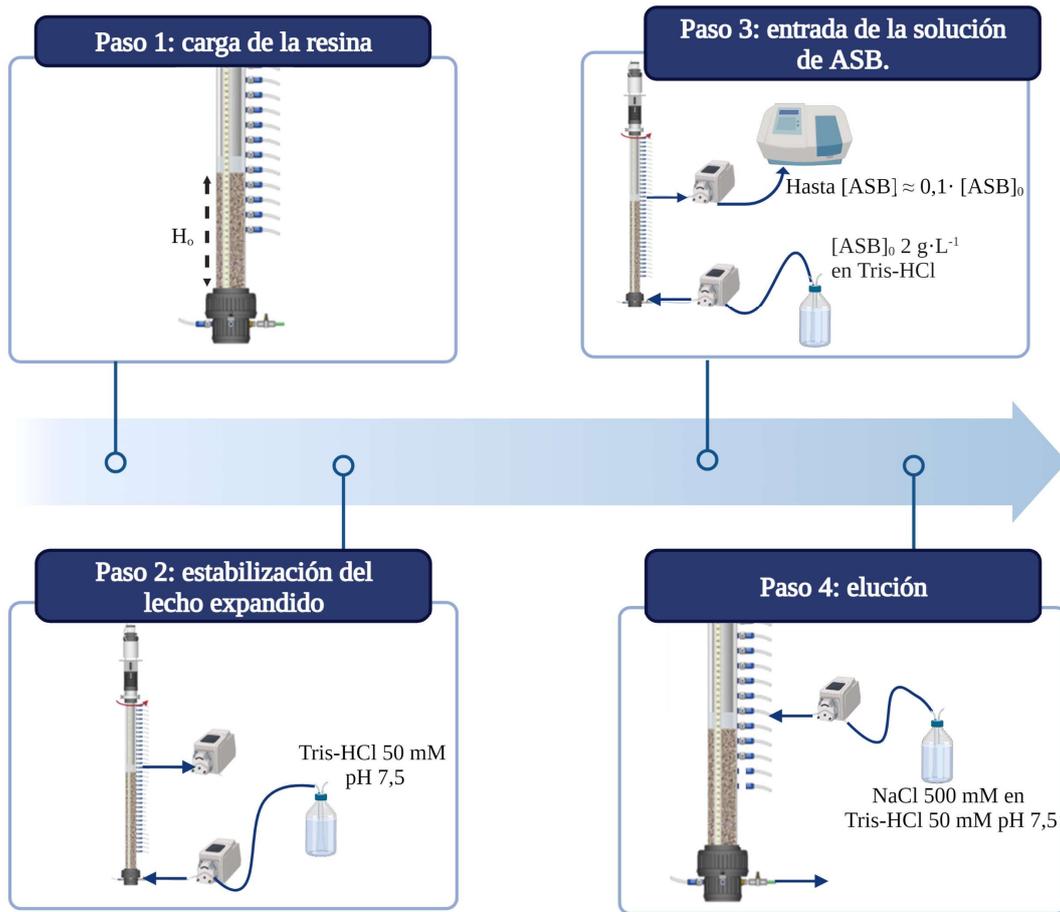


Figura 4.10.- Esquema de trabajo para determinar la capacidad dinámica de adsorción de la resina Streamline DEAE utilizando albúmina de suero bovino (ASB).

4.6.5. Estudio visual de la formación de vórtices y desplazamiento axial de los vórtices en el RFV-F1

Los estudios visuales permiten describir la formación de vórtices en el RFV-F1 y la velocidad de los mismos con respecto a la velocidad axial (velocidad de deriva) en las condiciones experimentales establecidas. El color del trazador óptico se selecciona para optimizar la visualización del fenómeno deseado: la formación de vórtices (partículas perladas) y la velocidad de desplazamiento de los vórtices (partículas rojas). Las partículas están constituidas por una mezcla de óxidos metálicos (óxido férrico y dióxido de titanio) con tamaño entre 10 y 60 μm con una densidad media $2600 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$.

a) Observación de la formación de vórtices:

- Se prepara una suspensión acuosa al 1% de trazador óptico de color perlado (partículas perladas) en un vaso de precipitado de 1L, se agita continuamente a la velocidad mínima necesaria para mantener la mezcla homogénea. A continuación, se introduce en el RFV-F1 a una velocidad axial de $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$. La salida se sitúa a una altura de 47 cm por encima de la base del reactor y se recircula al recipiente que contiene la suspensión de partículas homogénea.
- El ensayo se realiza para 4 velocidades de rotación del cilindro interno 20, 35, 50 y 75 rpm.
- De forma visual se observa la formación o no de los vórtices.

En la Figura 4.11. se ilustra el esquema del montaje para llevar a cabo la observación de los vórtices.

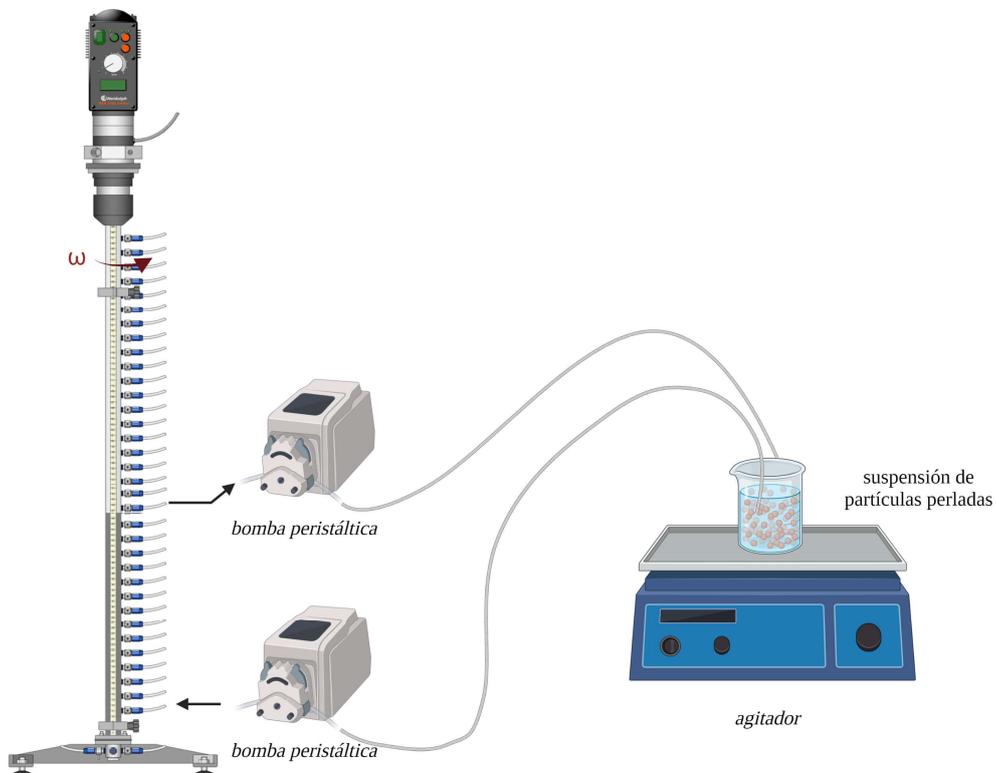


Figura 4.11.- Montaje experimental para la observación de la formación de los vórtices en el RFV.

b) Determinación de la velocidad de desplazamiento vertical de la unidad de vórtices:

- Se fija un flujo axial continuo de agua a una velocidad de $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ a través del puerto de entrada situado en la base del reactor RFV-F1.
- La salida del flujo se sitúa en el cuerpo del reactor a 47 cm por encima de la base del reactor.
- El experimento se lleva a cabo para 3 velocidades de rotación del cilindro interno 35, 50 y 75 rpm.
- Cuando el sistema alcanza el estado estacionario en las condiciones fijadas se inyecta, con una jeringuilla, 1mL de suspensión acuosa de mica de color rojo al 1% v/v. La introducción se realiza a través de la válvula situada a 29 cm de la base del reactor.
- Una vez detectado la unidad de pares de vórtices gracias al trazador óptico se mide el tiempo que tarda una unidad en desplazarse 5 cm (hasta la altura de 34 cm indicada en la escala de la carcasa del reactor) utilizando un cronómetro. Se determina la velocidad del centro de la unidad de vórtices como el cociente de la distancia recorrida (5 cm) por el tiempo empleado (t_5 , h), medido con el cronómetro. Las medidas se hacen por triplicado. Una vez conocida la velocidad de la unidad de pares de vórtices (v_v , $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$) y del fluido axial (U , $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$) se determina la velocidad de deriva de la unidad de pares vórtices como el cociente entre ambas velocidades mediante la siguiente ecuación:

$$v_d = \frac{v_v}{U} = \frac{5/t_5}{300} \quad (4.15)$$

En la Figura 4.12.se ilustra el esquema del montaje para llevar a cabo la observación de la velocidad de desplazamiento vertical de las unidades de pares de vórtices.

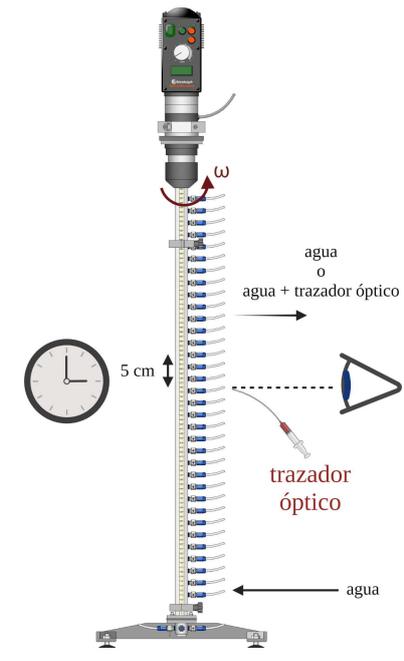


Figura 4.12.- Esquema de trabajo del experimento visual. Las partículas coloreadas se inyectan para facilitar la observación de los vórtices. Visualmente se mide el tiempo que tarda en desplazarse una unidad de pares de vórtices 5 cm.

4.7. Procedimiento para la obtención y purificación de B-PE

El proceso completo incluye el cultivo de la microalga *Porphyridium cruentum*, su concentración mediante centrifugación y posterior resuspensión en tampón de acetato, la ruptura de las células mediante sucesivas etapas de congelación y descongelación y, finalmente, la purificación de B-PE en el RFV (Figura 4.13).

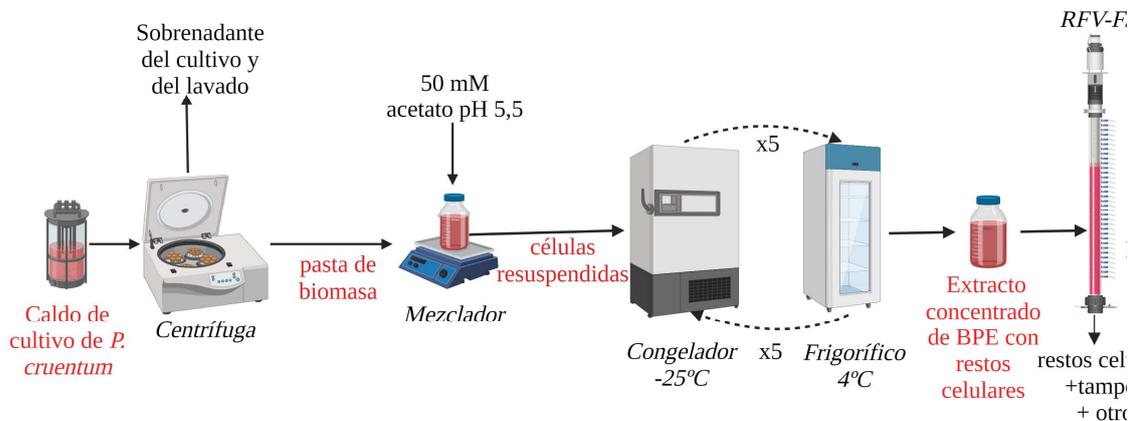


Figura 4.13.- Proceso de obtención de B-PE de alta pureza a partir de un cultivo de *Porphyridium cruentum* utilizando el RFV-F3.

4.7.1. Cultivo de *Porphyridium cruentum*.

La microalga utilizada, *P. cruentum* (CCMM 08/0101) proviene de la colección de cultivos del Instituto de Ciencias Marinas (Puerto Real, España). El medio de cultivo es agua bombeada desde el mar Mediterráneo, filtrado a través de dos filtros de 20 μ m y 10 μ m, y luego esterilizada en el autoclave. El agua de mar es enriquecida con nutrientes estériles según formulación del medio f/2 (Guillard, 1975).

Los cultivos de reserva de la microalga *P. cruentum* se mantienen en medio líquido en matraces Erlenmeyer de 250 ml, tapados con algodón hidrófobo, agitados mediante un agitador orbital OVAN, modelo K3E a 150 rpm e iluminados a 200 $\mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ mediante dos lámparas fluorescentes Phillips TLD36W/5.

El precultivo de la microalga se mantiene en un botellón de 2000 ml cerrado con un tapón con dos orificios cada uno de ellos con un tubo metálico para la entrada y salida de aire. El tubo metálico del orificio destinado a la entrada de aire llega hasta el fondo del botellón, mientras que el orificio de salida tiene un tubo más corto que llega por encima del nivel del líquido. Ambos tubos están conectados a filtros de venteo de 0,2 μm , para asegurar la esterilidad del cultivo.

Las células son mantenidas en la fase exponencial de crecimiento previo a su inoculación. Todas las manipulaciones de los microorganismos se realizan en un ambiente estéril en una campana de flujo laminar vertical (Au-100, Telstar).

Las células de *P. cruentum* se hacen crecer en un fotobiorreactor burbujeado agitado de 20 L (Figura 4.5). La temperatura del cultivo se fija con el controlador a $25 \pm 5^\circ\text{C}$. El pH se mantiene en $7,8 \pm 0,1$ mediante inyecciones automáticas de dióxido de carbono. El recipiente se airea a $0,5 \text{ v}\cdot\text{v}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. La irradiancia promedio en la superficie del biorreactor se mantiene en $100 \mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Pasados 10 días desde la inoculación el biorreactor se mantiene en continuo, mediante la adición de medio fresco y cosechando el cultivo por el rebosadero ($0,01 \text{ h}^{-1}$). Una vez alcanzado el estado estacionario el cosechado se colecta en una garrafa de 10 L, hasta obtenerse un volumen de 7 L de caldo de cultivo.

4.7.2. Procedimiento de extracción de B-PE a partir del cultivo *P. cruentum*

Una vez obtenido el cultivo, se separa la pasta de biomasa por centrifugación, se rompen las células y se extrae la proteína siguiendo las etapas descritas a continuación (Figura 4.13):

- Centrifugación y lavado. 7 L de cultivo se centrifugan utilizando una centrífuga (Sartorius Sigma 4-1, Germany) operando a 5000x g durante 15 min. Las sales se eliminan mediante resuspensión de la pasta de cultivo en cloruro de sodio al 0,8 %, finalmente se vuelve a centrífuga para separar la pasta de biomasa.
- Resuspensión en tampón. La biomasa se resuspende mediante agitación manual en tampón de acetato 50mM a pH 5,5, hasta un volumen final de 700mL (se concentra 10 veces) y se homogeneiza mediante un agitador magnético. Se toma una muestra de 10 mL para la determinación del contenido en sólidos.
- Ruptura celular y obtención del extracto. El extracto de células resuspendidas se somete a cinco ciclos de congelación a -25°C y descongelación a 4°C, para romper las células y liberar la B-PE contenida dentro de las mismas. Tras cada ciclo de congelación-descongelación se recoge una muestra de 1 ml para determinar la eficacia de la extracción de B-PE. Esta secuencia se repite 5 veces.

4.7.3. Determinación del contenido en sólidos totales

Se determina el contenido en sólidos totales en la disolución de células de cultivo resuspendidas en tampón. La determinación se realiza por peso seco por triplicado. Para ello, un volumen conocido de muestra (10 mL) se trasvasa a un tubo Falcon de masa conocida (M_F , g). La muestra se congela durante 48 h para posteriormente introducirla en el liofilizador. A partir de la masa final de la muestra (incluyendo la masa del Falcon: M_{FF} , g), la masa inicial del Falcon y el volumen de la muestra se determina el contenido en sólidos (C_S) según la siguiente ecuación:

$$C_S (\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{M_{FF} - M_F}{10 \text{ mL}} \quad (4.16)$$

4.7.4. Medida de la eficiencia de extracción de B-PE

Para determinar la eficiencia de la extracción de la B-PE se sigue el procedimiento cualitativo propuesto por (Kilpatrick, 1985). En dicho procedimiento se relaciona la cantidad de B-PE en el extracto y en la muestra total, a partir de medidas de absorbancia a 545 nm. Es necesario corregir el efecto de la dispersión de la luz causada por los restos celulares de la muestra, para ello se realiza la medida de la absorbancia a 750 nm. Las operaciones realizadas son las siguientes:

- determinar la absorbancia de la muestra a 545 nm ($A_{muestra}^{545}$) y 750 nm ($A_{muestra}^{750}$),
- tomar una alícuota de 1 mL, transvasarla a un Eppendorf y centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos en una microcentrífuga (Eppendorf mini spin plus, Alemania), y
- determinar la absorbancia del sobrenadante a 545 nm ($A_{sobrenadante}^{545}$).

La eficiencia de la extracción de B-PE se determina cualitativamente según la ecuación 4.17 (Kilpatrick, 1985).

$$Eficacia\ de\ la\ extracción\ (\%) = \frac{A_{sobrenadante}^{545}}{A_{muestra}^{545} - A_{muestra}^{750}} \cdot 100 \quad (4.17)$$

4.7.5. Determinación de la concentración de B-PE y su pureza

La determinación de la concentración de B-PE se calcula a partir de mediciones de absorbancia a 565, 620 y 650 nm, utilizando las ecuaciones siguientes (Bennett and Bogorad, 1973; Bryant et al., 1979):

$$[APC](mg \cdot mL^{-1}) = \frac{A_{650} - 0,19 \cdot A_{620}}{5,65} \quad (4.18)$$

$$[PC](mg \cdot mL^{-1}) = \frac{A_{620} - 0,7 \cdot A_{650}}{7,38} \quad (4.19)$$

$$[BPE](mg \cdot mL^{-1}) = \frac{A_{565} - 2,8 \cdot [PC] - 1,34[APC]}{12,7} \quad (4.20)$$

donde [APC] corresponde a la concentración de aloficocianina, [PC] es la concentración de ficocianina y [BPE] es la concentración de B-PE. A_{650} , A_{620} y A_{565} corresponden a los valores de la absorbancia a las longitudes de onda indicadas en el subíndice para las muestras libres de partículas (previamente centrifugadas). Estos valores deben mantenerse dentro del rango de valores para los cuales es aplicable la ecuación (inferiores a 1). En caso de superarse dicho valor, la muestra es diluida y el valor de la absorbancia corregido por dilución.

La pureza se estima mediante la relación entre la absorbancia de la muestra a 545 nm (A_{545}) y 280 nm (A_{280}) según la ecuación 4.21, donde relaciones de absorbancia superiores a 4 indican que la pureza de la B-PE es elevada.

$$\text{Pureza} = \frac{A_{545}}{A_{280}} \quad (4.21)$$

4.7.6. Purificación de B-PE en el RFV

La purificación de B-PE se realiza a partir del extracto concentrado de B-PE con restos celulares en el RFV-F3 mediante las siguientes etapas:

a) Adsorción en lecho expandido

A continuación, se describen todos los pasos llevados a cabo en el proceso de adsorción de B-PE en el RFV-F3 con la resina Streamline DEAE (Figura 4.14):

- Carga. Se introducen 135 mL de resina Streamline DEAE, correspondiente a una altura de 20 cm de lecho sedimentado (H_0).
- Estabilización del lecho expandido. La expansión del lecho sedimentado de la resina se realiza mediante la introducción de una solución tampón de acetato 50 mM a pH 5,5 en flujo ascendente a $22,4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ($200 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$). El flujo se introduce a través de una bomba peristáltica en la entrada. La velocidad de rotación del cilindro interno se fija en 50 rpm. La estabilización del lecho se consigue a una altura H_1 .

- Carga del alimento. Una vez estabilizado el LE se cambia la entrada de la solución tampón por el extracto concentrado de células rotas (620 mL) a la misma velocidad del flujo axial ($200 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$). La velocidad de rotación del cilindro interno se mantiene en 50 rpm. La altura del LE asciende hasta una altura H_2 . Mediante una bomba peristáltica colocada a la salida, el efluente se recoge en fracciones de unos 32 mL a través de un colector de tubos (Redifrac) para determinar, por espectrofotometría, la concentración de B-PE no adsorbida.
- Lavado del lecho expandido. El lavado del adsorbente, para retirar los restos celulares, se realiza en flujo ascendente con tampón de acetato 50 mM a pH5,5 hasta dejar de detectarse partículas en el efluente de salida. Se alcanza una altura del lecho expandido H_3 .

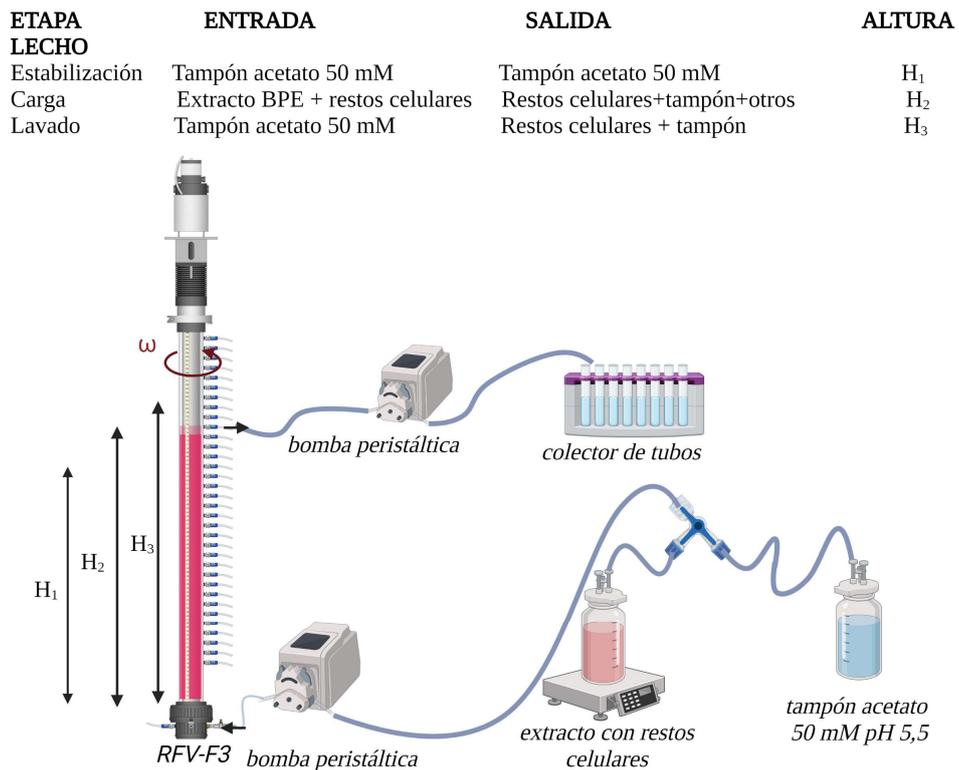


Figura 4.14.- Diagrama de flujo de las subetapas de equilibrio, adsorción y lavado durante la etapa de adsorción de B-PE en el RFV-LE.

b) Elución en lecho sedimentado

La etapa de elución se lleva a cabo en condiciones de lecho empacado (Figura 4.15). Para ello se sigue la siguiente secuencia de pasos:

- Sedimentación. Se para el motor del cilindro interno y se detienen ambas bombas peristálticas, para permitir que el lecho sedimente.
- Elución. La entrada se establece a través del puerto situado en el cuerpo de reactor que se encuentre unos centímetros por encima del tope del lecho sedimentado. Se utilizan secuencialmente dos eluyentes a una velocidad axial de $100 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$. Inicialmente, se utiliza una solución tampón 250 mM de acetato sódico a pH 5,5, que permite eluir la proteína adsorbida, y a continuación se introduce un segundo tampón de mayor fuerza iónica (solución 1 M de tampón de acetato sódico a pH 5,5), para asegurar la total elución de la proteína.
- Muestreo. Durante la etapa de elución, el eluato se recolecta en fracciones de 16 mL en el colector de tubos.
- Limpieza. Por último, se realiza el protocolo de limpieza de la resina según marca el fabricante de la misma.

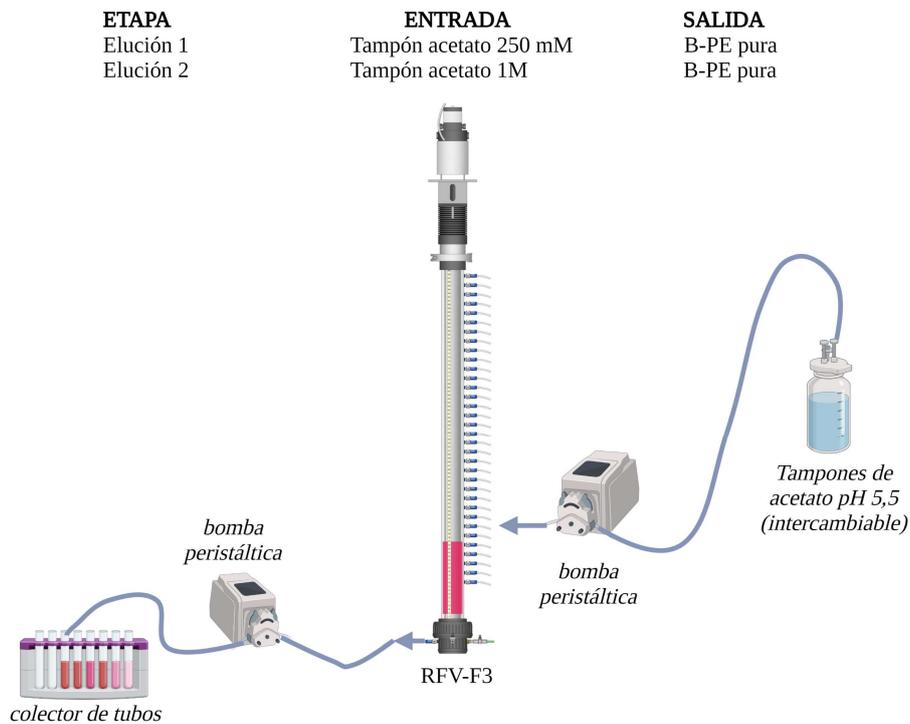


Figura 4.15.- Diagrama de flujo de la etapa de elución de la proteína B-PE en el RFV-F3.

4.8. Procedimiento para la obtención y purificación del anticuerpo IgG2a

El proceso consiste en obtener un caldo de cultivo de hibridoma de ratón transgénico 55/6, al cual se le ajusta el pH para introducirlo en el RVF con objeto separar y purificar el anticuerpo IgG2a (Figura 4.16).

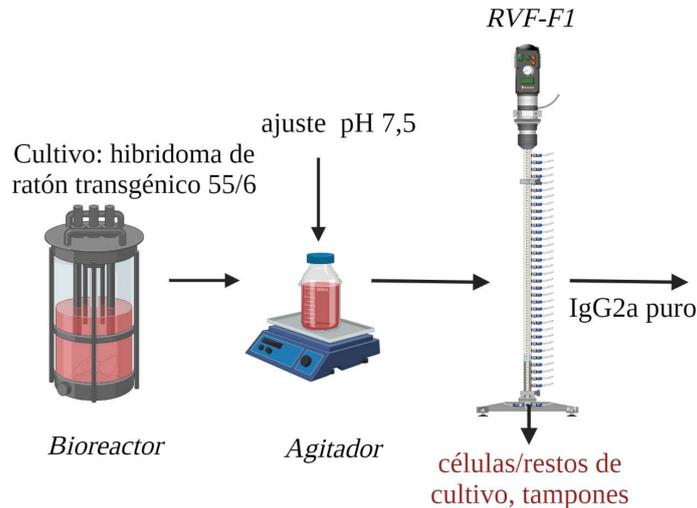


Figura 4.16.- Proceso de obtención de IgG2 puro a partir de un caldo de cultivo de hibridoma de ratón transgénico 55/6.

4.8.1. Cultivo de hibridomas de ratón

Para el cultivo de hibridomas de ratón identificadas como 55/6 (ATCC CRL-2156) se utiliza el medio de cultivo PFHM II (Gibco ®), sin suero fetal bovino, suplementado con $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ de penicilina-estreptomincina (Gibco ®) y $0,125 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ de amfotericina B. El cultivo de las células se lleva a cabo en discontinuo en un reactor agitado (Figura 4.6) de 0,6 L (Biostat Q. B. Braum, Alemania).

El reactor se inocula con 0,4 L de cultivo con una concentración celular de $3 \cdot 10^5 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$. La temperatura se controla a 37°C y la concentración de oxígeno disuelto se regula al 50% de saturación del aire a través del ajuste de la relación aire/ O_2/N_2 en el gas de entrada al reactor. La aireación de la superficie se fija a una velocidad de flujo constante de $0,1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ con el fin de mantener una concentración celular $5 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$.

4.8.2. Determinación del pH de elución de IgG2a en Streamline rProtein A

Para este ensayo se utiliza una columna de plato poroso de vidrio de 0,5 cm de diámetro que permite trabajar con volúmenes pequeños de resina y de alimento. El experimento consiste en adsorber el anticuerpo en lecho expandido, probando a continuación tampones eluyentes (citrato de sodio 100 mM), de diferentes pH en lecho sedimentado, hasta encontrar el pH de elución que permita desorber el anticuerpo de manera eficaz (al pH más elevado posible). Antes de introducir el alimento a través del plato poroso se hace necesario clarificarlo. Para ello, se centrifuga a 10000 xg (Sigma 4-1, Sartorius) durante 15 minutos, se recoge el sobrenadante y se ajusta el pH a 7,5 mediante adición de fosfato de sodio.

En la Figura 4.17 se encuentra detallado el diagrama de las etapas del proceso.

- Carga. Primero, la columna se carga con 1mL de adsorbente Streamline rProtein A.
- Estabilización del lecho. Se introduce una disolución tampón 200 mM de fosfato de sódico a pH 7,5 a $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ de abajo hacia arriba para expandir y estabilizar el lecho.
- Carga del alimento. La entrada se intercambia con el alimento (250 mL del caldo de cultivo clarificado a pH 7,5) y se introduce en la columna de lecho expandido a una velocidad de flujo axial de $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ a través de la bomba peristáltica.
- Lavado del lecho expandido. Se introduce tampón 200 mM de fosfato de sódico a pH 7,5 a $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ de abajo hacia arriba. Se mide la absorbancia (280 nm) a la salida de la columna hasta que no se detecta presencia.
- Elución. Se detienen las bombas peristálticas para que el lecho sedimente. A continuación, se eluye el anticuerpo utilizando el eluyente (citrato de sodio 100 mM) en secuencia de pH decreciente (pH 6, 5, 4 y 3), a una velocidad de flujo axial de $150 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$. De cada uno de los eluyentes se pasan 10 mL. El eluato se recoge en el colector de tubos FC203B de Gilson (EEUU) en fracciones de 1 mL. Previamente, en cada tubo de recolección de eluato se añade 0,200 mL de Tris-HCl a pH 8 para las fracciones de elución a pH 5 y 4. Para las fracciones a pH 3 se añade 0,400 mL de Tris-HCl a pH 8. De esta forma se consigue subir el pH de las muestras hasta

aproximadamente de 7,5 lo más rápidamente posible y así evitar el deterioro del anticuerpo.

- Cuantificación. Posteriormente las muestras se analizan por la técnica de Elisa-Sandwich con el fin de cuantificar la concentración de IgG2a. Las fracciones de elución a pH 5 se analizan individualmente. Las fracciones de elución a pH 6 y 4 se agrupan en una sola muestra para su análisis. Las fracciones recogidas de elución a pH 3 se agrupan en dos muestras.
- Higienización y regeneración. Finalmente, el adsorbente se higieniza y regenera siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

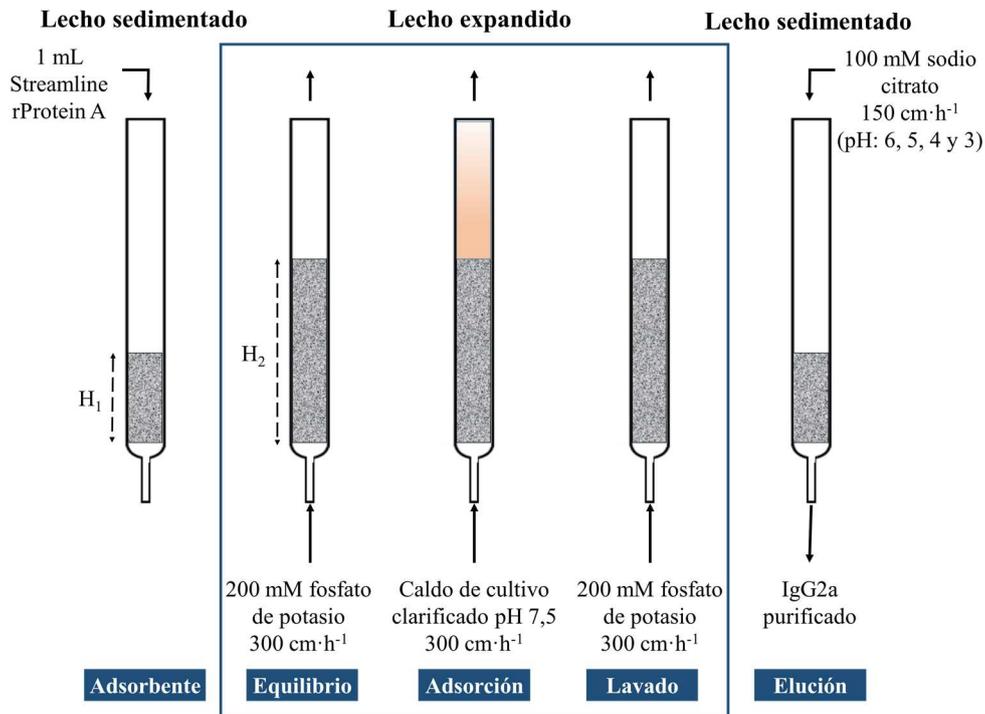


Figura 4.17.- Diagrama de las diferentes etapas del proceso de cromatografía en lecho expandido en una columna de 0,5cm de diámetro para seleccionar el pH del eluyente.

4.8.3. Purificación del anticuerpo IgG2a en el RFV

El cultivo de hibridoma 55/6 se conserva a -19°C hasta su uso en la etapa de purificación. La purificación del anticuerpo IgG2a se realiza una vez ajustado el pH a 7,5 con fosfato de sodio. Se utiliza el RFV-F1 y la resina Streamline rProtein A. A continuación, se describen los pasos llevados a cabo:

a) Adsorción en lecho expandido

El proceso de adsorción del anticuerpo IgG2a en el RFV-F1 con la resina de adsorción rProtein A se lleva a cabo en LE (Figura 4.18) tal y como se describe a continuación:

- Carga de la resina. Se introducen 50 mL de la resina Streamline rProtein A en el espacio anular del RFV-F1, alcanzando una altura de lecho sedimentado de 20 cm.
- Estabilización del lecho. Se introduce una solución tampón 200 mM de fosfato de sodio a pH 7,5 en flujo ascendente a una velocidad de $300\text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ ($10,2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), con ayuda de una bomba peristáltica. Se pone en marcha la rotación del cilindro interno a 50 rpm y se espera a observar un LE estable. El LE alcanza una altura H_1 .
- Carga del alimento. Se cambia la solución tampón 200 mM de fosfato de sodio a pH 7,5 por el caldo de cultivo a la misma velocidad axial ($300\text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$) manteniendo la misma velocidad de rotación del cilindro interno (50 rpm). Durante la etapa de adsorción la altura del LE alcanza una altura H_2 . Mediante una bomba peristáltica colocada a la salida, el efluente se recoge en pequeñas fracciones de unos 33 mL a través de un colector de tubos Redifrac. Las muestras se agrupan posteriormente en volúmenes de 500 mL para cuantificar la concentración de IgG2a no adsorbido por la técnica de Elisa-Sandwich.
- Lavado del lecho expandido. El lavado del adsorbente para retirar las partículas celulares retenidas se realiza en flujo ascendente con tampón 200 mM de fosfato de sodio a pH 7,5 en las mismas condiciones ($300\text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$, 50 rpm), hasta que la medida de absorbancia a 280 nm indica que no se detectan partículas en el efluente de salida.

Materiales y Métodos

ETAPA	ENTRADA	SALIDA	ALTURA LECHO
Estabilización	Tampón fosfato 200 mM	Tampón fosfato 200 mM	H ₁
Carga	Cultivo hibridoma ratón	Células/restos+tampón	H ₂
Lavado	Tampón fosfato 200mM	Células/restos +tampón+otros	H ₂

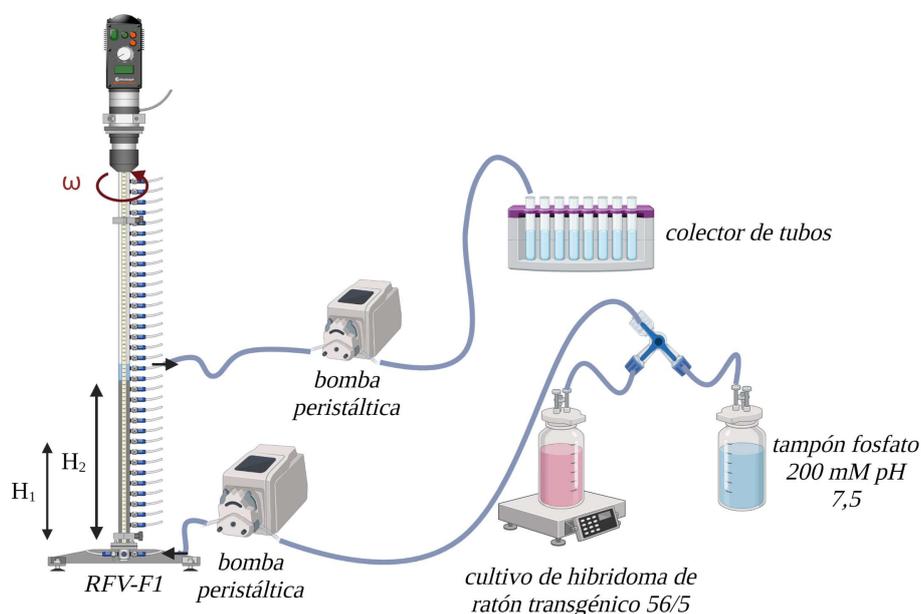


Figura 4.18.- Diagrama de flujo de la etapa de adsorción (estabilización, adsorción y lavado) del anticuerpo IgG2a en el RFV-F1.

b) Elución en lecho sedimentado

La etapa de elución se lleva a cabo en condiciones de lecho empacado (Figura 4.19), a continuación, se describen los pasos llevados a cabo:

- Lecho sedimentado. Se para el motor del cilindro interno y se detienen ambas bombas peristálticas permitiendo que el lecho sedimente.
- Entrada de eluyente. Se configura la entrada del eluyente a través de un puerto situado unos centímetros por encima del tope del lecho sedimentado. Se utilizan secuencialmente dos eluyentes a una velocidad axial de $100 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$. Primero se utiliza una solución tampón de citrato de sodio 100 mM a pH 5 que permite eluir el IgG2a y a continuación se introduce un segundo tampón (citrato de sodio 100 mM a pH 3), en las mismas condiciones.
- Muestreo. El eluato se recoge en un colector de tubos en fracciones de 9 mL. Previamente en los tubos de recolección se adicionan 3 mL de Tris-HCl a pH 8, de

esta forma se eleva el pH de la muestra y se evita el deterioro del anticuerpo. Las muestras se analizan por espectrofotometría a 280 nm.

- Limpieza. Por último, se realiza el protocolo de limpieza de la resina según establece el fabricante de la resina.

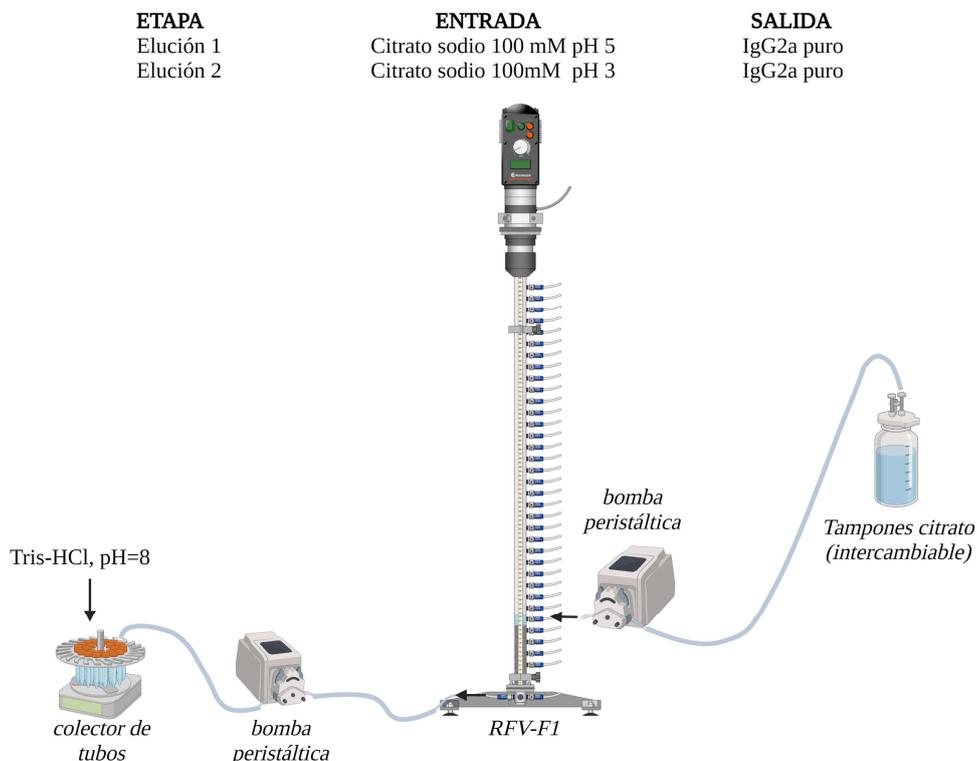


Figura 4.19.- Diagrama de flujo de la etapa de elución del anticuerpo IgG2a en el RFV-F1.

4.8.4. Determinación cualitativa de anticuerpos monoclonales

Para caracterizar los anticuerpos presentes en el caldo de cultivo de hibridoma 55-6, se realiza un análisis de isotipos de inmunoglobulina de ratón (Pierce® Rapid Elisa mouse mAb Isotyping Kit, Thermo Scientific, USA). Este test detecta la presencia de las diferentes clases y subclases de mAbs de ratón tanto de cadena pesada (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgA, IgM) como de cadena ligeras (Kappa y Landa).

Para efectuar el test se sigue el procedimiento detallado por el fabricante. Se siembra la muestra en unas placas de pocillos ELISA, que vienen pre-recubiertas con anticuerpos de captura de una de las clases o subclases que se pueden detectar. La presencia de un

anticuerpo en concreto genera una reacción colorimétrica en los pocillos específicos, que puede observarse de forma directa o bien por espectrofotometría a 450 nm.

4.8.5. Cuantificación de anticuerpos IgG2a.

a) Método Elisa-Sandwich

La concentración de IgG2a en el cultivo celular, en las fracciones de adsorción y de lavado durante el proceso de purificación y en las fracciones del análisis del pH de elución (apartado 4.8.2.) se mide mediante la técnica de análisis ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) tipo Sandwich. Se trata de un análisis en placa para detectar y cuantificar una proteína específica, en este caso IgG2a en una mezcla compleja. En este test las moléculas de anticuerpo IgG2a se unen a la base de la placa a través del anticuerpo primario (previamente fijado en la placa). La posterior unión con el anticuerpo secundario permite su detección por adsorbancia a 450 nm ya que este está conjugado con HRP. El análisis ELISA-Sandwich se caracteriza por una elevada especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de la señal que genera.

Todos los productos utilizados son de la casa comercial Bethyl Laboratories Inc (EE.UU.). Para el análisis se utilizan placas de 96 pocillos, según el siguiente procedimiento:

Preparación de la placa

- En cada pocillo se añaden 100 μ L de un anticuerpo primario de ratón anti-IgG (Mouse IgG-Fc Antibody, ref. A90-131).
- La placa se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C).
- Los pocillos se lavan 5 veces con solución de lavado (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 8, ref. E106).
- Se añaden 200 μ l de solución de bloqueo en cada pocillo (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% ASB, pH8, ref. E104).

Materiales y Métodos

- La placa se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se lavan los pocillos nuevamente 5 veces con solución de lavado (ref. E106).

Siembra en placa con la muestra, blancos y patrones de referencia

- En las dos primeras columnas de pocillos se añaden concentraciones conocidas del anticuerpo puro de IgG2a (ref. MI10-103).
- A dos de los pocillos no se les añade nada, serán utilizados como blanco.
- En las 9 columnas restantes se añaden las muestras, por duplicado, previamente diluidas si es necesario, para que la concentración de las muestras esté dentro del rango del análisis (7,8 - 500 ng de IgG·mL⁻¹). Los anticuerpos IgG2a presentes se unen al anti-IgG primario que recubre los pocillos y quedan retenidos.

Detección

- La placa se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Se lavan los pocillos 5 veces con solución de lavado (ref. E106).
- A cada pocillo se le añaden 100 µl de anticuerpo secundario de ratón anti-IgG conjugado con HRP (enzima peroxidasa de rábano picante, ref. A90-131P) que se une al anticuerpo IgG2a retenido en la placa, marcándolo a través del HRP.
- Incubación de la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. En ese tiempo los pocillos se tiñen de azul-morado según el contenido de anticuerpo presente en cada uno.
- Se lavan 5 veces los pocillos con solución de lavado (ref. E106).
- A cada pocillo se le añaden 100 µl de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina en un tampón ligeramente ácido, ref. E102).
- La placa se incuba durante unos 15 minutos en oscuridad. Los pocillos se teñirán de amarillo en función de la concentración de anticuerpo presente en cada uno de ellos.

- Se para la reacción añadiendo 100 μl de solución stop (0,18M H_2SO_4 , ref. E115) en cada pocillo.
- Se mide la absorbancia a 450 nm en cada pocillo a través de un lector de placas Synergy MX Bio Tek (EEUU). La recta de calibrado para la interpretación de estas medidas se realiza in-situ utilizando los patrones de diferente concentración sembrados en la placa.

b) Cuantificación de IgG2a por espectrofotometría

Las fracciones obtenidas en la etapa de elución del RFV-F1 se analizan por espectrofotometría a 280 nm. Para determinar la recta de calibrado se preparan 15 disoluciones con concentraciones que van desde 10 hasta 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a partir del patrón de IgG2a puro de concentración 1mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ (ref. MI10-103, Bethyl Laboratories Inc, EE.UU.). La recta de calibración obtenida se ajusta a la siguiente ecuación:

$$[\text{IgG2a}] (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = 626,34 \cdot A_{280} - 14,739 \quad r^2 = 0,9982 \quad (4.22)$$

donde [IgG2a] ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) es la concentración de IgG2a, y A_{280} es el valor de la absorbancia medida a una longitud de onda de 280 nm.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Diseño del RFV enfocado a la purificación de biomoléculas en LE

El objetivo principal del diseño es que el RFV-LE pueda ser utilizado en procesos de purificación de proteínas a partir de caldos o extractos sin clarificar o poco clarificados y que sea capaz de competir con los diseños actualmente comercializados. El diseño debe ser versátil como para poder lograr, mediante manipulación de las variables de operación, no sólo mejoras en la fluidodinámica sino, además, un buen contacto entre la proteína y el adsorbente y tiempos de residencia adecuados que permitan la adsorción y purificación de las proteínas.

Con este fin, se diseña un nuevo RFV enfocado a la adsorción de proteínas en LE y elución en lecho sedimentado teniendo como modelo el utilizado por Ibáñez-González y Cooney (2007) que medía 14,7 cm y era capaz de adsorber de forma eficaz a una velocidad axial de $100 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ con la resina Streamline DEAE (Figura 2.9).

Las diferencias más significativas del nuevo RFV con respecto al utilizado por Ibáñez-González y Cooney (2007) son las siguientes:

- la longitud del RFV-LE se alarga a 1 metro para poder trabajar a velocidades axiales superiores a $100 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$,
- en la carcasa externa se colocan válvulas de salida cada 2 cm que permiten cambiar el puerto de salida en función de variación de la altura del LE con respecto a la velocidad axial y altura del lecho sedimentado, y
- el cilindro interno al ser de 1 m de longitud se une a la base del RFV mediante un rodamiento, para mantener la firmeza entre los cilindros concéntricos.

La actual competencia del RFV lo constituyen las columnas comerciales de plato poroso o malla (Cytiva) y de distribuidor de aspas (Upfront Chromatography). Entre las resinas que se utilizan específicamente (densidad superior a la del agua para que puedan ser fluidizadas) destacan las resinas Streamline comercializadas por la empresa Cytiva, las resinas UpFront comercializadas por la empresa del mismo nombre y las resinas Relisorb/EB de la empresa Residion S.R.L., entre otras. En las columnas de plato poroso se utilizan las resinas Streamline y Relisorb/EB, siempre con extractos clarificados (filtrados o centrifugados). El tamaño de los poros del plato poroso tiene que ser inferior

al tamaño de las partículas de resina, no se puede utilizar caldos de cultivo o extractos sin clarificar y es un desafío evitar la formación de canales preferentes o espacios muertos dentro de ellas (Anspach et al., 1999). Las columnas UpFront llevan en la base un distribuidor de aspas perforado que gira, por los orificios sale el extracto biológico (Arpanaei et al., 2008). El giro de las aspas evita la formación de canales preferentes y permite trabajar con extractos clarificados y sin clarificar. El inconveniente es que puede romper las resinas Streamline y Relisorb/EB por lo que solo puede trabajar con sus propias resinas que son más resistentes físicamente, de un tamaño más pequeño y de mayor densidad que las resinas comercializadas por otras empresas, pero también son más caras. El RFV-LE se diseña para que pueda trabajar con todo tipo de adsorbentes específicos para lecho expandido y a todas las velocidades de rotación del cilindro interno aplicables, ya que los vórtices que se generan son mucho más suaves que el giro del aspa. El nuevo RFV-LE sigue manteniendo un orificio de 2 mm de diámetro a la entrada para utilizar caldos de cultivo o extractos sin clarificar. El LE se mantiene sin espacios muertos ni canales preferentes gracias a los vórtices generados. El resultado del diseño es el reactor que se muestra en la Figura 4.2. que, siguiendo los criterios de la oficina española de patentes y marcas, cumple los requisitos de ser una invención novedosa, no obvia a un experto en la correspondiente tecnología y susceptible de aplicación industrial (Ibáñez González et al., 2015).

5.2. Caracterización del lecho expandido en el RFV

5.2.1. Estudio de estabilidad del lecho expandido formado en el RFV

Para conseguir un lecho fluidizado o expandido estable las partículas sólidas de resina deben ser sometidas al empuje de un fluido en dirección axial que sea capaz de mantener las partículas en suspensión, sin que estas lleguen a ser arrastradas por el fluido. La velocidad mínima de fluidización (u_{mf}) corresponde a la velocidad superficial mínima a la que debe circular un líquido, en sentido ascendente, a través de un lecho de adsorbente sedimentado, para lograr que este se expanda y, por lo tanto, aumente su porosidad. Si se sigue aumentando la velocidad superficial del líquido, las partículas de sólido ya

suspendidas pueden modificar aún más la separación entre sí, hasta que, sobrepasando cierto valor de la velocidad superficial axial del fluido de entrada se llega a la elutriación o arrastre de las partículas más pequeñas del sólido; a esta velocidad se la denomina velocidad terminal o de arrastre (u_t). Entre ambas velocidades hay multitud de estados intermedios en los que el lecho se mantiene fluidizado.

Para el cálculo de u_t se utiliza la ley de Stokes, para flujo laminar de una partícula esférica en un fluido viscoso (ecuación 5.1).

$$u_t \text{ (cm} \cdot \text{h}^{-1}\text{)} = \frac{(\rho_p - \rho) \cdot d_{p\text{min}}^2 \cdot g}{18 \cdot \nu} \quad (5.1)$$

donde ρ_p es la densidad de las partículas de adsorbente ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), ρ es la densidad del líquido ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), $d_{p\text{min}}$ es el diámetro mínimo de las partículas de adsorbente (m), g es la aceleración gravitacional ($\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$) y ν es la viscosidad del líquido ($\text{Pa} \cdot \text{s}$).

Por su parte, para el cálculo de la velocidad mínima de fluidización se utiliza la ecuación definida por Levenspiel (1984) :

$$u_{\text{mf}} \text{ (cm} \cdot \text{h}^{-1}\text{)} = \frac{(\rho_p - \rho) \cdot d_p^2 \cdot g}{1650 \cdot \nu} \quad (5.2)$$

donde d_p es el diámetro medio de las partículas de adsorbente (m).

En la Tabla 5.1 se muestra los valores de velocidad mínima de fluidización y velocidad terminal estimados, teniendo en cuenta las propiedades físicas de cada adsorbente cuando el fluido que se introduce axialmente tiene propiedades físicas (densidad y viscosidad cinemática) similares a la del agua ($1000 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ y $10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).

Como se desprende de la Tabla 5.1, las velocidades superficiales de fluido axial que acotan el funcionamiento de los RFV empleados, se encuentran en rangos similares, que van desde $9,7$ a $364 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ cuando se trabaja con rProtein A y $17,1$ a $392,4 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ cuando se trabaja con DEAE.

Resultados y Discusión

Tabla 5.1-. Propiedades físicas de los adsorbentes utilizados en los RFV y estimación de ambas velocidades: terminal (Ecuación 5.1) y mínima de fluidización (Ecuación 5.2).

Adsorbente	ρ_p	d_p	d_{pmin}	u_{mf}	u_t
Streamline	($kg \cdot m^{-3}$)	(m)	(m)	($cm \cdot h^{-1}$)	($cm \cdot h^{-1}$)
DEAE	1200	$200 \cdot 10^{-6}$	$100 \cdot 10^{-6}$	17,1	392,4
rProtein A	1300	$123 \cdot 10^{-6}$	$80 \cdot 10^{-6}$	9,7	364,0

El principal objetivo de fluidizar el lecho de adsorbente es para que no aumente la caída de presión por obstrucción y resulte más eficiente en el proceso de adsorción. En este trabajo se ensaya el efecto en la porosidad del LE estable para tres velocidades de flujo axial diferentes: 100, 200 y 300 $cm \cdot h^{-1}$. Las velocidades evaluadas se encuentran dentro del rango de velocidades de flujo axial acotado por la velocidad mínima de fluidización y la velocidad terminal para la resina DEAE. Cada una de las velocidades se prueban para tres alturas de lecho sedimentado diferentes: 10, 20 y 30 cm (Tabla 4.6). La estabilización del lecho se logra con la velocidad de giro del cilindro interno, fijada en 25 rpm. Se mide la altura del LE estable (H_1) para poder calcular la porosidad (ϵ) en cada uno de los casos (ecuación 4.10). La Tabla 5.2 muestra la altura del lecho sedimentado y la porosidad para cada velocidad axial y altura del LE evaluadas en el caso del RFV-F3 y la resina Streamline DEAE. Un análisis ANOVA de dos vías para dos factores (U y H_0) permite identificar que, los valores medios de altura del LE difieren entre diferentes velocidades axiales (U) y entre alturas iniciales del lecho (H_0) con un nivel de confianza de la prueba del 95%. Observando cada altura del lecho empacado para cada valor de la velocidad axial, se obtienen porosidades medias estadísticamente diferentes (ANOVA, $p < 0,05$).

En los resultados de la Tabla 5.2 puede observarse que, para cada altura inicial del lecho sedimentado, los mayores valores de altura de LE estable (H_1) se alcanzan con la mayor velocidad de flujo axial, puede descartarse la influencia de la altura inicial del lecho de adsorbente sobre la porosidad final del LE estable dado que sus medias no presentan diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

Resultados y Discusión

Tabla 5.2.- Altura estable y porosidad del LE en el RFV-F3 para diferentes combinaciones de velocidad axial y altura inicial del adsorbente Streamline DEAE sedimentado. La velocidad de rotación del cilindro interno se mantiene constante a 25 rpm.

U (cm·h ⁻¹)	H ₀ (cm)	H ₁ (cm)	ε
	10	15,4±0,2	0,61±0,01
100	20	33,3±0,5	0,64±0,01
	30	50,0±0,4	0,64±0,00
	10	19,1±0,3	0,69±0,00
200	20	41,8±1,6	0,71±0,01
	30	60,5±0,3	0,70±0,00
	10	25,8±0,6	0,77±0,01
300	20	56,8±2,5	0,79±0,02
	30	76,0±0,5	0,76±0,00

La estabilización del LE es fundamental en las diferentes aplicaciones, para evitar la presencia de canales preferentes y que el fluido circule rápidamente hacia arriba, y así permitir que exista un contacto eficiente con el adsorbente. Un estudio previo realizado con la resina Streamline DEAE (Ibáñez-González y Cooney, 2007), afirma que cuando se trabaja con un RFV de relación de aspecto 14,6 en el rango de velocidades axiales de 100 a 300 cm·h⁻¹ y fracciones de volumen de partículas de Streamline DEAE menores o iguales a 0,31, el flujo axial es el responsable de la formación del LE en el RFV, mientras que la rotación del cilindro interno (por debajo de 50 rpm) influye en la estabilización de las partículas en suspensión. De esta forma, cuando solo hay flujo axial el lecho no se mantiene estable, puesto que se observa la formación de canalizaciones o canales preferentes en el espacio anular y disminuye la capacidad dinámica de adsorción de la resina, debido a un contacto deficiente entre la biomolécula de interés y el adsorbente. En los experimentos aquí realizados, una velocidad de rotación del cilindro interno pequeña (25 rpm), es suficiente para lograr la estabilidad del LE de Streamline DEAE.

Dado que los datos experimentales de la Tabla 5.2 nos indican que la porosidad del LE depende únicamente de la velocidad superficial del fluido y, teniendo en cuenta que, para una velocidad mínima de fluidización la porosidad del lecho es 0,4,, se pueden correlacionar estos datos para partículas uniformes mediante la ecuación 5.3 (Li and Chase, 2009a; Richardson and Zaki, 1954):

$$U \text{ (cm} \cdot \text{h}^{-1}\text{)} = u_t \cdot \varepsilon^n \quad (5.3)$$

donde n es el coeficiente de Richardson y Zaki (1954) y u_t (cm·h⁻¹) es la velocidad terminal. Mediante regresión lineal del log (U) versus log (ε) se obtiene los valores de n y u_t (Tabla 5.3)

Tabla 5.3.- Valores de r^2 , velocidad terminal mediante la ecuación de Richardson y Zaki (1954) y velocidad terminal según la ecuación de Stokes.

Adsorbente	r^2	n	u_t (5.3) (cm·h ⁻¹)	u_t (5.1) (cm·h ⁻¹)
Streamline	0,978	4,41	893,1	392,4

El valor de n (4,41) es próximo al valor 4,65 que predice Richardson y Zaki (1954) para el valor del número Reynolds para la partícula ($Re_p = \rho \cdot d_p \cdot U / \nu$) inferiores a 0,2. Las diferencias obtenidas entre ambas estimaciones de la velocidad terminal sugieren que, para evitar pérdidas de adsorbente imperceptibles visualmente es necesario elegir el rango de velocidades de trabajo en función del valor dado por la ecuación de Stoke (ecuación 5.1), que resulta ser la más conservativa.

Cuando se utilizan 20 cm de la resina Streamline rProteinA sedimentada en el RFV-F1 y se la fluidiza introduciendo agua (u otro fluido de propiedades similares) a 300 cm·h⁻¹ (Tabla 5.4) se alcanzan 47±1 cm de altura de LE estable, para las velocidades de rotación del cilindro interno evaluadas (20, 35, 50 y 75 rpm). Este experimento corrobora que el LE se expande solo debido al flujo axial y que la velocidad de rotación del cilindro interno no contribuye en modo alguno a aumentar la altura del lecho expandido, para el rango de velocidades rotacionales empleado. A partir del balance de materia de la resina se calcula

la porosidad del lecho (ϵ) mediante la ecuación (ecuación 4.10), el valor obtenido es de $0,75 \pm 0,01$ para las condiciones evaluadas.

Aplicando la ecuación de Richardson y Zaki (ecuación 5.3) para una porosidad de 0,75 con los valores de n y de la velocidad terminal calculados para la resina Streamline DEAE se obtiene una velocidad axial de $251 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$, por lo que se obtiene comportamientos diferentes para ambas resinas.

Tabla 5.4.- Altura y porosidad de LE estable (ecuación 4.10) en el RFV-F1 La velocidad superficial axial ($300 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$) y la altura del lecho sedimentado (20 cm) de Streamline rProtein A se mantienen constantes.

ω (rpm)	H_0 (cm)	H_1 (cm)	ϵ
20	20	46 ± 1	$0,74 \pm 0,01$
35	20	48 ± 1	$0,75 \pm 0,01$
50	20	48 ± 1	$0,75 \pm 0,01$
75	20	47 ± 1	$0,75 \pm 0,01$

5.2.2. Predicción del régimen fluidodinámico del lecho fluidizado en el RFV mediante correlaciones referenciadas en bibliografía

La cromatografía de adsorción en lecho expandido está asociada a varias etapas, (Figura 4.3) que requieren configuraciones diferentes del RFV. Durante la estabilización del lecho y la adsorción se opera con el reactor en LE. Dentro de estas etapas, la de adsorción es la más compleja, ya que además de mantenerse un lecho estable, deben generarse las condiciones necesarias para que el adsorbente pueda adsorber la biomolécula de interés. La eficiencia de la adsorción está íntimamente relacionada con el régimen fluidodinámico en el cual opera el RFV, de ahí la importancia de su caracterización. Si la adsorción es eficiente, el lecho puede imaginarse como una sucesión de pequeños volúmenes de resina que retienen la proteína de interés hasta que se llega a la capacidad máxima de adsorción en esas condiciones. Si estas pequeñas unidades del reactor no contienen canales preferentes podrían considerarse reactores mezcla perfecta, la sucesión de reactores mezcla perfecta darían como resultado final un reactor flujo pistón. Por este motivo, cobra

especial importancia caracterizar el régimen del fluido en el RFV en la zona anular, ya que influye en la eficiencia del proceso de adsorción.

Los parámetros que definen el régimen del fluido dentro del espacio anular del RFV son:

- La geometría del reactor (d/r_i),
- las propiedades físicas del fluido (densidad y viscosidad dinámica del alimento),
- la rotación del cilindro interno, y
- la velocidad axial del alimento en sentido ascendente, operando en continuo.

En la Tabla 5.5 se muestra para cada RFV el valor de Ta_c , los valores de Ta para cada velocidad angular empleada, la relación Ta/Ta_c y el régimen que le corresponde, siguiendo la clasificación de la Tabla 2.2 (Moore, 1994; Sczechowski et al., 1995). Estos valores se exponen para todos los ensayos de estabilización del LE realizados (Tabla 5.2 y 5.4) y asumiendo que se utilizan fluidos de trabajo con propiedades físicas similares a las del agua ($\nu=10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).

Para la relación Ta/Ta_c comprendida entre 1 y 15 el régimen se denomina “laminar de vórtices de Taylor” y para relaciones inferiores a 1 el régimen es laminar de Couette-Poiseuille. Todo ello para valores de Re (ecuación 2.2) comprendidos entre 0 y 20.

Tabla 5.5.- Valores del Ta_c , Ta y Ta/Ta_c en función de la velocidad angular y geometría de cada RFV. El régimen del fluido se determina aplicando la clasificación de la Tabla 2.2.

RFV	Ta_c	ω (rpm)	Ta	Ta/Ta_c	Régimen de flujo
RFV-F1	69	20	49	0,7	Couette-Poiseuille
		35	83	1,2	Laminar de vórtices de Taylor
		50	117	1,7	Laminar de vórtices de Taylor
		75	177	2,6	Laminar de vórtices de Taylor
RFV-F3	102	25	253	2,5	Laminar de vórtices de Taylor

Algunos autores (Becker y Kaye, 1962) en lugar de comparar el tipo de régimen con el valor de Ta_c , proponen una expresión denominada Taylor modificado (Ta^*) y construyen una gráfica (Figura 5.1), que permite definir el comportamiento fluidodinámico del sistema en función de dicho número de Taylor modificado (Ta^*), y 2 veces el número de

Reynolds ($2 \cdot Re$). El estudio lo evalúan con datos bibliográficos obtenidos en diferentes trabajos previos (Becker y Kaye, 1962; Cornish, 1933; Fage, 1938; Kaye y Elgar, 1958).

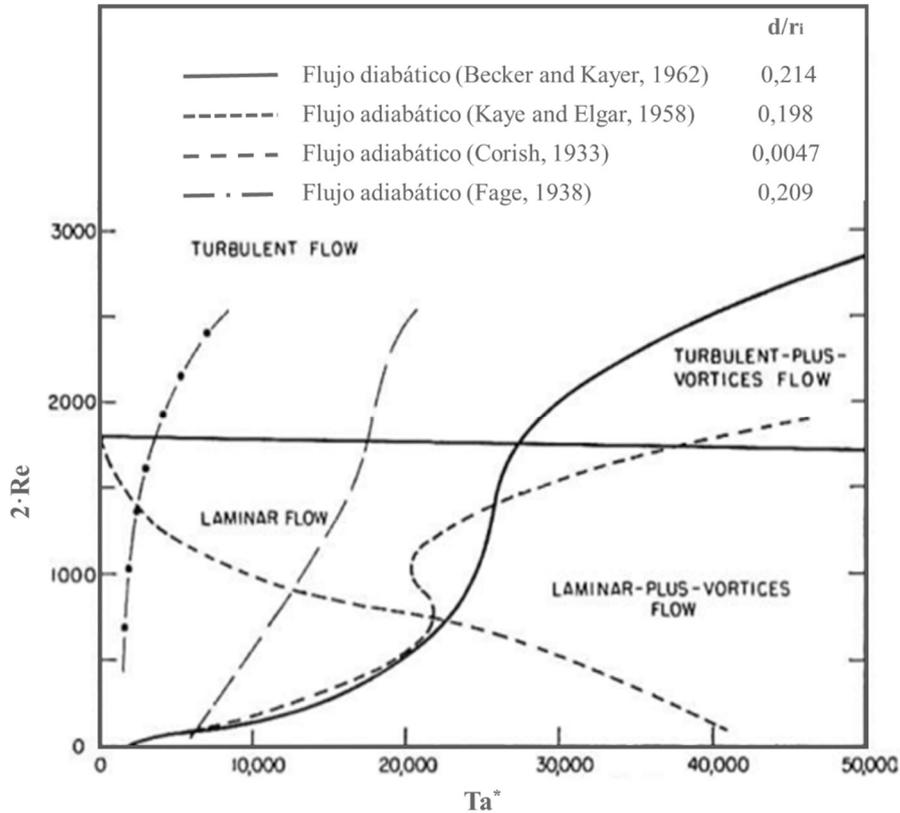


Figura 5.1.- Líneas de demarcación para la establecer regiones de flujo en el espacio anular (Becker y Kaye, 1962).

El número de Taylor modificado (Ta^*) se calcula mediante la ecuación 5.4.

$$Ta^* = \left(\frac{\omega^2 \cdot r_i \cdot d^3}{\nu^2} \right) \cdot \left(\frac{1}{F_g} \right) \quad (5.4)$$

Donde F_g se calcula según la ecuación 5.5, que a su vez depende del parámetro P , que responde a la siguiente expresión (ecuación 5.6).

$$F_g = \frac{\pi^2}{41,2} \left(1 - \frac{d}{2 \cdot r_i} \right)^{-1} P^{-0,5} \quad (5.5)$$

$$P = 0,0571 \left(1 - 0,652 \frac{d}{r_i} \right) + 0,00056 \left(1 - 0,652 \frac{d}{r_i} \right)^{-1} \quad (5.6)$$

Resultados y Discusión

A partir de los valores de Ta^* y $2 \cdot Re$, correspondientes a las variables de operación realizadas en este trabajo con ambos RFV, y utilizando la información gráfica de la Figura 5.1, se predice el régimen del fluido en el lecho fluidizado, el cual se muestra en la Tabla 5.6. Los valores de Ta^* obtenidos dependen de la rotación del cilindro interno, mientras que los valores de Re dependen de la velocidad axial y de la porosidad del LE (ϵ), asumiendo de nuevo que la viscosidad cinemática de fluido es similar a la del agua ($10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).

Tabla 5.6-. Valores de Re , Ta , y Ta^* (en función de la velocidad angular y velocidad axial) y régimen del fluido aplicando la clasificación de la Figura 5.1.

RFV	ω (rpm)	U ($\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$)	Re	Ta	Ta^*	Régimen de Flujo
	20	300	5,5	49	599	Couette-Poiseuille
RFV-F1	35	300	5,5	83	1835	Couette-Poiseuille
	50	300	5,5	117	3744	Laminar de vórtices de Taylor
	75	300	5,5	177	8425	Laminar de vórtices de Taylor
	25	100	2,0	253	12.364	Laminar de vórtices de Taylor
RFV-F3	25	200	3,6	253	12.364	Laminar de vórtices de Taylor
	25	300	4,9	253	12.634	Laminar de vórtices de Taylor

Si se comparan los regímenes de flujo obtenidos según las dos correlaciones empleadas (Tablas 5.5 y 5.6) se hace evidente la coincidencia en las predicciones cuando los valores se alejan de la zona límite ($Ta/Ta_c = 1$ o Ta^* superiores a 3500). Para los casos más cercanos a la frontera (el RFV-F1 operando a 35 rpm y $300 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$) las predicciones difieren, situando la operación bien en régimen laminar Couette-Poiseuille o en laminar con vórtices de Taylor, ya que el reactor estaría operando cerca de la zona límite ($Ta/Ta_c=1,2$, $Ta^* = 1835$). En esta zona pequeños errores de estimación podrían hacer caer la predicción en una zona errónea con mayor facilidad. Una posible fuente de error puede venir dada por la geometría del reactor, ya que la Figura 5.1 se ha construido en base a datos experimentales con RFV cuya relación d/r_i son 0,214, 0,198, 0,209 y 0,0047, muy distintas del valor 0,9 del RFV-F1. En cambio, la relación d/r_i para el RFV-F3 es 0,209, por lo que su geometría estaría representada dentro de la gráfica de la Figura 5.1.

Independientemente de si el tipo de flujo es laminar de Couette o vórtices de Taylor, la estabilidad del LE en este trabajo se logra para ambos tipos de flujo. Dado que el flujo laminar de Couette no implica la formación de vórtices en el reactor, teniendo en cuenta que siempre se ha logrado un LE estable en los experimentos realizados, parece ser que no es estrictamente necesaria la presencia de vórtices para llegar a conseguir la estabilidad en el lecho expandido. Por lo tanto, obtener un lecho estable es condición necesaria pero no suficiente para conseguir un buen contacto entre el adsorbente y la proteína.

5.2.3. Estudio visual del régimen fluidodinámico del RFV

En un proceso de adsorción interesa que exista un buen contacto entre el adsorbente y la biomolécula y, al mismo tiempo, un gradiente de concentración entre las unidades de vórtices adyacentes dentro del RFV. En definitiva, interesa trabajar con diversas unidades de lecho que se comporten como tanques agitados en serie que, en su conjunto, actúan como un flujo pistón. Por este motivo, es fundamental aclarar en qué régimen fluidodinámico se está trabajando. Al trabajar en condiciones ligeramente por encima del T_{ac} , es decir, a bajas revoluciones y con flujo axial bajo, según los datos obtenidos en el apartado anterior (apartado 5.2.2), se obtienen contradicciones en la clasificación del tipo de flujo. Debido a lo cual, se lleva a cabo un estudio visual (materiales y métodos apartado 4.6.5), en el propio reactor RFV-F1, para aclarar su comportamiento en las condiciones evaluadas.

Durante el análisis DTR o de la etapa de adsorción en LE no es posible visualizar las unidades de pares de vórtices, si se forman, porque las partículas de la resina Streamline, ya sean rProtein A o DEAE, no permiten la reflexión de la luz. En cambio, al introducir partículas coloreadas se puede observar a simple vista el movimiento de las mismas. La introducción de las partículas ayuda a discernir el tipo de régimen de flujo que se da para las condiciones concretas de trabajo ya que, según el trabajo de Giordano (2000) concluyeron que, el tipo de flujo que se da en el LE no depende del tipo de partículas que se utilicen.

En este trabajo se introduce un trazador óptico para ayuda a delimitar el tipo de flujo que se presenta en el RFV en aquellas zonas que no está claramente delimitado (Astill, 1964;

Resultados y Discusión

Lueptow et al., 1992; Parker y Merati, 1996; Wereley y Lueptow, 1999). Esto es lo que ocurre en el RFV-F1 cuando opera con rotación del cilindro interno a 35 rpm ($Ta/Ta_c = 1,2$). El trazador utilizado es una suspensión de partículas coloreadas (1% en peso), fáciles de observar y, que además, tienen unas propiedades que puede asemejarse en viscosidad y densidad a las del fluido principal (agua).

En la Figura 5.2 se muestran las fotografías del RFV-F1 a $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ y distintas velocidades de rotación del cilindro interno una vez introducidas las partículas coloreadas. Como puede observarse, cuando se trabaja a una velocidad de rotación del cilindro interno de 20 rpm (Figura 5.2.a) no se forman vórtices, lo que correspondería a un régimen laminar de Couette- Poiseuille. Cuando las revoluciones se aumentan (Figuras 5.2.b, c y d) puede observarse que existen vórtices a 35, 50 y 75 rpm. Las observaciones indican que a estas velocidades de rotación se trabaja en un régimen laminar de vórtices de Taylor.

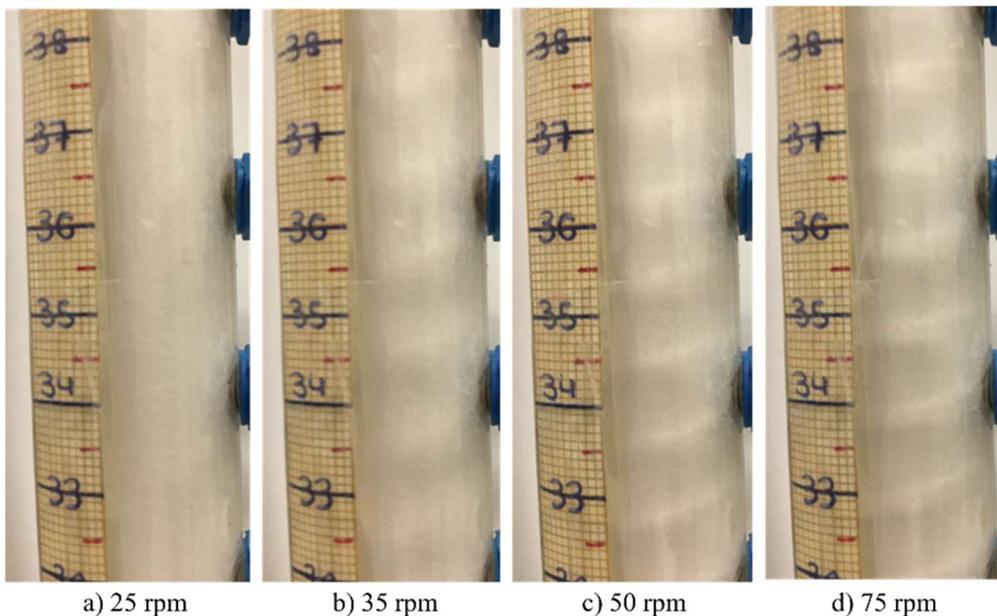


Figura 5.2.- Comportamiento de un trazador óptico (partículas de mica plateada en suspensión acuosa al 1% p/p), en el RFV-F1 a una velocidad axial de $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ y diferentes velocidades de rotación del cilindro interno (20, 35, 50 y 75 rpm). a) Flujo laminar de Couette- Poiseuille, b), c) y d) Flujo laminar de vórtices de Taylor.

El valor del número de Reynolds en la zona anular, para este experimento, se calcula asumiendo propiedades similares a las del agua, arrojando un valor de 3,75 para una velocidad axial de $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$. Se han comparado los resultados obtenidos en el ensayo visual con las predicciones a partir de los modelos teóricos indicados anteriormente (Becker and Kaye, 1962; Lee and Lueptow, 2001). Puede observarse concordancia entre las predicciones realizadas a partir de la relación Ta/Ta_c (Tabla 5.5) y la relación entre Ta^* y $2\cdot Re$ (Tabla 5.6), para todas las velocidades de rotación excepto para 35 rpm. En este caso, las observaciones de la formación de vórtices coinciden solamente con la predicción del régimen mostrada en la Tabla 4.5, correlación de Lee y Lueptow (2001).

La visualización del movimiento de la suspensión de las partículas del trazador óptico dentro del RFV permite describir con más fiabilidad cuando se da la aparición de los vórtices. En la Figura 5.3 se observa cómo es el efecto de la circulación de las partículas coloreadas en una sección del fluido en el plano axial. Los vórtices (líneas de corriente cerradas que se han representado en la figura con recorrido circular) llenan el compartimiento delimitado por las paredes del cilindro interno que giran y el cilindro externo estático. Desplazando la vista en dirección axial, puede observarse que los vórtices de cada nivel de altura giran en direcciones opuestas, como si estuvieran acoplados. Se denomina “una unidad de pares de vórtices” a cada conjunto de 2 vórtices alternos que giran en direcciones opuestas, a modo de engranaje. Sí bien los vórtices no son fácilmente observables con el trazador, sí es posible determinar su tamaño. Dado que los vórtices se asemejan a un engranaje, existe una zona de “acercamiento” o frontera, hacia donde confluyen las líneas de movimiento de los vórtices. Esta línea se puede observar en el experimento como una concentración de partículas que parecen formar un anillo o “donut” que se repite regularmente en diferentes alturas en el reactor. La distancia entre estos donuts es aproximadamente de 0,9 cm (Figura 5.3), por lo que el ancho de cada vórtice es de aproximadamente 0,45 cm.

Los vórtices han sido descritos como el flujo que existe en la zona anular debido a la aparición de inestabilidades, gracias al aumento de la velocidad de rotación del cilindro interno (Taylor, 1923), y el tamaño de los vórtices observados coincide con el que predice el autor en su trabajo (coincide aproximadamente con la distancia entre ambos cilindros).

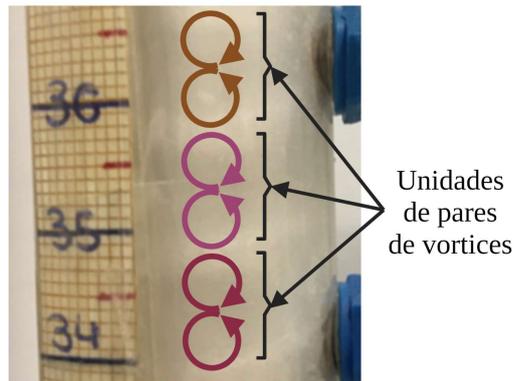


Figura 5.3.- Identificación de las unidades de pares de vórtices formadas en el régimen laminar vórtices de Taylor.

En varios estudios científicos se encuentran minuciosos análisis y predicciones de las distintas formas y tamaños que los vórtices pueden ir adquiriendo a medida que se alejan del flujo laminar hacia el flujo turbulento (Kataoka et al., 1975; Lueptow et al., 1992; Taylor, 1923; Wereley and Lueptow, 1999). Los estudios concuerdan en que la transición entre un tipo de vórtice a otro puede predecirse de acuerdo a la velocidad a la cual los vórtices se desplazan con respecto al flujo axial (velocidad de deriva), para una geometría de reactor determinada. En un segundo ensayo visual realizado en este trabajo, se mide la velocidad de deriva de la unidad de pares vórtices (ecuación 4.15), para las velocidades de rotación del cilindro interno de 35, 50 y 75 rpm. Para poder distinguir el trayecto de los vórtices formados es necesario inyectar como trazador un pulso de partículas intensamente coloreadas en un lecho líquido en movimiento. Al inyectar las partículas se produce una separación natural de las mismas por tamaño, donde las más pequeñas son arrastradas con el fluido y quedan atrapadas en la unidad de pares de vórtices, mientras que las partículas más grandes se dirigen a la base del reactor, donde sedimentan. La aplicación de la ley de Stokes (ecuación 5.1), permite determinar el tamaño de partículas que pueden ser arrastradas trabajando en las condiciones impuestas. Se determina que las partículas coloreadas de mica con diámetro igual o inferior a $31 \mu\text{m}$ se encuentran atrapadas moviéndose dentro de las unidades de pares de vórtices. Para estas partículas se determina que la velocidad de deriva es de 1,2. Estos resultados están en concordancia con los encontrados en bibliografía, que reportan que la velocidad de deriva tiende a estar alrededor de 1,2 para una relación de radios de 0,95 en el régimen laminar vórtices de

Taylor (Snyder, 1962) y entre 1 y 1,4 para una relación de radios de 0,85 (Lueptow et al., 1992). La velocidad de deriva aumenta a valores comprendidos entre 1,5 y 1,8 cuando el régimen de flujo cambia a un flujo laminar de vórtice helicoidal (Lueptow et al., 1992). Específicamente, la transición de un régimen de laminar de vórtices de Taylor a laminar con vórtices helicoidales para una relación de radios de 0,5, valor similar al del reactor RFV-F1 ($\eta = 0,53$), se produce cuando el número de Reynolds es superior a 24 (Lueptow et al., 1992). De esta forma, tanto la observación de los vórtices formados como la velocidad de deriva de las unidades de vórtices confirmarían que el RFV-F1, operando con un número de Reynolds de 5,5 y relaciones Ta/Ta_c por debajo de 2,5, trabaja en un régimen laminar de vórtices de Taylor, coincidiendo con las predicciones de (Lee and Lueptow, 2001).

5.3. Caracterización del patrón de flujo para el fluido axial circulando a través del RFV-LE

5.3.1. Estudio de la distribución de tiempos de residencia

El movimiento del fluido a través de las partículas suspendidas en el RFV determina cuánto tiempo están en contacto el fluido y el adsorbente durante la etapa de adsorción en lecho fluidizado. En el flujo pistón ideal cada elemento de fluido permanece en el reactor el mismo tiempo, es decir, que todos los elementos de fluido entran y se desplazan por el reactor en un frente plano, saliendo por el tope del reactor en un tiempo igual al tiempo medio de residencia.

Los parámetros que influyen en el comportamiento de la fase líquida en el RFV-LE son similares a los de una columna cromatográfica, más la variable adicional de la rotación del cilindro interno, siendo en su conjunto:

- la relación de aspecto, H/d ;
- propiedades del adsorbente;
- la velocidad superficial axial del fluido (U);
- la velocidad de rotación del cilindro interno (ω).

Para poder caracterizar el régimen del fluido axial, cuando circula a través del lecho en la zona anular del RFV-LE, se introduce acetona como soluto de la disolución acuosa del fluido alimentado. La acetona es inerte y tiene un tamaño pequeño que le permite no solo moverse con facilidad entre las partículas expandidas sino además penetrar en sus poros, además se detecta por métodos espectrofotométricos. Los ensayos de distribución del tiempo de residencia (DTR), descritos en el apartado 4.6.1, se realizan para ambos RFV introduciendo el trazador en el reactor como un salto en escalón. La perturbación en escalón se asemeja a lo que ocurre en la etapa de adsorción donde la entrada del alimento se realiza de forma continua en el RFV-LE. Las condiciones de trabajo impuestas (Tabla 4.6) cubren la zona de operación del reactor que se desea estudiar para que el régimen fluidodinámico sea el adecuado para los procesos de adsorción.

Si el flujo del fluido axial se desarrolla en flujo pistón ideal la curva de la función de salida es también una función escalón. En la Figura 5.4 y 5.5 se muestran gráficamente los resultados de los ensayos DTR realizados a cada uno de los RFV. La Figura 5.4 compara, para una misma velocidad angular, el resultado de variar la velocidad axial y la altura de lecho sedimentado. Las diferentes alturas de LE derivadas de estos parámetros se traducen en configuraciones del reactor con diversas relaciones de aspecto (H/d). En la Figura 5.4 se puede observar que trabajando a $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ las curvas de la función de salida tienen las pendientes más abruptas para todas las alturas de lecho sedimentado iniciales, mientras que a las demás velocidades (100 y $200 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$) las curvas son más similares entre sí. Esto se cumple en todos los casos, excepto para el caso del lecho de menor altura (10 cm), donde sí que se observan claras diferencias en la función de salida. Por otro lado, en la Figura 5.5 se muestran los resultados obtenidos cuando se fija la velocidad axial y la altura de lecho sedimentado y se utilizan distintas velocidades angulares, estas variables repercuten en la relación Ta/Ta_c .

Resultados y Discusión

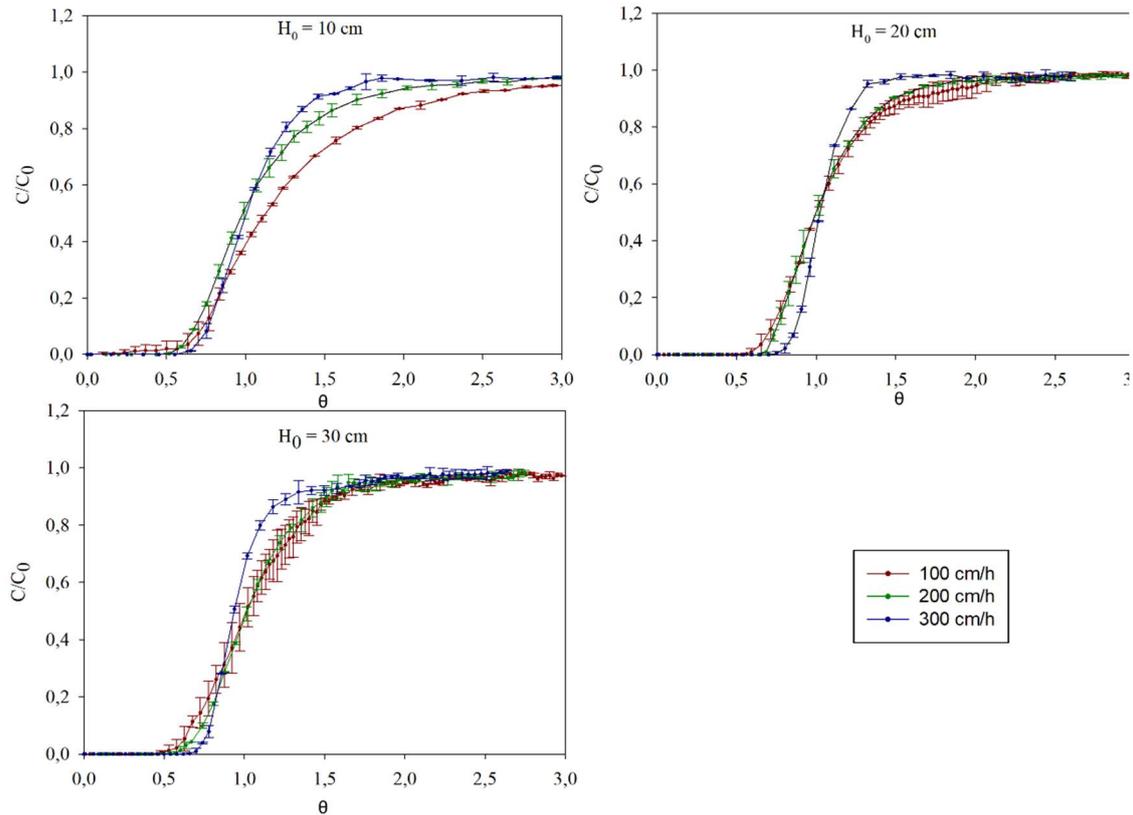


Figura 5.4.- Representación de la evolución de la concentración de acetona a la salida del reactor respecto a la concentración del alimento (C/C_0) frente al tiempo adimensional (θ). RFV-F3 y resina Streamline DEAE.

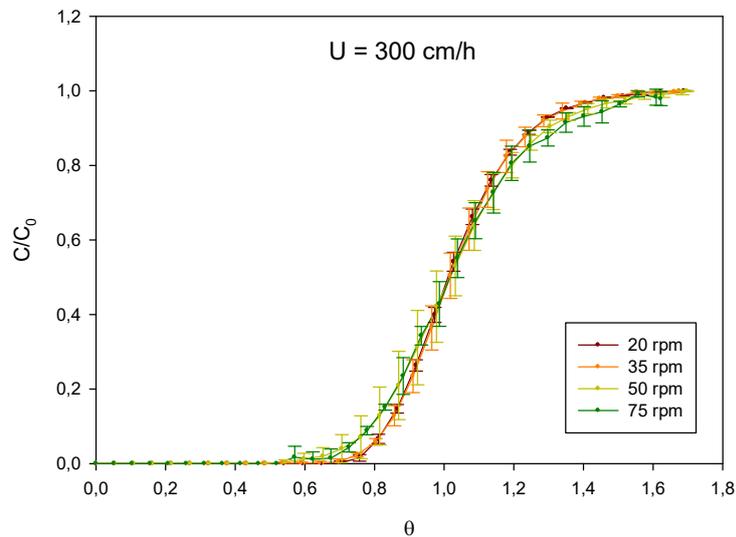


Figura 5.5.- Representación gráfica de la evolución de la concentración de acetona a la salida del reactor respecto a la concentración de la corriente de entrada (C/C_0) frente al tiempo adimensional (θ). RFV-F1 y resina Steramline rProtein A.

El análisis de la DTR (Tabla 5.7), muestra que el tiempo de residencia medio aumenta proporcionalmente con la altura de lecho sedimentado e inversamente con la velocidad axial. De este modo, y como es lógico pensar, a la menor velocidad axial empleada y utilizando el LE estable de mayor altura se obtiene el mayor tiempo de residencia ($27,1 \pm 1$ min). Si se observa la variación del tiempo de residencia con respecto a la altura del lecho, para cada grupo de velocidades ensayadas ($100, 200$ o $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$) por separado, puede observarse una dependencia más pronunciada entre el tiempo de residencia y la altura inicial del lecho sedimentado cuando la fluidización es a $100 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$. Para entender este efecto es necesario comprender que el tamaño de las partículas es heterogéneo y el lecho en realidad está compuesto por una distribución de diversos tamaños de partículas. Cuando comienza la fluidización las partículas se acomodan a lo largo de la longitud del reactor según su tamaño, de modo que, el lecho de la zona inferior tendrá un tamaño de partícula medio mayor y estará menos fluidizado que el siguiente, y así sucesivamente. Cuando las moléculas del fluido se encuentran con un lecho poco fluidizado ($100 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$), es más posible que encuentren caminos preferentes y se dirijan directamente hacia arriba en lugar de seguir caminos más sinuosos. En estos sistemas para aumentar el tiempo de residencia es más efectivo alargar el camino hacia arriba agregando más partículas, o lo que es lo mismo, aumentando la altura del lecho inicial sedimentado, respecto a los lechos que ya se encuentran totalmente expandidos, como sería cuando se trabaja a 200 y a $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$.

Por otra parte, los tiempos de residencia para condiciones de velocidad axial fija ($300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$) y una misma altura del lecho sedimentado (20 cm), se mantienen aproximadamente constantes cuando se varía la rotación del cilindro interno para el rango estudiado (de 20 a 75 rpm).

La varianza adimensional (σ_{θ}^2) establece si todos los elementos de fluido que entran juntos al reactor salen a la misma vez (varianza 0) o, por el contrario, existe una distribución de edades de estos elementos a la salida. Valores de varianza adimensional pequeños (Tabla 5.7), como los calculados para todos los experimentos, indicarían que los elementos presentan desviaciones pequeñas con respecto a un flujo pistón ideal. En estos casos es posible cuantificar el grado de mezcla utilizando un modelo de un parámetro, como es el modelo de dispersión axial, que superpone al modelo ideal de flujo pistón un cierto grado de dispersión axial, es decir, de retromezcla.

Resultados y Discusión

Tabla 5.7.- Valores Ta/Ta_c , relación de aspecto, varianza, tiempo residencia medio y varianza adimensional para las diferentes combinaciones de velocidad axial y altura de lecho inicial evaluadas en el RFV-F3 con el adsorbente Streamline DEAE y para las diferentes rotaciones del cilindro interno en el RFV-F1 con el adsorbente Streamline rProtein A.

RFV	U_0 ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)	H_0 (cm)	ω (rpm)	Ta/Ta_c	Γ	σ^2 (min^2)	\bar{t} (min)	σ_θ^2
		10	25	2,5	34,2	$26,5 \pm 4,7$	$10,2 \pm 2,1$	0,255
	100	20	25	2,5	74,1	$65,9 \pm 13,6$	$22,2 \pm 0,5$	0,134
		30	25	2,5	111,1	$94,0 \pm 3,0$	$27,1 \pm 1,1$	0,128
		10	25	2,5	43,2	$10,3 \pm 1,9$	$8,4 \pm 0,1$	0,146
RVF-F3	200	20	25	2,5	92,0	$18,4 \pm 0,5$	$13,9 \pm 0,4$	0,095
		30	25	2,5	133,3	$42,7 \pm 7,2$	$19,4 \pm 0,7$	0,113
		10	25	2,5	58,0	$3,9 \pm 0,3$	$6,6 \pm 0,0$	0,090
	300	20	25	2,5	127,0	$8,3 \pm 0,7$	$12,8 \pm 0,0$	0,051
		30	25	2,5	166,7	$23,9 \pm 1,5$	$16,7 \pm 0,1$	0,086
	300	20	20	0,7	104,4	$7,8 \pm 0,4$	$12,3 \pm 0,2$	0,052
	300	20	35	1,2	104,4	$7,8 \pm 0,3$	$12,4 \pm 0,4$	0,051
RFV-F1	300	20	50	1,7	104,4	$8,1 \pm 0,9$	$12,3 \pm 0,6$	0,054
	300	20	75	2,6	104,4	$11,5 \pm 1,8$	$12,7 \pm 0,4$	0,071
	300	*	40	1,4	104,4	$8,2 \pm 0,4$	$14,4 \pm 0,1$	0,040

5.3.2. Explicación del patrón de flujo del fluido axial a través del RFV-LE mediante el modelo de dispersión axial

Los resultados de los ensayos DTR (específicamente la varianza adimensional) se utilizan en el modelo de dispersión axial (ecuación 4.7 y 4.9) para calcular el número de Péclet (Pe) (Tabla 5.8) en diversas condiciones de trabajo del RFV. En el caso del RFV-F3, para cada altura inicial de lecho sedimentado (10, 20 ó 30 cm) y cada velocidad de entrada del flujo axial (100, 200 y 300 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$), el valor del número de Pe presenta medias estadísticamente diferentes (ANOVA, $p=0,05$). Puede observarse que el número de Pe aumenta con la velocidad superficial para cada una de las alturas de lecho empacado evaluadas. Estos resultados coinciden con lo referenciado en bibliografía para diferentes sistemas de lecho expandido (Li and Chase, 2009b; Li et al., 2004; Thömmes et al., 1996; Tong et al., 2003; Tong and Sun, 2002). Para el RFV-F1 puede observarse que los valores de Pe se mantienen en torno a 42 ± 6 para velocidades de rotación de 20, 35 y 50 rpm. Cuando se aumenta la velocidad angular a 75 rpm, el número de Péclet desciende a 30, como consecuencia del aumento de la mezcla en el interior de las unidades de los pares de vórtices, que va asociado con un aumento de la retromezcla entre las mismas, ayudado por el movimiento ascendente del fluido axial. Para una columna de LE empleando como adsorbente esta misma resina (Streamline rProtein A), a una velocidad de fluido axial de 300 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$, se reporta en bibliografía un valor de $Pe = 15$ (Thömmes et al., 1996). En el RFV-F1 se obtienen valores significativamente superiores, lo cual indicaría la ventaja comparativa de incluir la rotación del cilindro interno del RFV, ya que los vórtices formados generan un LE bastante estable sin canalizaciones ni espacios muertos.

Cuando se comparan los experimentos que parten de una misma altura de lecho sedimentado (20 cm), a los que se impone la misma velocidad axial (300 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$), y la misma relación Ta/Tac (2,5; esta se obtiene para el RFV-F1 con rotación a 75rpm y para el RFV-F3 con rotación de 25 rpm), se puede observar que el número de Péclet es 30 para el RFV-F1 ($\Gamma=92$) y 44 para el RFV-F3 ($\Gamma=127$). La marcada diferencia en el número de Pe entre los dos experimentos sugiere que cuanto mayor sea la relación de aspecto (Γ) mayor es el Pe . Esto es debido a que existe un mayor número de unidades de pares de vórtices en la dirección axial, que mejoran consecuentemente el comportamiento acercándose más a un flujo pistón. Sin embargo, no puede descartarse el efecto provocado

por el hecho de trabajar con dos resinas distintas (Streamline rProtein A en el RFV-F1 y Streamline DEAE en el RFV-F3). Ambas resinas tienen tamaños de partícula diferentes, ocupan diferentes fracciones del espacio anular y se expanden en distinta medida, por lo que se infiere que la presencia de partículas podría afectar de modo diferente en el camino del fluido. De la misma forma, con la resina Streamline rProtein A, debido a que son partículas más pequeñas, hay un mayor número de partículas de adsorbente por unidad de volumen, que contribuyen a desfigurar las fronteras entre los vórtices disminuyendo el valor del Pe (Majji and Morris, 2018).

Moore y Cooney (1995) desarrollan una correlación basada en el modelo convectivo de dispersión unidimensional donde se relaciona el número de Pe (que denominan Pe^*), el número de Re axial (Re) y el número de Taylor (Ta) con las dimensiones geométricas de cada RFV, pero sin presencia de partículas. En la ecuación 5.7, puede observarse que el valor del Pe^* aumenta con el aumento de la altura del lecho en el RFV (H) y con la velocidad axial, mientras que disminuye con el Ta:

$$Pe^{*-1} = 7,2 \cdot 10^{-3} \cdot \left(\frac{d}{r_i}\right)^{-0,28} \cdot Ta^{1,05} \cdot (2 \cdot Re)^{-0,83} \cdot \left(\frac{2 \cdot d}{H}\right) \quad (5.7)$$

En este trabajo, los valores de Pe^* para las configuraciones utilizadas (en el RFV-F1 y para el RFV-F3), utilizando la ecuación 5.7 se muestran en la Tabla 5.8.

Cuando los experimentos se realizan con velocidades axiales pequeñas ($100 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$) el error relativo de aplicar la correlación de Moore con respecto al modelo de dispersión axial se mantiene por debajo del 25%. Cuando la velocidad del fluido axial es mayor este rango de errores relativos solo se mantiene hasta una altura de lecho empacado de 20 cm. El error relativo se define como la diferencia del valor calculado y el valor real dividido por el valor real y multiplicado por cien.

Resultados y Discusión

Tabla 5.8.- Valores de relación de aspecto, Ta/Ta_c , D_{ax} , Pe experimental y Pe^ teórico y error relativo para las diferentes condiciones de velocidad axial y altura de lecho empacado evaluadas en el RFV-F3 y para las distintas rotaciones del cilindro interno evaluadas en el RFV-F1.*

RFV	U ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)	H_0 (cm)	ω (rpm)	Γ	Ta/Ta_c	D_{ax}	Pe	Pe^*	Error relativo (%)	
RFV-F3 / DEAE		10	25	34,2	2,5	$9,81\cdot 10^{-6}$	9 ± 2	7	23	
	100	20	25	74,1	2,5	$9,73\cdot 10^{-6}$	19 ± 3	15	22	
		30	25	111,1	2,5	$9,73\cdot 10^{-6}$	19 ± 2	22	17	
		10	25	43,0	2,5	$1,08\cdot 10^{-5}$	17 ± 2	14	15	
	200	20	25	92,0	2,5	$1,08\cdot 10^{-5}$	25 ± 1	30	25	
		30	25	133,3	2,5	$1,08\cdot 10^{-5}$	21 ± 2	44	110	
		10	25	58,0	2,5	$1,14\cdot 10^{-5}$	26 ± 2	25	4	
	300	20	25	127,0	2,5	$1,13\cdot 10^{-5}$	44 ± 4	53	21	
	30	25	166,7	2,5	$1,14\cdot 10^{-5}$	27 ± 1	72	168		
RFV-F1 / rProtein A	300	20	20	104,4	0,7	$1,2\cdot 10^{-5}$	44 ± 4			
	300	20	35	104,4	1,2	$1,2\cdot 10^{-5}$	42 ± 1	224	433	
	300	20	50	104,4	1,7	$1,4\cdot 10^{-5}$	42 ± 6	154	266	
	300	20	75	104,4	2,6	$1,6\cdot 10^{-5}$	30 ± 6	100	235	
	300	*	40	104,4	1,4	$7,1\cdot 10^{-6}$	55 ± 4	153	178	

Para el RFV-F1 la correlación de Moore se aleja mucho de los valores del Pe alcanzados en este trabajo haciendo uso del modelo de dispersión axial, incluso cuando no hay partículas. Este hecho se constata experimentalmente cuando el LE que contiene partículas se reemplaza en el experimento por un lecho de agua de la misma altura, conservando la relación Ta/Ta_c (1,4) y la velocidad del flujo axial ($300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$). Se observa en estas condiciones (Tabla 5.7), que el tiempo de residencia medio del fluido

axial es 14,4. Un reactor similar con lecho de partículas con $Ta/Ta_c = 1,2$ presenta un tiempo de residencia de 12,3, subiendo hasta 12,7 si su relación Ta/Ta_c es 1,7 (Tabla 5.7). En ausencia de resina también el número de Pe es mayor, adoptando un valor de 55 (Pe entre 42 y 44 con resina), esto puede ser debido a que las partículas de adsorbente desfiguran los límites entre las fronteras de las unidades de pares de vórtices aumentando la retromezcla entre ellas y disminuyendo el Pe (Dherbecourt et al., 2016; Rida et al., 2019). En ausencia de partículas la correlación de Moore tampoco predice los mismos valores de Pe que se predicen con el modelo de dispersión axial en el RFV-F1, aunque se estrecha el error. Esto puede deberse a que la correlación fue diseñada para geometrías de d/r_i comprendidas entre 0,045 y 0,38, valores que incluyen la geometría del RFV-F3 ($d/r_i=0,209$, pero no la del RFV-F1($d/r_i=0,90$)).

En una columna de LE puede considerarse que cuando el valor de Pe es superior a 20 el comportamiento del fluido introducido tiende a un flujo pistón (Chang and Chase, 1996). Dado que en este trabajo las condiciones de operación con valores de $Pe \geq 20$ presentan baja retromezcla en el fluido que atraviesa el lecho, coincide este mismo criterio para el RFV-LE en el rango estudiado. En estas condiciones se logra aumentar la mezcla en la dirección transversal (radial y angular) gracias al movimiento generado por los vórtices y reducir la retormezcla en la dirección axial producida por el fluido en sentido ascendente y por las unidades de pares de vórtices continuas. El lecho puede considerarse entonces como un conjunto de pequeños reactores de tanque agitado en serie, uno por cada unidad de pares de vórtices. El mezclado perfecto dentro de cada par de unidades de vórtices, favorece el contacto entre el adsorbente y la proteína de interés. La baja retormezcla favorece la existencia de una buena fuerza impulsora que promueva la transferencia de materia entre la resina y el alimento durante la adsorción en el lecho expandido.

Como puede observarse, trabajando a $100 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ en el RFV-F3 los números de Pe están por debajo de 20, aunque para 20 y 30 cm de lecho se acercan al régimen flujo pistón. Por lo tanto, al utilizar el RFV-F3 en la adsorción de biomoléculas, interesa trabajar por encima de $100 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$, criterio que coincide con otras evidencias bibliográficas (Pharmacia Biotech, 1997).

Teniendo en cuenta la altura del lecho expandido (H_1 en cada uno de los experimentos) y que una unidad de pares de vórtices ocupa aproximadamente el doble del ancho anular (0,9 cm), se puede estimar el número de unidades de pares de vórtices o tanques agitados que hay en cada ensayo DTR, en los cuales el reactor opera en flujo pistón. De este modo, trabajando a $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$, para alcanzar un Pe adecuado, el número mínimo de tanques en serie que asegura flujo pistón es 29 y trabajando a $200 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ es 46.

En la Tabla 5.8 se encuentran los valores obtenidos de dispersión axial (D_{ax}) para cada una de las condiciones de operación evaluadas. Puede observarse cómo D_{ax} aumenta con la velocidad axial, pero fijando esta velocidad no hay variación del valor de D_{ax} con la altura del lecho sedimentado. Los valores de D_{ax} adoptan valores comprendidos entre $1,1\cdot 10^{-5}$ y $1,6\cdot 10^{-5} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ cuando se trabaja a 200 y $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$. En columnas de LE se ha referenciado que valores de D_{ax} en el rango entre $1\cdot 10^{-6}$ y $1\cdot 10^{-5} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ indicarían que el LE es estable (Fenneteau et al., 2003; Palsson et al., 2001; Thömmes et al., 1995). En el RFV trabajando dentro del régimen de flujo de vórtices de Taylor ($0 < Ta/Tac < 15$) se muestra capaz de estabilizar el lecho para un rango de valores de D_{ax} más elevado, ya que a pesar de que el valor de D_{ax} es un orden de magnitud superior al rango de estabilidad referenciado en bibliografía, la estabilidad del lecho se obtiene sin problemas gracias a la rotación del cilindro interno.

5.4. Estudio de transferencia de materia en la etapa de adsorción en el RFV-LE

En la etapa de adsorción, el alimento se introduce por la zona anular en dirección axial y entra en el lecho expandido.

Como es de esperar en su camino axial va disminuyendo la concentración de la biomolécula en el fluido, mientras que, con el paso del tiempo, la resina va aumentando la concentración de la biomolécula por la adsorción de la misma. Para poder realizar predicciones, como en todo proceso de transferencia, es necesario comparar el punto de operación del reactor con el punto de equilibrio del sistema. Además, es preciso explicar el mecanismo por el cual se produce la transferencia, para así determinar su etapa limitante y contribuir a crear condiciones que permitan una adsorción eficiente.

Resultados y Discusión

La situación de equilibrio sirve para caracterizar la capacidad máxima de adsorción del adsorbente con respecto a ese adsorbato. El procedimiento utilizado para llevar a cabo estos ensayos se encuentra detallado el apartado 4.6.3. La proteína que se utiliza es la albúmina de suero bobino (ASB), debido a que se puede obtener fácilmente y es económica.

En la Figura 5.6 se representan los datos experimentales (q y $[ASB]_e$) de la isoterma de adsorción para el sistema ASB-Streamline DEAE, el cual se ajustan a la isoterma de Langmuir (ecuación 5.8).

$$q \text{ (mg} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)} = \frac{q_{\max} \cdot [ASB]_e}{k + [ASB]_e} \quad (5.8)$$

donde q_{\max} es la capacidad máxima de adsorción ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), correspondiente al recubrimiento total mediante una monocapa de todos los centros de adsorción posibles y k ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) es la constante de intracción entre la resina y el adsorbato. En la Tabla 5.9 se muestran los resultados obtenidos

La capacidad máxima de adsorción representa la máxima adsorción de proteína en la resina para un tiempo infinito y contacto eficiente entre la resina y el adsorbato. Este parámetro sirve como valor de referencia a alcanzar en un proceso cromatográfico dinámico, en el que el tiempo está limitado por el tiempo de residencia dentro del RVF-LE donde, además, la eficiencia de la adsorción entre la resina y el adsorbato estará determinado por el comportamiento fluidodinámico.

Tabla 5.9.- Valores de capacidad máxima de adsorción (q_{\max}), constante k y r^2 para los valores experimentales ajustados a la isoterma de Langmuir, para la proteína ASB y la resina Streamline DEAE.

q_{\max} ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	k ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	r^2
61,4	0,031	0,9605

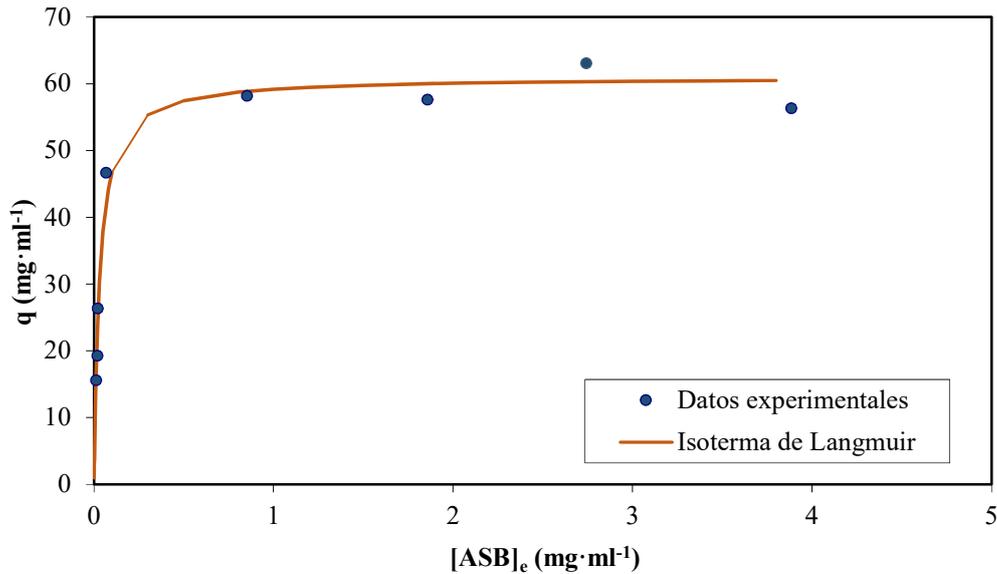


Figura 5.6.- Datos experimentales de la concentración de ASB en la resina (q) versus la concentración de ASB en sobrenadante ($[ASB]_e$) y el ajuste a la isoterma de Langmuir.

Conocida la capacidad máxima de adsorción de la resina, es necesario conocer cómo evoluciona hacia ese estado, o lo que es lo mismo, indagar en la cinética de la etapa de adsorción. Se ha propuesto un mecanismo (Doran, 2013) para la transferencia de materia de la biomolécula desde el seno del fluido (unidad de pares de vórtices) hasta la resina (Figura 5.7) consistente en las etapas que se detallan a continuación:

- Transferencia de masa de la biomolécula desde las unidades de pares de vórtices (fase líquida) hasta la capa límite del líquido que cubre la superficie del adsorbente. Se define por el coeficiente de transferencia externa k_f ($m \cdot s^{-1}$).
- Transferencia de masa de la biomolécula por difusión a través de la capa límite del líquido que rodea la partícula de adsorbente. Se cuantifica por el coeficiente de difusión D_{AB} ($m^2 \cdot s^{-1}$).
- Transferencia de masa de la biomolécula por difusión a través del líquido contenido en el interior del poro del adsorbente hacia la superficie interna del mismo. Se determina por el coeficiente de difusión en el interior del poro D_p ($m^2 \cdot s^{-1}$).
- Por último, el proceso de adsorción en sí mismo.

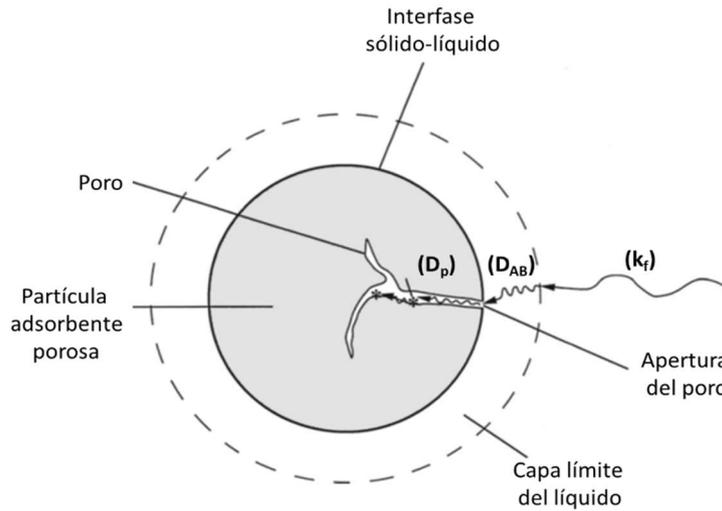


Figura 5.7.- Esquema gráfico de las etapas del proceso de adsorción de la biomolécula desde la fase líquida hasta el interior del poro del adsorbente (Doran, 2013).

Uno o más de estos procesos pueden constituir la etapa limitante y determinar la velocidad a la que ocurre la adsorción. La transferencia de materia desde las unidades de pares de vórtices hasta la película que rodea a las partículas (transferencia de masa externa) está gobernada por los parámetros de operación establecidos en el RFV. Si las condiciones de operación vienen acotadas por las condiciones en las que se puede obtener un LE estable en régimen de vórtices de Taylor, puede asumirse que el contacto del alimento con la resina es eficiente (sin espacios muertos ni canales preferentes) y por tanto la transferencia desde la unidad de vórtice hacia la capa límite se produce rápidamente.

Para esclarecer si el mecanismo limitante lo constituye la etapa de transferencia de materia externa (k_f , $m \cdot s^{-1}$) o la etapa de transferencia por difusión en el interior del poro (D_p , $m^2 s^{-1}$), se evalúa el número adimensional de Biot (Bi), que relaciona ambos coeficientes mediante la ecuación 5.9 (Deen, 1998).

$$Bi = \frac{k_f \cdot d_p}{D_p} \quad (5.9)$$

Los coeficientes de k_f , D_{AB} y D_p se particularizan para los sistemas ASB-DEAE-RFV-F3 y IgG2a-rProteinA-RFV-F1, con objeto de comparar si existen diferentes etapas controlantes para cada uno de los sistemas. En el RFV-F3 se utiliza la proteína patrón ASB para los experimentos porque es una proteína estándar, fácil de obtener que permite

conocer de forma exhaustiva el sistema a evaluar (Sistema ASB-DEAE-RFVF3), previo al uso de la proteína de interés (B-PE).

Para la estimación del coeficiente D_{AB} ($m^2 \cdot s^{-1}$), cuando se trata de moléculas grandes ($>1kDa$), se puede utilizar la ecuación 5.10, donde T es la temperatura de trabajo (K), M es el peso molecular de la molécula que se adsorbe y μ es la viscosidad de la disolución ($Pa \cdot s$).

$$D_{AB}(m^2 \cdot s^{-1}) = \frac{9,40 \cdot 10^{-15} \cdot T}{\nu \cdot M^{1/3}} \quad (5.10)$$

Para el cálculo se considera temperatura ambiente (298 K), viscosidad la del agua (0,001 Pa·s) y peso molecular el tamaño medio del anticuerpo IgG2a (150 kDa) y de la proteína ASB (66,3 kDa). Los valores obtenidos de D_{AB} para cada proteína se muestran en la Tabla 5.10 y 5.11, respectivamente.

El coeficiente D_p ($m^2 \cdot s^{-1}$) para el sistema adsorbente (ASB-DEAE) se considera $6,5 \cdot 10^{-11} m^2 \cdot s^{-1}$ a partir de datos bibliográficos consultados (Tong et al., 2003). Por su parte, para el anticuerpo IgG2a se utiliza la ecuación (5.11), donde se asume que ε_p (porosidad de la partícula) tiene un valor de 0,5. Ambos valores se muestran en la Tabla 5.10 y 5.11, respectivamente.

$$D_p = \left(\frac{\varepsilon_p}{2 - \varepsilon_p} \right)^2 \cdot D_{AB} \quad (5.11)$$

Para calcular el coeficiente de la transferencia de masa externa k_f se utiliza la correlación de (Moore, 1994), detallada en la ecuación 5.12 para cada sistema (ASB-DEAE-RFV-F3 y IgG2a-rProtein A-RFV-F1).

$$\frac{k_f \cdot d_p}{D_{AB}} = 2 \cdot 10^{-3} \cdot Ta_m^{0,35} \cdot (2 \cdot Re)^{0,37} \cdot Sc^{0,33} \cdot \left(\frac{d}{r_i} \right)^{-1,1} \cdot \left(\frac{d_p^3 \cdot g}{\nu^2} \right)^{0,33} \quad (5.12)$$

donde Re es el número de Reynold axial (ecuación 2.2), Sc es el número de Schmidt (ecuación 5.13) y Ta_m es el número de Taylor modificada (ecuación 5.14), siendo Fg y P parámetros que dependen de la geometría del reactor (ecuaciones 5.5 y 5.6).

$$Sc = \frac{v}{D_{AB}} \quad (5.13)$$

$$Ta_m = Ta \cdot \left(\frac{d}{r_i}\right)^{0,5} \cdot \left(\frac{1}{Fg}\right) \quad (5.14)$$

A partir de los coeficientes de transferencia de materia externa y difusión para cada sistema se determina el número adimensional de Biot (ecuación 5.9) para el sistema ABS-DEAE-RFV-F3 para las velocidades axiales de 200 y 300 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$ (Tabla 5.10) y para el sistema IgG2a-rProtein A-RFV-F1 para las velocidades de rotación de 35, 50 y 75 rpm, las cuales están dentro del régimen laminar vórtices de Taylor (Tabla 5.11).

Los valores de Bi para ambos sistemas indican que la etapa de difusión dentro del poro (D_p) es más lenta que la que se da entre el seno del fluido (k_f) y la capa que rodea la partícula del adsorbente. Cuanto más grande es el número de Biot más limitante es la etapa de difusión dentro del poro. Cabe destacar que, la velocidad de la etapa de difusión de la biomolécula dentro del poro es independiente de la geometría del reactor y de las condiciones de operación, sólo depende del tiempo de residencia de la biomolécula en el interior del reactor.

Tabla 5.10.- Valor del número de Biot para las dos condiciones evaluadas en el RFV-F3 en LE y los parámetros necesarios para su cálculo.

Parámetro	U ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)	
	200	300
Bi	12,06	13,6
$k_f(\text{m}\cdot\text{s}^{-1})$	$3,92\cdot 10^{-6}$	$4,40\cdot 10^{-6}$
$D_{AB}(\text{m}\cdot\text{s}^{-1})$	$1,27\cdot 10^{-7}$	
$D_p(\text{m}\cdot\text{s}^{-1})$	$6,5\cdot 10^{-11}$	
$d_p(\text{m})$	$2,0\cdot 10^{-4}$ *	
Sc	14599	
Fg	1,2	
P	0,05	
Ta_m	97	

* Tabla 4.2.

Resultados y Discusión

Tabla 5.11.- Valor del número de Biot para las 3 condiciones consideradas en el RFV-F1 en LE y de todos los parámetros calculados para obtener dicho valor.

Parámetro	ω (rpm)		
	35	50	75
Bi	11,2	12,9	14,7
k_f (m/s)	$4,2 \cdot 10^{-7}$	$4,8 \cdot 10^{-7}$	$5,5 \cdot 10^{-7}$
D_{AB} ($m \cdot s^{-1}$)		$4,1 \cdot 10^{-11}$	
D_p ($m \cdot s^{-1}$)		$4,6 \cdot 10^{-11}$	
d_p (m)		$1,23 \cdot 10^{-4} *$	
Sc		24.307	
Ta_m	28	41	61
Fg		2,76	
P		0,025	

* Tabla 4.3.

Dado que la difusión en el interior del poro es limitante, la adsorción podría ser mejorada brindando un tiempo de residencia suficientemente largo como para lograr que el fluido pueda penetrar en los poros de la resina y que la molécula se adsorba.

Una forma de evaluar si el tiempo de residencia es el adecuado es determinando la capacidad dinámica de adsorción del sistema. Siguiendo el procedimiento detallado en el apartado 4.6.4 se determina la capacidad dinámica de adsorción de la proteína ASB en la resina Streamline DEAE en el LE del RFV-F3 para $Ta/Ta_c = 2,5$ (25 rpm). Las condiciones de operación se eligen entre las que permiten establecer un LE estable, régimen laminar de vórtices y número de Pe superior a 20. Se seleccionan velocidades axiales de 200 y 300 $cm \cdot h^{-1}$ y una altura de lecho empacado de 20 cm, con tiempos medios de residencia de 13,9 min y 12,8 min (Tabla 5.7), respectivamente.

En la Figura 5.8 se representa gráficamente la concentración de ABS a la salida respecto a la concentración en el alimento ($[ASB]/[ASB]_0$) versus tiempo de proceso, para los dos caudales axiales empleados.

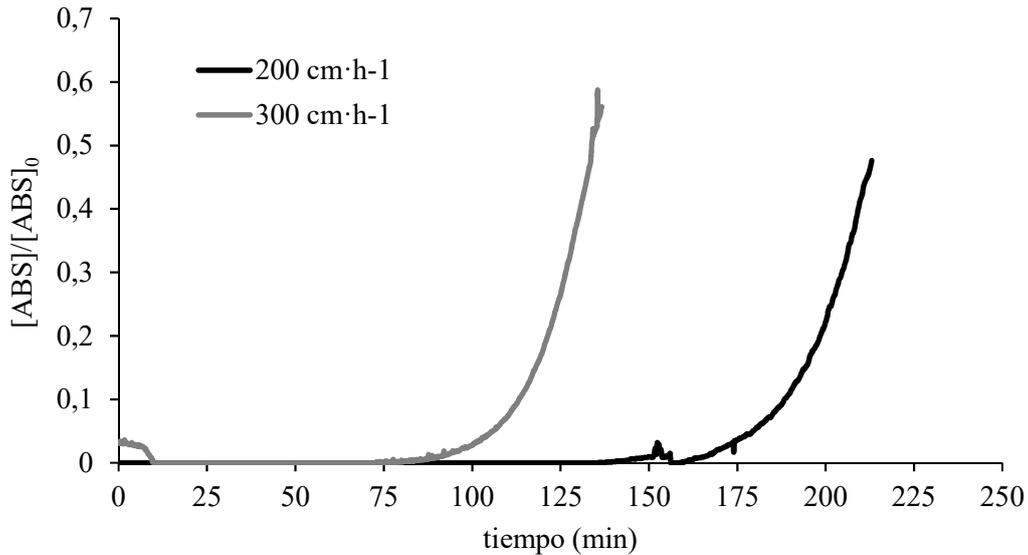


Figura 5.8.- Evolución de $[ASB]$ a la salida del RFV-F3 respecto a la concentración del alimento ($[ASB]/[ASB]_0$) versus tiempo en el RFV-F3 a 200 y 300 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$, 25 rpm y altura de lecho empacado de 20 cm.

A partir de la Figura 5.8 para una relación $[ASB]/[ASB]_0 = 0,1$ se obtiene capacidad dinámica de adsorción de 60,4 mg/mL para 200 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$, y 55,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para 300 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$. Estos valores son algo inferiores a la capacidad máxima de adsorción que es de 61,4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pero se pueden considerar muy cercanos. A medida que aumenta la velocidad axial disminuye ligeramente la capacidad dinámica de adsorción debido a que disminuye el tiempo de residencia medio, pasando de 13,9 min (200 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$) a 12,8 min (300 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por (Ibáñez-González y Cooney, 2007), que evalúan diferentes relaciones de aspecto a distintas velocidades superficiales, mostrando que la capacidad dinámica de la proteína ASB en la resina Streamline DEAE decrece con el aumento de la velocidad superficial, debido a la limitación de la etapa de difusión en el interior del poro.

La extrapolación de estos datos para la adsorción de otras proteínas industrialmente importante, como son la B-PE y la IgG2a, deben tener en cuenta sus tamaños y los tamaños de poro de los materiales adsorbentes, ya que comparten como etapa limitante la difusión a través de los poros internos de la resina. La proteína B-PE (267 kDa) es cuatro veces mayor que la proteína ASB (66,3 kDa), por lo que, la difusión de la proteína B-PE en el interior del poro de la resina Streamline DEAE es más lenta, y por lo tanto necesita un tiempo de residencia más elevado que la ASB para poder ser adsorbida. Por este

motivo, se necesita trabajar de forma más conservativa con el RFV-F3 utilizando una velocidad de entrada del alimento de $200 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ con un lecho de 20 cm.

La diferencia de tamaño no es tan importante para el caso del anticuerpo IgG2a (115 kDa). Además, el diámetro medio del adsorbente Stramline rProtein A ($1,23\cdot 10^{-4} \text{ m}$) es menor que el de la resina Streamline DEAE ($2,0\cdot 10^{-4} \text{ m}$), esto puede implicar que las longitudes de los poros del adsorbente sean más cortos, dando lugar a que las limitaciones por difusión en el interior del poro sean menores. Asimismo, los volúmenes a procesar para la recuperación del anticuerpo son muy grandes, lo que hace conveniente aumentar la velocidad del fluido axial. Las condiciones de operación en este caso serían $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$, 20 cm. Esta elección es avalada por el trabajo de Thömmes et al. (1996) que utiliza la misma velocidad axial, anticuerpo y adsorbente en columna de LE.

5.5. Evaluación del uso del RFV en cromatografía de adsorción

La cromatografía de adsorción en LE viene siendo aplicada tanto para aislar biomoléculas intracelulares como para biomoléculas que son excretadas por microorganismos al medio (Barnfield Frej et al., 1997; Bermejo et al., 2003; Chase, 1994; Hage et al., 2012; Lesaout et al., 2016; Thömmes et al., 1996).

Cuando la biomolécula es intracelular, es necesario separar la biomasa del medio de cultivo y concentrarla, para seguidamente romper las células de modo que la molécula de interés quede expuesta al adsorbente durante la etapa de adsorción. En este proceso de rotura no sólo sale al exterior de la célula la biomolécula de interés, sino que, además, se expulsan otros contaminantes intracelulares y quedan en suspensión las propias células rotas, que podrían interaccionar también con la resina. En estos procesos interesa utilizar resinas que actúen captando rápidamente la biomolécula de interés para evitar que sea degradada por procesos enzimáticos inevitables (Pharmacia Biotech, 1997). Así altos tiempos de residencia pueden cobrar más importancia para asegurar el contacto entre la biomolécula y el adsorbente. En el caso de biomoléculas excretadas, usualmente, se trata de alimentos voluminosos donde la biomolécula se encuentra muy diluida, lo que hace que primen tiempos de residencia algo más corto, para procesar el volumen de alimento lo más rápido posible.

En este trabajo se utiliza el RFV-LE en régimen de vórtices de Taylor para dos procesos típicos que cubren estas dos situaciones opuestas: la purificación de B-PE a partir de un extracto concentrado de células rotas de *Porphyridium cruentum* y la recuperación de IgG2 excretado al medio de un cultivo de hibridoma de ratón.

5.5.1. Aplicación del RFV en la purificación de B-PE a partir de un extracto concentrado de células rotas de *Porphyridium cruentum*

5.5.1.1. Obtención y caracterización reológica del extracto de células rotas de *Porphyridium cruentum*

La microalga *Porphyridium cruentum* es capaz de acumular B-PE en su interior y, bajo ciertas condiciones, excreta polisacáridos al medio modificando su viscosidad. Los aumentos de viscosidad dificultan la separación de la biomasa por centrifugación, por eso en este trabajo el cultivo de la microalga se realiza en continuo. La velocidad de dilución impuesta de (D_{cultivo}) $0,01 \text{ h}^{-1}$ se mantiene durante 18 horas de luz, alcanzándose una concentración de biomasa (C_b) de $0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

La productividad de B-PE (P_{BPE} , $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$) puede calcularse conociendo la cantidad de B-PE contenida en la biomasa (X_{BPE} , g de B-PE·g de biomasa⁻¹) según la ecuación 5.15:

$$P_{\text{BPE}} (\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}) = D_{\text{cultivo}} \cdot C_b \cdot X_{\text{BPE}} \quad (5.15)$$

La concentración de la proteína en la biomasa del cosechado es del 5,3 %, resultando así una productividad de B-PE de $0,008 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$. Esta productividad está dentro del rango referenciado en bibliografía trabajando en condiciones de laboratorio (Fabregas et al., 1998; Reboloso Fuentes et al., 2000).

Una vez que se cosecha el cultivo y se centrifuga es necesario eliminar las sales que acompañan a la biomasa. La pasta de biomasa libre de sales se resuspende en tampón de acetato 50 mM (pH 5,5), resultando al final una suspensión aproximadamente diez veces más concentrada en el tampón que en el cultivo ($\sim 8,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). La B-PE se encuentra contenida en los cloroplastos de las células de la microalga *Phorphyridium cruentum*,

para liberarla se somete al cultivo concentrado en tampón a un proceso de lisis que favorezca la liberación de las proteínas al medio (Soni et al., 2006).

El proceso se inicia sometiendo la biomasa concentrada en tampón a ciclos sucesivos de congelación y descongelación (apartado 4.7.2). La disminución de la temperatura congela el agua contenida dentro de las células formándose cristales de hielo que aumentan el tamaño de las células hasta llegar a romper las membranas dando lugar a lisis celular. Cuanto más suave sea el proceso de congelación (temperatura de congelación alta) más lenta será la cristalización del agua y más grandes serán los cristales formados favoreciendo la lisis celular y la liberación de B-PE. Posteriormente las células se contraen durante el proceso de descongelación.

En la Tabla 5.12 se detalla el contenido en ficobiliproteínas de la biomasa concentrada en tampón de acetato 50 mM (pH 5,5) sometida a lisis celular después de cada uno de los ciclos de congelación-descongelación (apartado 4.7.4). Como se puede observar, la concentración de los tres tipos de proteínas analizadas en el extracto: ficocianina (PC), aloficocianina (APC) y B-PE, aumenta progresivamente tras cada ciclo. La eficacia de la extracción se calcula de forma cualitativa mediante la ecuación 4.17 para cada ciclo de congelación-descongelación. Se confirma que 5 ciclos son suficientes para lograr la liberación exhaustiva de la proteína de interés del interior de las células de *P. cruentum*. Finalmente se obtiene un extracto concentrado de B-PE con células rotas con una concentración de 0,27 mg de B-PE·mL⁻¹.

Para determinar de forma cualitativa la pureza de la muestra de partida se calcula la relación de absorbancias, A_{545}/A_{280} . Conocer el valor del alimento o de la materia de partida antes de su purificación es importante para estimar la eficacia del proceso de purificación. En este trabajo, el alimento presenta un valor de la relación de absorbancias $A_{545}/A_{280}=2,1$. Con esta relación de absorbancias el extracto ya podría ser utilizado como colorante en la industria agroalimentaria ($A_{545}/A_{280}>0,7$) (Hsieh-Lo et al., 2019). Esta relación indica además que el alimento contiene otras ficobiliproteínas distintas de la B-PE pero, al prevalecer la B-PE, se puede considerar que no interferirán demasiado en el proceso de purificación.

Tabla 5.12.- Concentración de ficobiliproteínas del alimento después de cada ciclo de congelación-descongelación y la eficacia de cada ciclo (A_{545}/A_{280})

	Ciclos de congelación-descongelación				
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a
Sólidos (g·L⁻¹)	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2
PC (g·L⁻¹)	0,006	0,010	0,012	0,029	0,040
APC (g·L⁻¹)	0,003	0,004	0,007	0,024	0,022
BPE (g·L⁻¹)	0,078	0,088	0,127	0,267	0,265
Eficacia (%)	47	86	95	94	100

5.5.1.2. Análisis de la viscosidad del alimento

La liberación de la proteína de interés desde el interior de la célula ocurre acompañada de otros contaminantes que podrían modificar el comportamiento reológico del extracto. Se realiza un reograma al extracto concentrado de B-PE con células rotas (apartado 4.3) ajustándose a la ley de la potencia (ecuación 4.1). Siendo 0,0054 el valor de K y 0,856 el valor de la constante n ($n < 1$), lo que indica que el alimento es un fluido pseudoplástico. El esfuerzo de corte en función de la rapidez de deformación particularizado al alimento viene dado por la ecuación 5.16.

$$\tau \text{ (Pa)} = 0,0054 \cdot \dot{\gamma}^{0,856} \quad r^2 = 0,996 \quad (5.16)$$

La viscosidad del extracto concentrado de B-PE con células rotas variará con la velocidad de rotación del cilindro interno. A mayor rotación menor será el valor de la viscosidad y viceversa. Es necesario encontrar un procedimiento (Figura 5.9) para saber el valor de la viscosidad del alimento para una velocidad de rotación dada, ya que el número de Ta depende de la viscosidad cinemática del alimento.

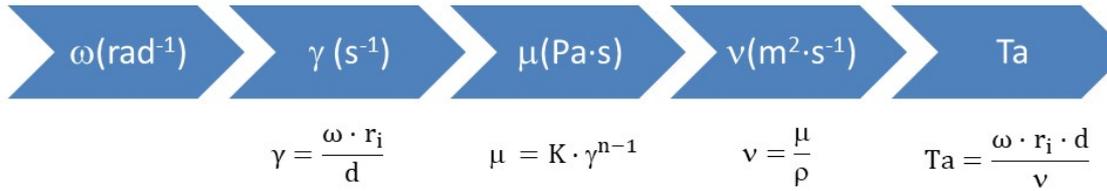


Figura 5.9.- Procedimiento seguido para calcular Ta a partir de la velocidad angular del cilindro interno para un fluido pseudoplástico.

Sabiendo por definición que, la viscosidad dinámica es la relación entre el esfuerzo de corte y la rapidez de deformación, ($\mu(\text{Pa} \cdot \text{s}) = \tau/\gamma$), y sustituyendo el esfuerzo de corte ($\tau = \mu \cdot \gamma$) en la ecuación 5.16 se obtienen la viscosidad dinámica del alimento en función de la rapidez de deformación, expresado mediante la ecuación 5.17.

$$\mu (\text{Pa} \cdot \text{s}) = 0,0054 \cdot \gamma^{-0,144} \quad r^2 = 0996 \quad (5.17)$$

La rapidez de deformación a su vez en el RFV (ecuación 5.18) depende la rotación del cilindro interno y la geometría del reactor.

$$\gamma(\text{s}^{-1}) = \frac{\omega \cdot r_i}{d} \quad (5.18)$$

Fijando la velocidad de rotación se determina el número de Taylor, en función de la velocidad angular, para un fluido pseudoplástico mediante la ecuación 5.19.

$$Ta = \frac{\omega^{2-n} r_i^{2-n} d^n \cdot \rho}{K} \quad (5.19)$$

En el caso concreto del extracto concentrado de B-PE con células rotas se asume que la densidad es similar a la de agua.

En la Figura 5.10 se representa la relación Ta/Ta_c en función de la rotación del cilindro interno (ω) en el RFV-F3 para el extracto concentrado de B-PE con células rotas.

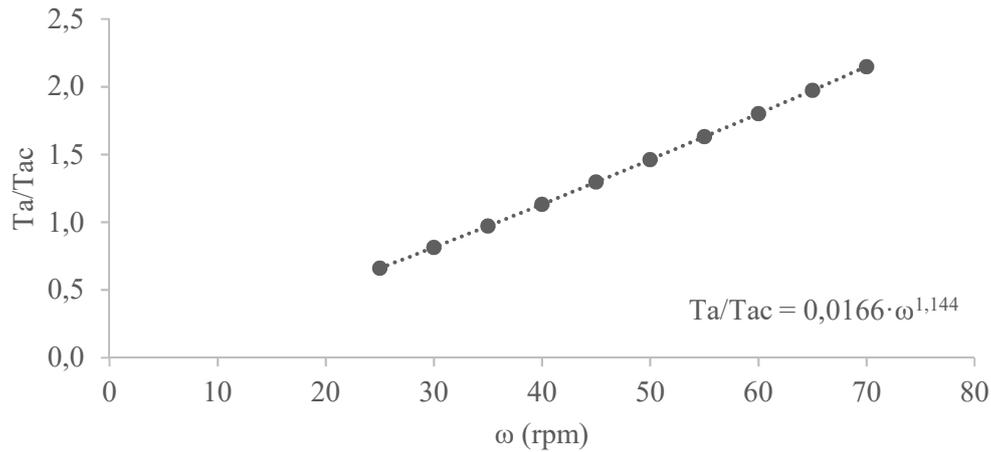


Figura 5.10.- Representación de la relación Ta/Tac en función de la rotación del cilindro interno para el RFV-F3 y el extracto concentrado de B-PE más células rotas.

5.5.1.3. Purificación de B-PE en el RFV-F3

La purificación de B-PE se lleva a cabo en el RFV-F3 partiendo de 620 mL de un extracto concentrado de B-PE con células rotas de *P. cruentum*. El extracto contiene $0,27 \text{ mg de B-PE} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $8,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de sólidos totales suspendidos, según el procedimiento descrito en materiales y métodos (apartados 4.7.2 y 4.7.3, respectivamente).

Las condiciones de operación del RFV-F3 durante la etapa de adsorción se establecen acorde a los resultados obtenidos en los ensayos de fluidodinámica y transferencia de materia y las propiedades físicas (densidad y viscosidad) del alimento que se va a utilizar. Se elige realizar la etapa de adsorción a $200 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ y una altura del lecho sedimentado de 20 cm. Para la velocidad de rotación con la que se trabaja para determinar la capacidad dinámica de adsorción (25 rpm), el extracto concentrado de B-PE con células rotas presenta una relación Ta/Tac menor a 1 (Figura 5.10). Para trabajar dentro de la zona de operación acotada de $Ta/Tac > 1$ con la geometría del reactor existente a $200 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ y 20 cm de lecho sedimentado hay dos posibles opciones: disminuir la viscosidad del fluido (diluendo el extracto) o aumentar la velocidad de rotación del cilindro interno. Diluir el extracto implica aumentar el tiempo total de procesamiento. La otra opción es la que se selecciona en este trabajo: aumentar la velocidad de giro del cilindro interno a 50 rpm, manteniendo el resto de condiciones constantes. Esto contribuye a disminuir la viscosidad, lo cual no sólo aumenta la relación Ta/Tac sino que, además, mejora el

coeficiente de difusividad de la proteína (ecuación 4.9). Para 50 rpm la viscosidad del alimento es 3,4 mPa·s y el valor de Ta 169 ($Ta=1,5 Ta_c$). En estas condiciones se asegura que el flujo que se forma en el espacio anular del RFV-F3 en LE se corresponde a un régimen de flujo laminar vórtices de Taylor. Dado que la B-PE proviene de un extracto concentrado, con una viscosidad mayor que la del tampón, la porosidad del LE aumenta durante la etapa de adsorción, ralentizándose el movimiento de la proteína B-PE. Esto ocurre tanto desde el fluido a la superficie de la resina (al aumentar la distancia entre la B-PE y el adsorbente), como hacia el interior del poro del adsorbente (al aumentar la viscosidad del fluido en su interior), por lo que se justifica en gran medida trabajar a 200 $cm \cdot h^{-1}$.

La etapa de adsorción de B-PE en el RFV-F3 se realiza para $Ta/Ta_c = 1,5$ y en la Tabla 5.8 puede observarse que, en el RFV-F3 para la relación $Ta/Ta_c = 2,5$ el número de Pe es 25. Los experimentos en el RFV-F1 con rProtein A a 300 $cm \cdot h^{-1}$ demuestran que, el valor del número de Pe aumenta con la disminución de la relación Ta/Ta_c , debido a que disminuyen las turbulencias en el interior de los vórtices y entre las unidades de vórtices (Ma y Cooney, 2004). Por lo tanto, para $Ta/Ta_c = 1,5$ se asume que Pe será mayor que 25 en régimen de flujo pistón. Los resultados que se obtienen en cada una de las etapas son los siguientes:

- Carga de la resina. Al introducir los 135 mL de resina Streamline DEAE en el RFV-F3 se alcanza una altura de 20 cm de lecho sedimentado (H_0).
- Estabilización del lecho expandido. La expansión del LE gracias a la introducción del tampón de acetato 50 mM a pH 5,5 a la velocidad de 200 $cm \cdot h^{-1}$ consigue que el lecho se estabilice a una altura $H_1 = 37$ cm con una velocidad de giro del cilindro interno de 50 rpm (Figura 5.11.a).
- Carga del alimento. Durante esta etapa (28 min) el LE se eleva hasta H_2 (64 cm), debido a las partículas contenidas en el extracto (8,2 $mg \cdot mL^{-1}$) y al aumento de la viscosidad. Durante la etapa de adsorción la proteína B-PE se une a la resina Stramline DEAE mediante enlace iónico. El adsorbente Streamline DEAE de tipo aniónico está cargado positivamente, generando una fuerza de atracción hacia las moléculas de B-PE con carga negativa. El punto isoeléctrico de la proteína B-PE está situado a un pH de 4,4 y al estar diluida en un tampón (acetato 50 mM, pH 5,5) por

encima de su punto isoeléctrico, la proteína B-PE se encuentra cargada negativamente. Gracias a su color rosa intenso se puede visualizar el cambio progresivo de intensidad de color que sufre la resina cuando la proteína va quedando retenida dentro del lecho expandido. En la Figura 5.11.b se muestra el inicio de la etapa de adsorción; en este momento comienza a introducirse la muestra en sentido ascendente y se ve claramente cómo la resina empieza a colorearse en un tono rosáceo en la base del reactor, correspondiente a la etapa de adsorción mediante enlace iónico entre la proteína y el adsorbente. En ningún momento durante la etapa de adsorción la corriente de salida del RFV-F3 muestra coloración intensa, por lo que se puede constatar visualmente que la proteína B-PE queda retenida en la resina y que, por lo tanto, la concentración de esta en la salida es muy baja. La observación visual se correlaciona perfectamente con los datos tomados por espectrofotometría, los cuales se muestran gráficamente en la Figura 5.12. Teniendo en cuenta que los vórtices que se forman tienen una altura aproximadamente igual al espacio anular del RFV-F3, es decir 0,45 cm, se estima que en los 64 cm de LE se forman unos 142 vórtices lo que corresponde a 71 unidades de pares vórtices. La formación de estas unidades de vórtices en serie da lugar a un comportamiento flujo pistón que facilita el contacto entre la resina y la proteína de B-PE, favoreciendo la adsorción de la misma. El comportamiento flujo pistón se observa fácilmente al mostrar la resina un color rosa, siendo más intenso en la parte inferior del LE del reactor que en la parte superior.

- Lavado del lecho expandido. Después de la aplicación del alimento, el LE del RFV-F3 se lava con solución tampón 50 mM de acetato. Esta disolución tamponada permite la eliminación de partículas que puedan quedar retenidas entre las partículas de resina. El lavado se lleva a cabo durante 150 min, momento en el que dejan de detectar proteínas o cualquier otra partícula en el efluente de salida del reactor. En estas condiciones de trabajo, la altura del LE (H_3) alcanza un valor de 74 cm. Este aumento de la altura del lecho se puede deber a la retención de sólidos en el lecho expandido, principalmente restos celulares, ya que el alimento utilizado contenía una concentración en sólidos de $8,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A pesar de que la viscosidad se reduce desde 3,41 hasta 1 $\text{mPa}\cdot\text{s}$ al cambiar el alimento por el tampón de lavado, esto no ayuda a reducir la altura del LE durante la etapa de lavado.

- Elución en lecho sedimentado. Por ultimo en la Figura 5.11.c y d se muestra la etapa de elución, tras la sedimentación de la resina. Al igual que en la etapa de adsorción, el color de la proteína permite hacer un seguimiento visual de la elución de la B-PE. En la Figura 5.11.c se observa como toda la resina sedimentada presenta una coloración rosa intensa, correspondiente a la proteína B-PE unida al adsorbente mediante enlace iónico. En la Figura 5.11.d se observa un gradiente de color asociado con el gradiente de concentración de la proteína B-PE en la resina (siendo de color rosa intenso en la base del lecho sedimentado). El aumento de la fuerza iónica del tampón acetato desde 250 mM hasta 1 M compite con los enlaces de unión entre la proteína y el adsorbente produciéndose la elución de la misma.

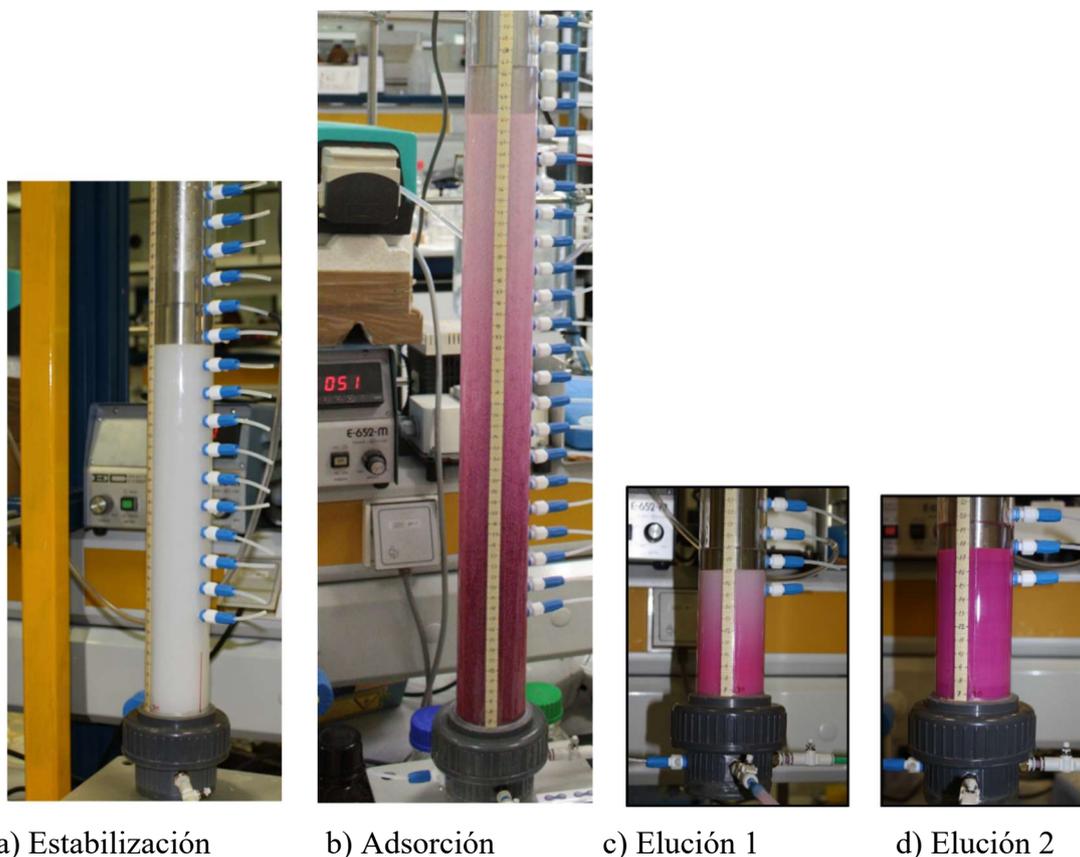


Figura 5.11.- Imágenes de las principales etapas del proceso de purificación de B-PE con el adsorbente Sreamline DEAE en el RFV-F3.

Resultados y Discusión

En la Figura 5.12. se representa la relación de la concentración de proteína a la salida ([BPE]) respecto a la concentración del alimento ([BPE]₀) frente al volumen introducido en el RFV-F3 para cada una de las etapas que forman parte del proceso de purificación: adsorción, lavado y elución. Al final de la etapa de adsorción la concentración de B-PE a la salida del RFV-F3 es del 5% aproximadamente respecto a la concentración del alimento ([BPE]/[BPE]₀ alrededor del 0,05). A partir de estos datos se cuantifica la cantidad de B-PE retenida en el volumen de resina utilizado, siendo la capacidad dinámica de adsorción de 1,15 mg·mL⁻¹ de B-PE en la resina Streamline DEAE (ecuación 4.14).

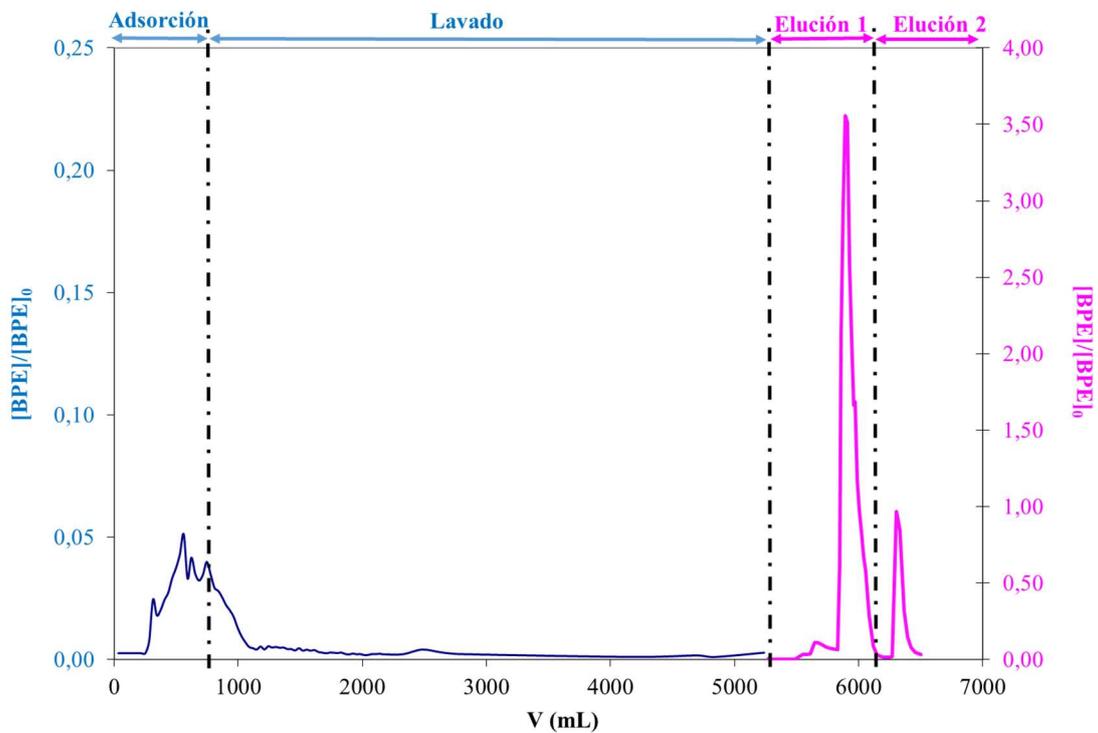


Figura 5.12.- Representación de la concentración de B-PE a la salida del sistema respecto a la concentración del alimento ([BPE]/[BPE]₀) frente el volumen utilizado en las etapas de adsorción, lavado, elución 1 (250 mM de acetato, pH 5,5) y elución 2 (1M de acetato, pH 5,5) en el RFV-F3 en LE. El eje y de la izquierda muestra los valores de [BPE]/[BPE]₀ para las etapas de adsorción y lavado, mientras que el eje y de la derecha muestra los valores C/C₀ de la etapa de elución.

Se compara la capacidad dinámica de adsorción de este trabajo con resultados obtenidos en bibliografía. Bermejo (2003) realizan la purificación de B-PE en una columna de LE tradicional, siendo la fracción de carga inicial de 0,88 mg B-PE·mL⁻¹ de resina,

recuperándose el 80% de B-PE. Aunque no se detallan datos de capacidad dinámica de adsorción, su valor debe ser igual o menor que la fracción de carga utilizada, siendo inferior al alcanzado en este trabajo con el RFV-F3 ($1,15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Ibañez-Gonzalez (2013) patentan un proceso mediante el cual se purifica B-PE utilizando una columna de flujo pulsante en LE. La introducción de la pulsación en el LE es para evitar la formación de canales preferentes. Los resultados muestran que se alcanza una capacidad dinámica de adsorción de $0,99 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y una relación $[\text{BPE}]/[\text{BPE}]_0$ de 0,07. Aunque las capacidades dinámicas de adsorción son similares, en este trabajo se logra con una relación $[\text{BPE}]/[\text{BPE}]_0$ de 0,05, lo que indica que, en el RFV-F3 se reducen las pérdidas de la biomolécula de interés. Estos resultados muestran que el RFV-F3 en LE es eficaz para competir con las columnas de LE ya sea cuando operan de la forma clásica o con pulsación. Además, la versatilidad del RFV aporta la ventaja de poder trabajar con alimentos con un menor número de pre-tratamientos previos a la adsorción de la proteína.

En la Figura 5.12 también se muestra la etapa de elución con tampón de 250 mM y 1 M de acetato a pH 5,5, respectivamente. En la primera elución la proteína B-PE se concentra 3,5 veces con respecto a su concentración del alimento. Se obtienen 120 mg de B-PE, correspondiente al 73,5 % de la B-PE introducida con el alimento (Tabla 5.13). En la segunda etapa de elución se recuperan 22 mg de B-PE, siendo el rendimiento el 13,4%. Sumando las dos etapas de elución se recupera el 86,6% de B-PE con respecto a la cantidad total de B-PE que entra en el alimento en la etapa de adsorción. Agrupando las pérdidas de proteína durante las etapas de adsorción y lavado, resultan ser un 5,1% del total de B-PE que entra durante la etapa de adsorción.

En trabajos previos Bermejo et al. (2003) e Ibañez-Gonzalez et al. (2013) alcanzan mayores rendimientos de recuperación en la primera elución, 77,8% y 80,8% respectivamente, con extractos de B-PE previamente clarificados. Sin embargo, sería imposible recuperar la proteína B-PE en un extracto sin clarificar en una columna clásica que opera en LE, ya que, el alto contenido de partículas sólidas presentes causaría problemas de bloqueo del lecho y un aumento de la viscosidad. Esto provoca disminución del rendimiento de la proteína por la formación de canales preferentes, entre otros inconvenientes.

Con los datos obtenidos de la cuantificación de B-PE en cada una de las etapas del proceso se realiza un balance de materia a la proteína B-PE, obteniéndose como resultado que el

91,7% de la B-PE introducida en el alimento (Tabla 5.13) se recupera a la salida. Es decir, hay solo una diferencia de 13,6 mg de B-PE que no han sido cuantificados a la salida, esto puede ser atribuido a errores en la detección de las diferentes fracciones de las muestras analizadas.

Tabla 5.13.- Valores del volumen, cantidad y rendimiento de B-PE (respecto al alimento) en cada una de las etapas del proceso de purificación: adsorción y lavado en el RFV-LE y elución (1 y 2) en lecho sedimentado.

Fracciones analizadas	Volumen (mL)	B-PE (mg)	Rendimiento B-PE (%)
Alimento	620	164,0	-
Adsorción	620	3,0	1,8
Lavado	4630	5,4	3,3
Elución 1	858	120,0	73,2
Elución 2	429	22,0	13,4
Σ Elución 1 + Elución 2	1287	142,0	86,6
Σ Adsorción + Lavado + Elución (1 y 2)	6537	150,4	91,7

5.5.1.4. Pureza de las fracciones de B-PE eluidas

La pureza de las fracciones eluidas se determinan por la relación de absorbancias A_{545}/A_{280} . Cuando la relación A_{545}/A_{280} tiene un valor superior a 4 significa una alta pureza de B-PE, siendo muy baja la presencia de otras ficobiliproteínas (Bermejo et al., 2003). De los 120 mg de B-PE recogidos durante la etapa de elución 1, 112 mg corresponden a proteína de alta pureza, y de los 22 mg de B-PE obtenidos en la etapa de elución 2, 16 mg son de alta pureza. Por lo que, sumando ambas fracciones, podemos decir que el 78,1 % de la proteína B-PE introducida durante la etapa de adsorción se recupera con una relación $A_{545}/A_{280} > 4$ (Tabla 5.14). En total se obtienen 128 mg de B-PE de alta pureza de los 142 mg recogidos en las etapas de elución, por lo que el 90,1 % de la proteína recuperada es de alta pureza.

Resultados y Discusión

Tabla 5.14.- Relación de absorbancias (A_{545}/A_{280}), cantidad y rendimiento de B-PE de alta pureza en las etapas de elución (1 y 2).

Etapa del proceso	A_{545}/A_{280}	mg B-PE alta pureza	Rendimiento B-PE alta pureza (%)
Alimento	2,1	164	-
Elución 1	> 4	112	68,3
Elución 2	> 4	16	9,8
Σ Elución 1 + Elución 2	> 4	128	78,1

Un segundo método permite corroborar la alta pureza de la B-PE obtenida, dado que para cristalizar la B-PE por contradifusión molecular es condición necesaria que la proteína de la que se parte tenga una pureza superior al 95%. En la en la Figura 5.13 se puede observar una imagen de la cristalización de la proteína B-PE obtenida a partir de las muestras de las fracciones de alta pureza separadas en este trabajo (Camara-Artigas et al., 2012), realizado por el grupo de investigación BIO328 (Estructura de proteínas). Por lo que se puede asegurar que, al menos el 78,1% de la proteína obtenida es de una pureza igual o superior al 95%.



Figura 5.13.- Fotografía de un cristal de B-PE generado a través de la técnica de capilaridad de contradifusión a partir de una fracción purificada en el RFV-F3.

5.5.2. Aplicación del RFV en la recuperación y purificación del anticuerpo extracelular IgG2a a partir de un cultivo de hibridoma

5.5.2.1. Obtención del anticuerpo

El anticuerpo IgG2a es excretado al medio cuando se cultiva el hibridoma de ratón 55-6. El proceso se realiza por lotes y, en este caso, al ser una molécula extracelular, no es necesario romper las células del cultivo. En las condiciones de cultivo empleadas (apartado 4.8.1) se alcanzan tasas de crecimiento máximas de 0,018 y 0,034 h⁻¹. Al final de la fermentación, la concentración de anticuerpos en el caldo de cultivo es alrededor de 50 µg de IgG2a·mL⁻¹.

5.5.2.2. Determinación del pH de elución del anticuerpo IgG2a

El rendimiento durante la etapa de elución en el RFV está fuertemente influenciado por el pH de la disolución eluyente. A pH más ácido es más fácil que el anticuerpo se eluya completamente, pero a la vez las moléculas de anticuerpo se encontrarán en condiciones más desfavorables, pudiendo llegar a desnaturalizarse. Por este motivo, el fin de este ensayo, es identificar el pH más alto al que se pueda llevar a cabo la elución del IgG2a con un buen rendimiento.

Con el fin de definir el pH más conveniente para llevar a cabo la elución del anticuerpo IgG2a, se realiza un ensayo de cromatografía de adsorción en columna clásica de LE con la resina Streamline rProtein A. El procedimiento llevado a cabo está descrito en el apartado 4.8.2. Después de la carga de la resina y estabilización del lecho se lleva a cabo la etapa de adsorción. El alimento que se introduce en la columna son 250 mL de caldo de cultivo previamente clarificado con una concentración de IgG2a de 28,44 µg·mL⁻¹.

Después de las etapas de adsorción y lavado en LE se procede a la elución del anticuerpo en lecho sedimentado, para determinar el pH más adecuado. En la Figura 5.14 se representa la concentración de anticuerpo obtenida a la salida de la columna en cada una de las etapas del proceso versus el número de volúmenes de columna (VC) empleados.

Resultados y Discusión

El volumen de columna se refiere a 1 mL, correspondiente al volumen de resina empelado. Se observa que la concentración de anticuerpo recogida a pH 5 es muy superior a la recogida a pH 6, 4 y 3.

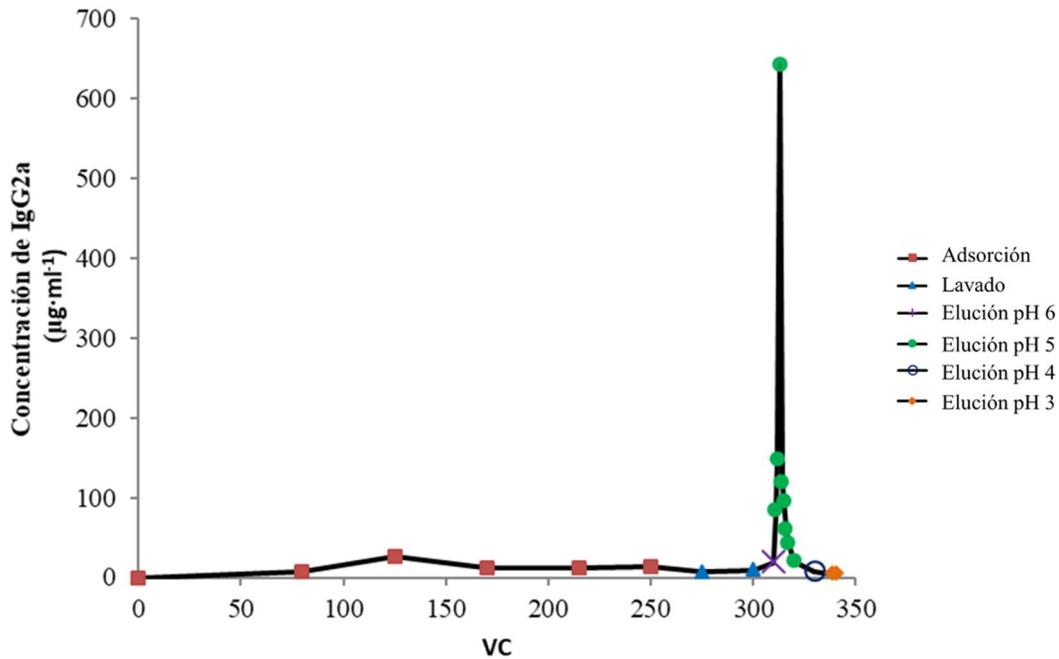


Figura 5.14.- Concentración de anticuerpo IgG2a frente al volumen introducido en la columna de cromatografía en las diferentes etapas del proceso: adsorción y lavado (lecho expandido), elución a pH 6, 5, 4 y 3 (lecho sedimentado).

En la Tabla 5.15 se muestra la cantidad de IgG2a recogida para cada pH. Como puede observarse, a pH 5 se recogen 1271,25 μg de IgG2a correspondiente al 81,9 % del anticuerpo eluido entre las cuatro fracciones. Según estos datos se elige como pH más adecuado el pH 5, seguido de una etapa posterior de elución a pH 3 para asegurar la total elución del anticuerpo adsorbido.

Tabla 5.15.- Cantidad del anticuerpo IgG2a cuantificado por Elisa-Sandwich y rendimiento de IgG2a en cada una de las eluciones respecto a la muestra eluida.

Muestras	Volumen (mL)	Cantidad de IgG2a (μg)	Rendimiento IgG2a (%)
Elución pH 6	10	166,77	10,7
Elución pH 5	10	1271,60	81,9
Elución pH 4	10	64,72	4,2
Elución pH 3	10	48,99	3,2
Total Elución	40	1552,08	100,0

5.5.2.3. Purificación de anticuerpo IgG2a en RFV

En la etapa de purificación (apartado 4.8.3) se utilizan 5 L de cultivo celular del hibridoma de ratón 55-6 con una concentración de anticuerpo IgG2a de $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (250 mg de IgG2a). Una vez ajustado el pH a 7,5 se mide la viscosidad (apartado 4.3) y la densidad (apartado 4.4), siendo sus valores $1,26 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ y $1150 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, respectivamente. Al realizar la medida de la viscosidad los resultados muestran una relación lineal entre el esfuerzo de corte y la rapidez de deformación, siendo el valor del índice de flujo (n) 1,02, por lo tanto, su comportamiento se corresponde al de un fluido newtoniano ($n=1$). En este caso, la velocidad de rotación del cilindro interno no afecta a la viscosidad cinemática del cultivo celular, que permanece constante ($1,1\cdot 10^{-6} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$). Como el cultivo muestra una viscosidad cinemática ligeramente superior a la del agua, la rotación del cilindro interno tiene que ser aumentada para adaptar las condiciones de operación a una relación Ta/Ta_c apropiada. Se opta por utilizar 50 rpm consiguiéndose una relación Ta/Ta_c de 1,5.

Los demás parámetros de operación utilizados durante la etapa de adsorción se eligen teniendo en cuenta: las características físicas del alimento y los datos de fluidodinámica (apartado 5.3), de transferencia de materia (apartado 5.4) y bibliográficos. Se selecciona una velocidad axial de $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$. En el trabajo de Thömmes (1996) se utiliza la misma velocidad axial para lograr una columna de LE estable y aislar anticuerpos monoclonales con la resina Streamline rProtein A. En este trabajo, el elevado volumen de alimento y la

baja concentración de anticuerpo hacen necesario utilizar la velocidad superficial más alta posible y un volumen de resina menor. Por ese motivo, se diseña el RFV-F1 de menor tamaño (50 mL de resina, correspondiente a 20 cm de altura de lecho sedimentado), pero manteniendo el mismo ancho anular que el RFV-F3. De esta forma se mantiene de forma aproximada la misma relación de aspecto que permite comparar a los dos RFV. El valor de Ta/Ta_c elegido es de 1,5, el cual está entre 1,2 y 1,7 asociados a los valores más altos del número de Péclet ($Pe= 42$, Tabla 5.8). Por lo que el flujo del fluido se corresponde con el de vórtices de Taylor, régimen avalado también por los ensayos visuales realizados previamente.

Los resultados que se obtienen en cada una de las etapas son los siguientes:

- Etapa de estabilización. El lecho se estabiliza con tampón fosfato de sodio a pH 7,5 manteniéndose estable a una altura $H_1 = 47$ cm.
- Carga del alimento. El caldo de cultivo se ajusta a pH 7,5 previamente a su introducción en el RFV. La etapa de adsorción de IgG2a en el RFV-LE dura ocho horas. En esta etapa la unión entre el ligando y la biomolécula se basa en la especificidad de los enlaces del anticuerpo IgG2a. El ligando de afinidad (rProtein A) del adsorbente se une únicamente al anticuerpo IgG2a, mediante enlaces y puntos de unión muy específicos y reversibles entre ambos.
- Adsorción. En la etapa de adsorción la altura del LE que se alcanza es de 54 cm (H_2). Aunque los valores de densidad y viscosidad del cultivo son solo ligeramente superiores a las propiedades físicas del tampón de equilibrio, la elevación de la altura del LE (7 cm) se puede atribuir a la presencia de células (concentración celular de $5 \cdot 10^6$ células \cdot mL⁻¹). Para la altura H_2 , el número de vórtices a lo largo de la longitud del RFV es de 120 (60 unidades de pares de vórtices o tanques agitados), manteniendo un comportamiento flujo pistón.

Los análisis realizados con la técnica Elisa-Sandwich a la salida del reactor, durante la etapa de adsorción, no detectan la presencia del anticuerpo (límite de detección inferior a 6,25 ng de IgG2a \cdot mL⁻¹), por lo que puede considerarse que todo el anticuerpo IgG2a es adsorbido en esta etapa.

Se determina la capacidad dinámica de adsorción y la productividad por ciclo, la cual se define como la cantidad de IgG2a adsorbida por mililitro de resina. El resultado obtenido para la capacidad dinámica de adsorción es de $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (250 mg de IgG2a en 50 mL de resina). La productividad por ciclo definida como la capacidad dinámica por volumen de resina, da un valor de 250 mg IgG2a por ciclo. Comparando el valor de capacidad dinámica de adsorción obtenida con los $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, reportados por Thömmes (1996), y sumado a que en el RFV a la salida el valor de la relación $[\text{IgG2a}]/[\text{IgG2a}]_0$ es igual a 0, se puede inferir que el RFV podría ser utilizado de forma eficaz con alimentos muchos más concentrados, aumentando así el valor de la capacidad dinámica de adsorción y productividad asociada.

- **Elución.** Durante la etapa de elución se obtienen 188 mg de IgG2a a pH 5 (Tabla 5.16.). Al disminuir el pH cambian los puntos de unión entre el ligando y el anticuerpo permitiendo su elución. La concentración media IgG2a a pH 5 es 7 veces más concentrada con respecto al alimento introducido (Figura 5.15). El rendimiento, sumando todas las fracciones eluidas a pH 5, es 75,1%. A pH 5 la fracción más elevada alcanza una relación $[\text{IgG2a}]/[\text{IgG2a}]_0$ de 30 (Figura 5.15), alcanzando una concentración de $1,47 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Con la fracción más concentrada se logra una recuperación del 24,6 % del anticuerpo, es decir 61,42 mg de IgG2a. Cuanto más diluida se encuentra la biomolécula de interés en el alimento mayor resulta el factor de concentración al final del proceso. Durante la segunda elución a pH 3 se recuperan 44,8 mg de IgG2a, lo que representa el 17,9 % de la IgG2a inicial. Entre los dos picos de elución se alcanza un rendimiento del 93,1% del IgG2a introducido en el RFV-F1.

En la Figura 5.15 se representa la relación $[\text{IgG2a}]/[\text{IgG2a}]_0$ frente a VC (número de volúmenes de columna) en las etapas de adsorción, lavado y elución, donde un volumen de columna representa 50 mL. $[\text{IgG2a}]/[\text{IgG2a}]_0$ es la relación entre la concentración del anticuerpo IgG2a a la salida en cada fracción analizada ($[\text{IgG2a}]$) y la concentración del alimento a la entrada ($[\text{IgG2a}]_0=0,05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Resultados y Discusión

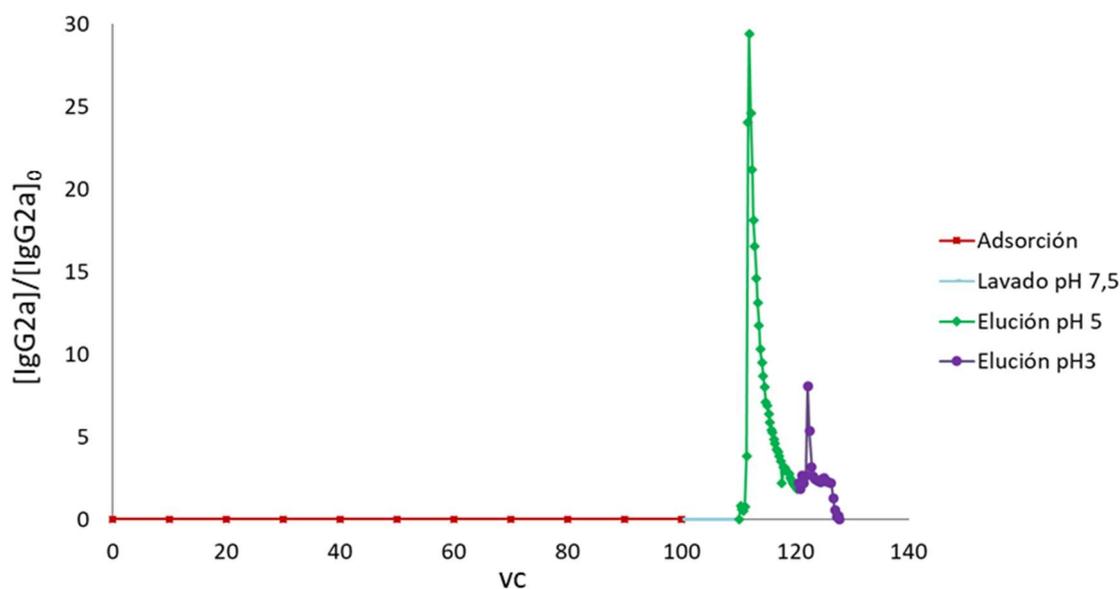


Figura 5.15.- Representación de $[IgG2a]/[IgG2a]_0$ frente a los volúmenes de columna (VC) en todas las etapas del proceso (adsorción, lavado, elución a pH 5 y elución a pH 3).

Tabla 5.16-. Datos obtenidos durante la purificación del anticuerpo IgG2a en el RFV-F1. Volumen, cantidad, concentración de anticuerpo y rendimiento de anticuerpo en cada una de las etapas (adsorción, lavado y eluciones) respecto al alimento.

Etapas de la purificación	Volumen (mL)	IgG2a (mg)	$[IgG2a]$ ($mg \cdot mL^{-1}$)	IgG2a Rendimiento (%)
Alimento	5000	250	0,05	100
Adsorción	5000	0	0	0
Lavado	250	0	0	0
Elución pH5	520	188	0,36	75,1
Elución pH3	370	44,8	0,12	17,9
Σ Elución pH5 + Elución pH3	890	232,28	0,26	93,1

5.5.2.4. Pureza de las fracciones de IgG2a eluidas

Tras analizar el cultivo para determinar los tipos de isotipos de inmunoglobulina presentes, el único isotipo que se detecta es el IgG2a. Por lo tanto, se puede considerar que el único isotipo de anticuerpo que contiene el caldo de cultivo es el correspondiente al IgG2a. En el análisis se utilizan kits basados en la técnica de detección Elisa (apartado 4.8.4).

Con esta información se procede a realiza el análisis SDS-PAGE (Figura 5.16), de esta forma se confirma la pureza de las fracciones obtenidas durante las etapas de elución. Las fracciones obtenidas en la elución a pH 5 (líneas 3, 4 y 5) se analizan y comparan con el patrón primario de IgG2a puro y los marcadores de peso molecular. Los resultados del análisis SDS-PAGE muestran una alta pureza de IGg2a para las tres fracciones, mayor para las fracciones de cola y cabeza mientras que algo menor para el pico obtenido en la cromatografía. Tanto el análisis de isotipado como el de SDS-PAGE, junto con la alta selectividad de la resina rProtein A para el de IgG2a, confirman una alta pureza de las fracciones del IgG2a eluidas a pH 5. Se considera que esta observación puede extrapolarse a las fracciones de IgG2a eluidas a pH 3. De esta forma se confirma que, es correcto llevar a cabo la cuantificación de contenido de proteínas en las fracciones eluidas utilizando la técnica de espectrofotometría y utilizando como patrón el anticuerpo IgG2a puro. Estos resultados están de acuerdo con la investigación realizada por Feuser (1999), quienes demuestran que la resina Streamline rProtein A presenta una selectividad más alta que la resina Streamline SP. Los autores no detectaron células de hibridoma ni presencia significativa de ADN unidos a la resina Streamline rProtein A en una columna de lecho fluidizado. En cambio, sí observan biomasa y ADN unidos al adsorbente Streamline SP en un sistema idéntico, que no se pudieron eliminar durante la etapa de lavado, dando como resultado la presencia de restos celulares y de ADN en las fracciones eluidas.

Resultados y Discusión

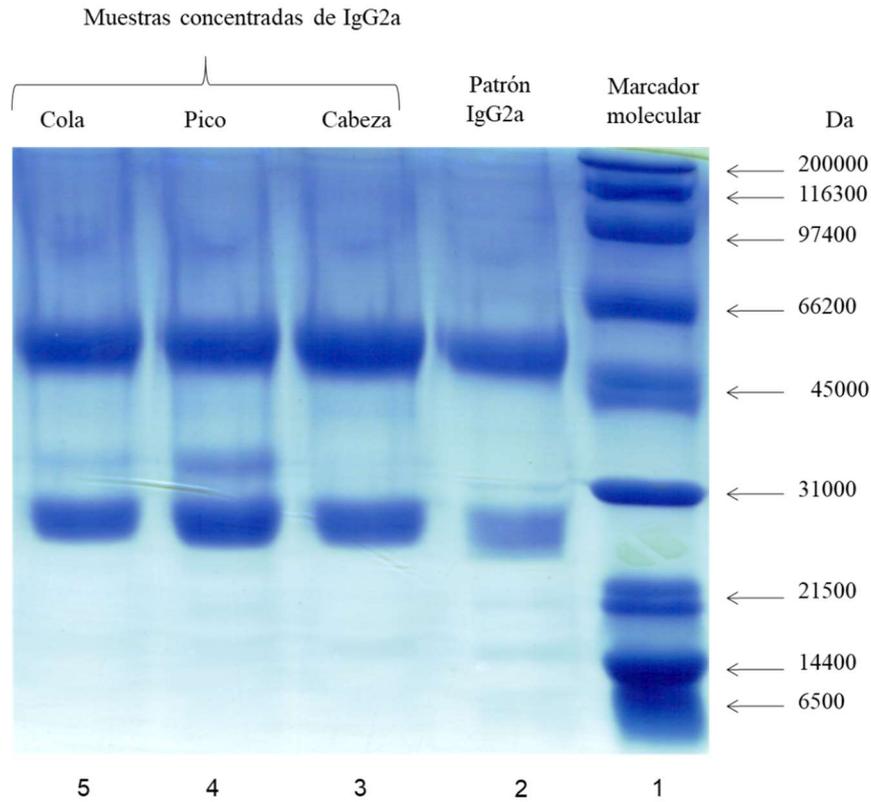


Figura 5.16.- Evaluación de la pureza de las fracciones eluidas durante la purificación de IgG2a en el RFV-F1. Imagen del gel de SDS-PAGE Carril 1: marcadores de peso molecular, 3-200 Da, Carril 2: Patrón de anticuerpo IgG2a. Carril 3, 4 y 5: fracciones de anticuerpo purificadas a pH 5.

5.5.2.5. Evaluación de los resultados obtenidos en la purificación de IgG2a en el RFV-F1.

La Tabla 5.17 muestra los rendimientos y las purezas de las fracciones obtenidas durante la purificación de anticuerpo IgG2a de diferentes procesos, con el fin de poder comparar los resultados bibliográficos con los obtenidos en este trabajo. Se muestra que, en comparación con las otras técnicas analizadas, el uso de la Proteína A en el RFV parece ser la mejor opción para obtener anticuerpos altamente puros en una sola etapa, incluyendo pasos de adsorción y elución. González et al (2003) utilizan una columna de LE con proteína A sin etapa previa de clarificación, de esta forma consiguen un rendimiento similar a los resultados mostrados en este trabajo y una mayor pureza. Sin

embargo, confirman que la presencia de ADN, liberado por las células de hibridomas lisadas, puede bloquear el plato poroso de la columna y por lo tanto impedir que el proceso se lleve a cabo de forma eficiente. Mediante el uso del RFV, este inconveniente se evita ya que la entrada se realiza a través de un orificio (2 mm de diámetro) que no se obstruye por la presencia de ADN o cualquier otra impureza. Además, cuando se analiza la velocidad del proceso, es decir, la relación entre el volumen de alimento tratado y el tiempo total del proceso (incluidos los tiempos de adsorción, lavado y elución), en el RFV se logra una velocidad de procesamiento de $7,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, tres veces mayor que la alcanzada por González et al (2003) que es de $2,4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ en una columna de LE. El tiempo total del proceso en el RFV podría ser mayor cuando se trabaja con alimentos de mayor viscosidad, pero las columnas clásicas (lecho empacado o expandido) no pueden competir debido a los bloqueos que se producen y que dan lugar a una caída de presión elevada.

Resultados y Discusión

Tabla 5.17.- Rendimiento y pureza del anticuerpo IgG2a purificado a través de diferentes procesos reportados en bibliografía.

Sistema de Purificación	Pasos	Procedimiento de trabajo	Anticuerpo Purificado	Rendimiento del proceso (%)	Pureza (%)	Referencia
Reactor de Flujo de Vórtice / Proteína A	Simple	1. Reactor de Flujo de Vórtice con Proteína A	IgG2a	93,1	Alta pureza	Este trabajo
Columna de Lecho expandido/ Proteína A	Simple	1. Lecho expandido con Proteína A	IgG2a	85	Alta pureza	(Thömmes et al., 1996)
Columna de Lecho expandido/ Proteína A	Simple	1. Lecho expandido con Proteína A	IgG2b	92	98	(González et al., 2003)
Sistema acuoso en dos fases	Múltiples	1. Homogenización 2. Incubación 3. Centrifugación 4. Sistema Acuoso en dos fases	IgG	97	95	(Azevedo et al., 2009)
Cromatografía con Ácido Fenilborónico	Múltiples	1. Clarificación del cultivo celular 2. Cromatografía multimodal	IgG	97,7	82,6	(Rosa et al., 2016)
Plataforma de purificación integrada	Múltiples	1. Carbón activo 2. Cromatografía de intercambio catiónico 3. Cromatografía de intercambio aniónico	IgG1	> 80	> 98	(Ichihara et al., 2018)

5.6. Evaluación de la viabilidad del RFV en lecho expandido

En este apartado a partir de datos bibliográficos (Swinnen et al., 2007) se compara, de forma teórica, la productividad de un anticuerpo monoclonal en el RFV-F1 con distintos procesos convencionales, de columna en lecho empacado, que trabajan con otros adsorbente de afinidad de Proteína A. Algunos de estos adsorbentes muestran una alta capacidad dinámica de adsorción y alta porosidad, que les permite trabajar a velocidades axiales más elevadas.

La productividad, que se define como el número de anticuerpos por litro de resina y por hora (P , $g \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$), se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$P (g \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}) = \frac{Q}{t_p} \quad (5.20)$$

donde Q ($g \cdot L^{-1}$) es la capacidad dinámica de adsorción del anticuerpo y t_p (h) es el tiempo de procesado cuando $C/C_0 = 0,1$. En el proceso tradicional en columna, el tiempo del proceso (ecuación 5.21) incluye tanto el tiempo de clarificación (t_c , h) como el tiempo de adsorción (t_a , h).

$$t_p (h) = t_c + t_a \quad (5.21)$$

En cambio, para el RFV-LE, solo se debe considerar la etapa de adsorción por afinidad al no realizarse una clarificación previa ($t_p = t_a$).

El tiempo de adsorción (t_a , h) está formado por el tiempo de las etapas de acondicionamiento, equilibrio, adsorción, lavado, elución y regeneración de la columna. Se calcula utilizando la ecuación de Swinnen modificada (Swinnen et al., 2007).

$$t_a (h) = \frac{Q}{C_0} \cdot U + \frac{22VC}{U} \quad (5.22)$$

donde el primer término corresponde al tiempo de adsorción, el segundo término representa el tiempo para las otras etapas que forman parte de la cromatografía, y se

supone 22 VC para el mismo caudal superficial (U , $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$) en la columna de lecho empacado.

Swinnen et al. (2007) comparan cinco resinas de afinidad de proteína A para la purificación de mAbs. Analizan la capacidad dinámica (Q) para los caudales superior e inferior del rango operativo de la columna. Las columnas presentan una longitud de 25 cm y un diámetro de 1,1 cm estando la altura del relleno comprendida entre 19,4 y 20 cm. El volumen de resina de cada una de ellas viene en la Tabla 5.18. El cultivo celular utilizado presenta una concentración de anticuerpos inicial de $0,68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, que se clarifica consecutivamente con un filtro de profundidad a $150 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ($0,027 \text{ m}^2$) y un filtro absoluto de $0,22 \mu\text{m}$ (13 mm de diámetro, $1,3 \text{ cm}^2$) a $1,08 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. Ambos filtros son para escala de laboratorio y la densidad de flujo viene dada por el fabricante. El tiempo de clarificación, teniendo en cuenta la doble filtración, se calcula mediante la ecuación 5.23, donde V_{ads} (L) es el volumen de resina contenido en la columna:

$$t_c(\text{h}) = \frac{Q \cdot V_{\text{ads}}}{C_0} \cdot \left(\frac{1}{150 \cdot 0,027} + \frac{1}{1,08 \cdot 1,3} \right) \quad (5.23)$$

El tiempo correspondiente a la etapa de clarificación y la etapa de adsorción, así como la productividad de los cinco adsorbentes en columna empacada se muestran en la Tabla 5.18.

Como se puede observar en la Tabla 5.18, el tiempo de clarificación aumenta con el aumento de la capacidad dinámica de adsorción o el volumen de cultivo celular. Por el contrario, el tiempo empleado para la etapa de adsorción disminuye con el aumento de la velocidad superficial. Por lo tanto, la productividad aumenta más con el aumento del caudal axial que con el aumento de la capacidad dinámica. Asimismo, se calcula la productividad para estos cinco adsorbentes (P^* , los datos entre paréntesis en la Tabla 5.18) considerando que se usan 50 mL de adsorbente para comparar la productividad con el RFV-F1.

Resultados y Discusión

Tabla 5.18.- Datos bibliográficos de Swinnen et al. (2007) de diferentes resinas para la adsorción de mAbs a partir de cultivo clarificado ($0,68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) en columna de lecho empacado, y los datos obtenidos de forma experimental en este trabajo en el RFV-F1 con la resina Streamline rProtein A y los obtenidos de forma teórica. Se exponen los valores de volumen de resina (V_{ads}), velocidad axial (U), VC procesado por hora ($VC\cdot h^{-1}$) y capacidad dinámica de adsorción (Q). Tiempo de clarificación (t_c), adsorción (t_a) y productividad calculados a partir de los datos bibliográficos (P).

Adsorbente	V_{ads} (L)	U ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)	$VC\cdot h^{-1(1)}$	$Q^{(2)}$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$t_c(t_c^*)$ (h)	t_a (h)	$P(P^*)$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
Prosep vA Ultra resin	0,019	500	25,0	43,5	1,2 (3,1)	3,4	9,4 (6,6)
Prosep A High Capacity	0,019	500	25,0	28,6	0,8 (2,0)	2,6	8,6 (6,2)
MabSelect	0,019	300	15,1	40,1	1,1 (2,9)	5,4	6,2 (4,9)
MabSelect Xtra	0,0184	200	10,3	60,1	1,6 (4,3)	10,7	4,9 (4,0)
Rmp Protein A Sepharose 4FF	0,0184	200	10,3	37,7	1,0 (2,7)	7,5	4,4 (3,7)
rProtein A RFV-F1 (experimental)	0,05	200	8,2	5,0	-	12,6	0,4
rProtein A RFV-F1 (teórico)	0,05	255	10,5	20,0	-	5	4

⁽¹⁾ Media del caudal axial superior e inferior (Swinnen et al., 2007).

⁽²⁾ Media de la capacidad dinámica obtenida para el caudal de flujo superior e inferior (Swinnen et al., 2007).

P^* y t_c^* productividad y tiempo de clarificación calculados para un volumen de adsorbente de 50 mL.

La productividad del RFV-LE (50 mL de Streamline rProtein A) es un valor bajo, de tan solo $0,40 \text{ g IgG2a}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. La capacidad dinámica ($5 \text{ mg IgG2a}\cdot\text{mL}^{-1}$) se calcula para $[\text{IgG2a}]/[\text{IgG2a}]_0=0$, en lugar de $[\text{IgG2a}]/[\text{IgG2a}]_0=0,1$, debido a que la concentración de anticuerpo es baja ($0,5 \text{ mg IgG2a}\cdot\text{L}^{-1}$) y el tiempo de adsorción a $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ es alto (8,1 h). Lo mismo ocurre con el tiempo de elución y los tiempos de regeneración para $100 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ (4,2 h) en lecho sedimentado. Si se estima la productividad para una concentración de anticuerpos de $0,68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, se pueden comparar los datos obtenidos en el RFV-F1 con

las productividades de los adsorbentes utilizados en columna de lecho empacado. Para ello se utilizan los valores optimizados publicados para Streamline rProtein A y el anticuerpo IgG2a (Thömmes et al., 1996): capacidad dinámica $20 \text{ mg IgG2a}\cdot\text{mL}^{-1}$, velocidad superficial de $360 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$, en la etapa de adsorción, y velocidad superficial, en la etapa de elución, de $150 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$. La productividad recalculada aumenta a $4,0 \text{ g IgG2a}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ al disminuir el tiempo de la etapa de adsorción desde 12,3 h a 5 h (Tabla 5.18).

Aunque la productividad de RFV-F1 podría competir con los adsorbentes que trabajan a un caudal más bajo y una capacidad dinámica de adsorción algo más elevada, a escala de laboratorio, no podría competir con los adsorbentes que trabajan con un caudal axial elevado, ya que, debido a su alta porosidad, pueden trabajar con la presión de bombeo alta. La productividad de RFV-F1 se podría mejorar si se contase con un adsorbente más denso que permita aumentar la velocidad axial y proporcionar una mayor capacidad dinámica de adsorción. Este tipo de adsorbentes, que cumplen con las características mencionadas, son los denominados adsorbentes de segunda generación (D'Souza et al., 2017). Con este tipo de adsorbente, la velocidad del flujo axial se mantiene constante en todas las etapas porque la elución también se realiza en LE (el doble de la altura del lecho sedimentado).

Trabajando a escala industrial, 2000 L por lote, se necesitan 14,1 L de adsorbente para trabajar con una columna empacada (Aldington y Bonnerjea, 2007). A esta escala, las columnas que tienen un diámetro superior a 30 cm sufren problemas de empaquetamiento que conducen a la compresión de la resina, el efecto de borde y la histéresis, donde se crean espacios muertos y diferentes velocidades de flujo en la columna (Gottschalk, 2008). Además, la etapa de clarificación necesitaría ocho horas, asumiendo que sea necesario realizar una doble filtración (Aldington y Bonnerjea, 2007). Esto se suma a la considerable inversión requerida para clarificar el cultivo y el complicado mantenimiento para realizar la filtración trabajando a presión, sobre todo cuando el caldo celular es viscoso. De acuerdo con la información reportada por Chahar et al. (2020), la etapa de clarificación implica costes que oscilan entre 7.000 y 12.000 US\$ por lote, así como el uso de filtración de flujo tangencial, con un costo de 1.500 US\$ por m^2 . Por lo tanto, usar el RFV-LE con adsorbentes de segunda generación es una opción atractiva a escala industrial, ya que evita los costes iniciales y los de mantenimiento de la etapa de clarificación, además de evitar cualquier problema de obstrucción asociado durante la

etapa de filtración. Investigaciones futuras deben centrarse en el escalamiento del RFV para poder tener opción a competir con las resinas macroporosas, que son las más demandas en el mercado actual, aunque que siguen teniendo problemas de obstrucción, que se agravan en gran medida a escala industrial.

En este sentido, en el siguiente apartado se discuten las posibilidades de escalado del RFV, utilizando los conocimientos adquiridos en otras aplicaciones, como son los de cromatografía de LE y los desarrollados en este trabajo acerca del funcionamiento del RFV en la purificación de proteínas.

5.7. Propuesta de criterios de escalamiento del RFV-LE

Curran y Black (2005) estudian el escalamiento del RFV utilizándolo como biorreactor. El criterio de escalamiento de los autores es mantener constante el número de unidades de pares de vórtices o la relación L/d. Para ello mantiene fija la relación Ta o Ta/Tac y el porcentaje del volumen útil del reactor, entendiéndose como porcentaje de volumen útil el volumen que ocupa el espacio anular con respecto al volumen que ocupa la carcasa externa multiplicándolo por cien. En la ecuación 5.24 se define el volumen útil y se observa que es función de la relación de radios:

$$\text{Volumen útil (\%)} = \left[1 - \left(\frac{r_i}{r_e} \right)^2 \right] \cdot 100 \quad (5.24)$$

De este modo, para aumentar el tamaño del reactor se aumenta la zona anular (d) y la longitud del RFV (L). Este mismo criterio es el utilizado por la empresa Laminar en la construcción de sus reactores (desde los 20 mL a los 10000 L) con aproximadamente 24-30 unidades de pares de vórtices o tanques agitados en serie. En el escalamiento, los RFV se van haciendo más largos y de mayor diámetro, manteniendo el tamaño útil en un 31%. En la Figura 5.17.a se muestra en color rojo el criterio de escalamiento (L/d) y las variables de operación (Ta o Ta/Tac) y geométricas (volumen útil) que permanecen constante en el escaldo del RFV para esta aplicación.

En este trabajo el RFV-LE se utiliza para adsorber y purificar biomoléculas, asemejándose a una cromatografía en LE. El escalado de una columna cromatográfica se

basa en mantener constante el tiempo de residencia (\bar{t}), para ello se fija velocidad axial (U) y la longitud de la columna (L). En el escalamiento hacia arriba se va haciendo más grande el diámetro de columna (D). En la Figura 5.17.b se muestra en color azul el criterio de escalamiento de tiempo fijo (\bar{t}), y las variables de operación (U) y geométricas (L) que permanecen fijas durante el escalado de la columna cromatográfica. Esto se debe a que la longitud está condicionada por la pérdida de carga asociada, y determina entonces el valor de U. Esto marca una diferencia con el RFV.

En los criterios de escalamiento fijados por la empresa Laminar (Laminar, 2022) y Curran y Black (2005) la longitud del RFV varía mientras que en el escalamiento de una columna cromatográfica permaneces constante. En este trabajo para realizar el escalamiento del RFV-LE (en color verde) por un lado, interesa mantener constante el número de unidades de pares de vórtices (H/d) para asegurar el mezclado radial (entre la proteína y el adsorbente) y por otro lado, interesa mantener constante el tiempo de residencia (\bar{t}) para que la biomolécula tenga tiempo para adsorberse. Para mantener ambos criterios de escalamiento una posible solución sería fijar el espacio anular (d) impuesto por el RFV-LE, y aumentar el tamaño incrementando a la vez tanto el radio del cilindro interno como el del externo, mientras se mantienen constante la altura del LE (H), la velocidad superficial (U) (coincidiendo con los parámetros que se fijan en la columna) y la relación T_a/T_{a_c} (según las necesidades propias del RFV). Este diseño es el que caracteriza el escalado desde el RFV-F1 (50 mL adsorbente) al RFV-F3 (135 mL adsorbente) para un ancho anular constante de 0,45 cm. Con este tipo de escalamiento los RFV solo crece en diámetro y son cada vez menos esbeltos. Por ejemplo, un RFV de cinco metros de diámetro externo (499,1 m de diámetro del cilindro interno) trabajaría con 14,1 L ($H_o = 20$ cm) de resina manteniendo el ancho anular de los RFV-F1 y RFV-F3, con un factor de escalamiento (relaciones de volúmenes de resina) de 282 respecto a RFV-F1 (50 mL). El inconveniente que presenta este escalamiento es que el porcentaje de volumen útil se va reduciendo, quedando mucho volumen desaprovechado. En este caso el volumen útil pasaría del 72% para RFV-F1 al 0,36 % para el RFV-F282. Cuanto mayor es el ancho anular seleccionado mayor es el volumen útil del reactor escalado.

La opción que permite aprovechar mejor el volumen del reactor sería mantener constante el criterio cromatográfico del tiempo de residencia (\bar{t}) asociado a mantener fijas la longitud (H) y la velocidad axial (U). Aunque de esta forma no se mantiene constate el

número de vórtices, sí se fija el volumen útil del reactor y la relación Ta/Ta_c (Figura 5.17.d). Por lo tanto, a partir del RFV-F1 (72,0 % volumen útil) se puede llegar a un factor escalamiento de 282 siendo las dimensiones, 32,4 cm de diámetro de carcasa externa y 12,4 cm de diámetro de cilindro interno (RFV-F282', 72,0 % volumen útil). La zona anular aumentaría a 10 cm. En ese caso la relación de aspecto baja considerablemente, por ejemplo, para una altura de LE de 47 cm el valor de H/d pasa de 104 (RFV-F1) a 5 (RFV-F282'). Para aplicar este criterio habría que verificar que un número de Pe por debajo de 20 y la relación Ta/Ta_c fijada sean suficientes para tener un LE estable que permita un buen contacto entre el adsorbente y la proteína, y que sea solo el tiempo de residencia el factor limitante.

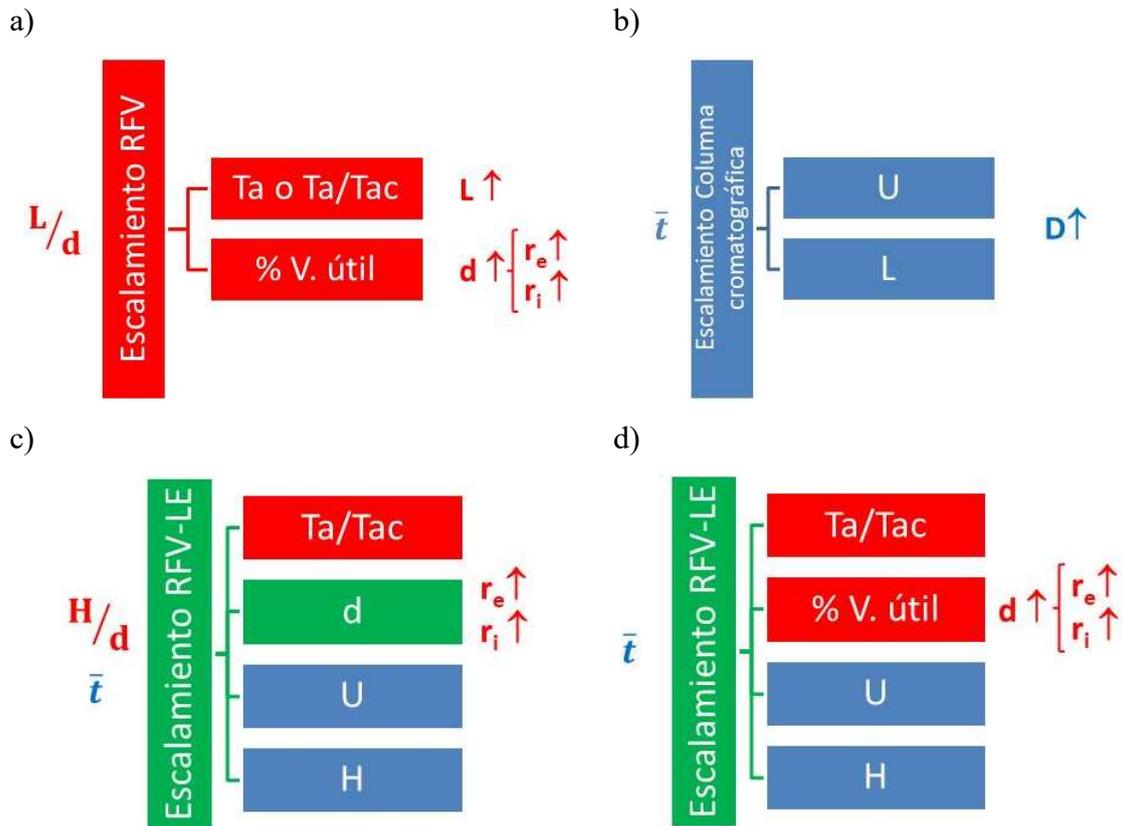


Figura 5.17.- Esquema de los criterios de escalamiento: a) L/d en el RFV, b) en la columna cromatográfica, c) H/d y en el RFV-LE y d) en el RFV-LE.

6. CONCLUSIONES

Conclusiones

Una estrategia para reducir los costes operativos para la obtención de biomoléculas es la reducción de las etapas que forman parte del proceso de purificación. En este trabajo, se ha llevado a cabo el diseño un RFV con el objetivo de ser empleados en la purificación de proteínas intra y extra celulares. El RFV desarrollado se ha evaluado de forma experimental en el proceso de purificación de proteínas y, según los resultados obtenidos, se puede concluir que ha demostrado ser eficiente para la purificación de proteínas a partir de caldos de cultivo sin clarificar. Estas conclusiones generales se pueden desglosar en las siguientes conclusiones específicas, las cuales están en línea con los objetivos planteados inicialmente:

- Se ha diseñado y patentado un RFV-LE eficiente para ser utilizado en los procesos de purificación de biomoléculas. Entre sus características diferenciadoras se puede mencionar una longitud de la carcasa externa de 1 m, con puertos de salida cada 2 cm, que permiten trabajar con distintas alturas del LE. Así mismo, el diseño permite trabajar en lecho sedimentado, compitiendo con las columnas de LE o empacado. Con este diseño, no se presentan los problemas de bloqueo del plato poroso, observados en la columna de LE, ni la obstrucción del lecho de adsorbente, habituales en las columnas de lecho empacado.
- Se ha caracterizado el RFV-LE:
 - Se han determinado las condiciones dentro del rango útil que permiten operar en un lecho fluidizado estable: velocidad axial entre 100 y 300 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$, altura de lecho sedimentado (entre 10 y 30 cm) y Ta/Tac (0,7 y 3,5).
 - Se han determinado el rango de condiciones de operación que permiten trabajar en condiciones flujo pistón y en régimen laminar de vórtices de Taylor. Velocidad axial entre 200 y 300 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$, altura del lecho sedimentado (20 y 30 cm) y $Ta/Tac > 1,2$.
 - Se ha determinado el rango de condiciones de operación que permiten realizar la adsorción de biomoléculas de forma eficiente. Velocidad axial entre 200 y 300 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$, altura del lecho sedimentado 20 cm. La capacidad dinámica de adsorción alcanza el 98,4 y el 89.6 % de la máxima posible, para el sistema ASB-Streamline DEAE-RFV-F3 y para las velocidades axiales de 200 y 300 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente.
- El nuevo RFV-LE se aplica con éxito a la purificación de B-PE de alta pureza, a

Conclusiones

partir de extracto concentrado de células rotas de *P. cruentum*. El RFV-F3 operando a $200 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$, $H_o = 20 \text{ cm}$ y $Ta/Tac = 1,5$, destaca como una mejora tecnológica ya que aporta la ventaja de poder trabajar directamente con extracto de proteína sin tratar disminuyendo el número de etapas de procesado. De esta forma se han eliminado las etapas previas de filtración y concentración de biomoléculas, dejando un diagrama de flujo de proceso más simple. Se puede asegurar que al menos el 78,1% de la proteína obtenida es de una pureza igual o superior al 95%.

- El nuevo RFV-LE es capaz de purificar con éxito anticuerpos IgG2a, a partir de un cultivo de hibridomas no clarificado, voluminoso y con baja concentración de anticuerpos. El proceso de purificación se lleva a cabo en el RFV-F1, operando a $300 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$, $H_o = 20 \text{ cm}$ y $Ta/Tac = 1,5$. Destaca como una mejora tecnológica ya que aporta la ventaja de poder trabajar disminuyendo el número de etapas de procesado con un rendimiento del 93,1% de anticuerpo IgG2a de alta pureza. Purificar biomoléculas extracelulares hace aún más notorio la disminución en el número de etapas previas a la purificación, dado que solo se necesita este dispositivo.

Perspectivas o líneas futuras:

- El RFV-LE tiene la ventaja adicional de modificar y reducir la viscosidad de alimentación pseudoplásticos, lo que lleva a una reducción de la resistencia a la transferencia de materia externa e interna durante el proceso de adsorción de biomoléculas sin necesidad de aumentar su temperatura. Esto le da una posición aventajada sobre otras técnicas de purificación.
- El RFV podría escalararse a nivel industrial aprovechando al máximo su volumen útil para el mínimo valor del número de Pe que garantice la eficacia del proceso de adsorción

7. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

- Alamer, M., Zamani, S., Fok, K., Satish, A., Lim, A.R., Joo, Y.L., 2020. Facile Production of Graphenic Microsheets and Their Assembly via Water-Based, Surfactant-Aided Mechanical Deformations. *ACS Appl Mater Interfaces* 12, 8944–8951. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b22824>
- Aldington, S., Bonnerjea, J., 2007. Scale-up of monoclonal antibody purification processes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 848, 64–78. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.032>
- Aljishi, M.F., Ruo, A.C., Park, J.H., Nasser, B., Kim, W.S., Joo, Y.L., 2013. Effect of flow structure at the onset of instability on barium sulfate precipitation in Taylor-Couette crystallizers. *J Cryst Growth* 373, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgr.2012.11.048>
- Ameer, G.A., Raghavan, S., Sasisekharan, R., Harmon, W., Cooney, C.L., Langer, R., 1999. Regional heparinization via simultaneous separation and reaction in a novel Taylor-Couette flow device. *Biotechnol Bioeng* 63, 618–624. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990605\)63:5<618::AID-BIT12>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990605)63:5<618::AID-BIT12>3.0.CO;2-3)
- Anspach, F.B., Curbelo, D., Hartmann, R., Garke, G., Deckwer, W.D., 1999. Expanded-bed chromatography in primary protein purification. *J Chromatogr A* 865, 129–144. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01119-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01119-X)
- Archibald, R.C., 1729. *Mathematical Principles*. Mathematical Association of America 42, 101–103. <https://doi.org/10.2307/2300729>
- Arpanaei, A., Heebøll-Nielsen, A., Hubbuch, J.J., Thomas, O.R.T., Hobbey, T.J., 2008. Critical evaluation and comparison of fluid distribution systems for industrial scale expanded bed adsorption chromatography columns. *J Chromatogr A* 1198–1199, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.044>
- Ashwin, P., Mann, G.W., 1995. Azimuthally Propagating Ring Vortices in a Model for Nonaxisymmetric Taylor Vortex Flow. *Phys Rev Lett* 75, 4610–4613. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.75.4610>
- Astill, K.N., 1964. *Studies of the Developing Flow Between Concentric Cylinders With the Inner.*

Bibliografía

- Azevedo, A.M., Rosa, P.A.J., Ferreira, I.F., Pisco, A.M.M.O., de Vries, J., Korporaal, R., Visser, T.J., Aires-Barros, M.R., 2009. Affinity-enhanced purification of human antibodies by aqueous two-phase extraction. *Sep Purif Technol* 65, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.03.006>
- Barnfield Frej, A. -K, Hjorth, R., Hammarström, Å., 1994. Pilot scale recovery of recombinant annexin V from unclarified escherichia coli homogenate using expanded bed adsorption. *Biotechnol Bioeng* 44, 922–929. <https://doi.org/10.1002/bit.260440808>
- Barnfield Frej, A.K., Johansson, H.J., Johansson, S., Leijon, P., 1997. Expanded bed adsorption at production scale: Scale-up verification, process example and sanitization of column and adsorbent. *Bioprocess Engineering* 16, 57–63. <https://doi.org/10.1007/s004490050288>
- Becker, K.M., Kaye, J., 1962. Measurements of diabatic flow in an annulus with an inner rotating cylinder. *Journal of heat transfer of heat transfer* 84, 97–104. <https://doi.org/10.1115/1.3684335>
- Becker, W., Scherer, A., Faust, C., Bauer, D.K., Scholtes, S., Rao, E., Hofmann, J., Schauder, R., Langer, T., 2019. A fully automated three-step protein purification procedure for up to five samples using the NGC chromatography system. *Protein Expr Purif* 153, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.08.003>
- Beck, J.T., 1999. Direct coupling of expanded bed adsorption with a downstream purification step. *Bioseparation* 8, 201–207.
- Behr, A., Färber, T., 2015. Application of a Taylor-Couette reactor in homogeneous catalysis. *Chem Eng Trans* 43, 835–840. <https://doi.org/10.3303/CET1543140>
- Belter, P.A., Cunningham, F.L., Chen, J.W., 1973. Development of a Recovery Process for Novobiocin. *Biotechnol Bioeng* 3, 533–549.
- Bennett, A., Bogorad, L., 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga 58, 419–435. <https://doi.org/10.10183/jcb.58.2419>
- Bermejo, R., Ación, F.G., Ibáñez, M.J., Fernández, J.M., Molina, E., Alvarez-Pez, J.M., 2003. Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium*

- cruentum by expanded-bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B* 790, 317–325. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00168-5](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00168-5)
- Bermejo, R., Ruiz, E., Acien, F.G., 2007. Recovery of B-phycoerythrin using expanded bed adsorption chromatography: Scale-up of the process. *Enzyme Microb Technol* 40, 927–933. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.027>
- Bermejo, R., Talavera, E.M., Alvarez-Pez, J.M., 2001. Chromatographic purification and characterization of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* Semipreparative high-performance liquid chromatographic separation and characterization of its subunits, *Journal of Chromatography A*.
- Bermejo, R., Talavera, E.M., Alvarez-Pez, M., Orte, J.C., 1997. Chromatographic purification of biliproteins from *Spirulina platensis* High-performance liquid chromatographic separation of their α and β subunits, *Journal of Chromatography A*.
- Bryant, D.A., Guglielmi, G., Marsac, N.T. de, Castets, A., Cohen-Bazire, G., 1979. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model 123, 113–127. <https://doi.org/10.1007/BF00446810>
- Burgess, R.R., 2018. A brief practical review of size exclusion chromatography: Rules of thumb, limitations, and troubleshooting. *Protein Expr Purif.* <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.05.007>
- Burns, M.A., Graves, D.J., 1985. Continuous Affinity Chromatography Using a Magnetically Stabilized Fluidized Bed. *Biotechnol Prog* 1, 95–103.
- Camara-Artigas, A., Bacarizo, J., Andujar-Sanchez, M., Ortiz-Salmeron, E., Mesa-Valle, C., Cuadri, C., Martin-Garcia, J.M., Martinez-Rodriguez, S., Mazzuca-Sobczuk, T., Ibañez, M.J., Allen, J.P., 2012. PH-dependent structural conformations of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *FEBS Journal* 279, 3680–3691. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08730.x>
- Campos-Pinto, I., Espitia-Saloma, E., Rosa, S.A.S.L., Rito-Palomares, M., Aguilar, O., Arévalo-Rodríguez, M., Aires-Barros, M.R., Azevedo, A.M., 2017. Integration of cell harvest with affinity-enhanced purification of monoclonal antibodies using

Bibliografia

- aqueous two-phase systems with a dual tag ligand. *Sep Purif Technol* 173, 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.09.017>
- Carta, G., Jungbauer, A., 2020. *Protein Chromatography: Process Development and Scale-up*, Weinheim. ed.
- Chahar, D.S., Ravindran, S., Pisal, S.S., 2020. Monoclonal antibody purification and its progression to commercial scale. *Biologicals* 63, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.09.007>
- Chang, Y.K., Chase, H.A., 1996. Ion exchange purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates using expanded bed adsorption. *Biotechnol Bioeng* 49, 204–216. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960120\)49:2<204::AID-BIT9>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960120)49:2<204::AID-BIT9>3.0.CO;2-U)
- Chase, H.A., 1994. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. *Trends Biotechnol* 12, 296–303. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(94\)90046-9](https://doi.org/10.1016/0167-7799(94)90046-9)
- Chew, K.W., Yap, J.Y., Show, P.L., Suan, N.H., Juan, J.C., Ling, T.C., Lee, D.J., Chang, J.S., 2017. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresour Technol* 229, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>
- Choe, W., Durgannavar, T.A., Chung, S.J., 2016. Fc-binding ligands of immunoglobulin G: An overview of high affinity proteins and peptides. *Materials* 9. <https://doi.org/10.3390/ma9120994>
- Cornish, R.J., 1933. Flow of water through fine clearances with relative motion of the boundaries. *Proceedings, Royal Society (London), series A, Mathematical and physical character* 140, 227–240. <https://doi.org/10.2307/95906>
- Costa, J.A.V., Freitas, B.C.B., Moraes, L., Zapparoli, M., Morais, M.G., 2020. Progress in the physicochemical treatment of microalgae biomass for value-added product recovery. *Bioresour Technol*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122727>
- Couette, M., 1890. Études sur le frottement des liquides. *Annales de chimie et de physique* 433.

Bibliografía

- Craik, A.D.D., 2005. George Gabriel stokes on water wave theory. *Annu Rev Fluid Mech* 37, 23–42. <https://doi.org/10.1146/annurev.fluid.37.061903.175836>
- Cuatrecasas, P., Wilchek, M., Anfinsen, C.B., 1968. Selective Enzyme Purification by Affinity Chromatography.
- Curran, S.J., Black, R.A., 2005. Taylor-Vortex bioreactors for enhanced mass transport. *Bioreactors for Tissue Engineering: Principles, Design and Operation* 47–85. https://doi.org/10.1007/1-4020-3741-4_3
- Deen, W.M., 1998. Analysis of transport phenomena. Oxford University Press, New York.
- de Jesus Raposo, M.F., de Morais, R.M.S.C., de Morais, A.M.M.B., 2013. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sci* 93, 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.002>
- Dherbecourt, D., Charton, S., Lamadie, F., Cazin, S., Climent, É., 2016. Experimental study of enhanced mixing induced by particles in Taylor-Couette flows 108, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2016.02.025i>
- Dong, J., Kojima, T., Ohashi, H., Ueda, H., 2015. Optimal fusion of antibody binding domains resulted in higher affinity and wider specificity. *J Biosci Bioeng* 120, 504–509. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.03.014>
- Donnelly, R., 1991. Taylor-couette flow: The early days. *Phys Today* 44, 32–39. <https://doi.org/10.1063/1.881296>
- Doran, P.M., 2013. Chapter 11. Unit Operations, in: *Bioprocess Engineering Principles*. pp. 445–595. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2009-0-22348-8>
- D'Souza, R.N., Kakarla, P.B., Yelemane, V., Meyer, R., den Boer, P., Fernández-Lahore, M., 2017. Controlling cell adhesion in antibody purification by expanded bed adsorption chromatography. *Sep Purif Technol* 183, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.03.002>
- Dutta, P.K., Ray, A.K., 2004. Experimental investigation of Taylor vortex photocatalytic reactor for water purification, in: *Chemical Engineering Science*. Elsevier Ltd, pp. 5249–5259. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.07.091>

- Dvir, I., van Moppes, D., Arad, S.M., 2020. Foodomics: To Discover the Health Potential of Microalgae, in: *Comprehensive Foodomics*. Elsevier, pp. 658–671. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22888-6>
- Ewert, S., 2016. Development of robust expanded bed adsorption processes for cGMP manufacture of biopharmaceutical products. University of Birmingham.
- Fabregas, J., Garcia, D., Morales, E., Otero, A., 1998. Renewal Rate of Semicontinuous Cultures of the Microalga *Porphyridium cruen turn* Modifies Phycoerythrin, Exopolysaccharide and Fatty Acid Productivity. *J Ferment Bioeng* 86, 477–481.
- Fage, A., 1938. The influence of wall oscillations, wall rotation, and entry eddies, on the breakdown of laminar flow in an annular pipe. *Proc R Soc Lond A Math Phys Sci* 165, 501–529. <https://doi.org/10.2307/97038>
- Färber, T., Riechert, O., Zeiner, T., Sadowski, G., Behr, A., Vorholt, A.J., 2016. Homogeneously catalyzed hydroamination in a Taylor–Couette reactor using a thermomorphic multicomponent solvent system. *Chemical Engineering Research and Design* 112, 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2016.06.022>
- Färber, T., Schulz, R., Riechert, O., Zeiner, T., Górak, A., Sadowski, G., Behr, A., 2015. Different recycling concepts in the homogeneously catalysed synthesis of terpenyl amines. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 98, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2015.09.016>
- Fenneteau, F., Aomari, H., Chahal, P., Legros, R., 2003. Modeling of scale-down effects on the hydrodynamics of expanded bed adsorption columns. *Biotechnol Bioeng* 81, 790–799. <https://doi.org/10.1002/bit.10522>
- Ferreira, A.L.O., Giordano, R.L.C., Giordano, R.C., 2007. Nonconventional reactor for enzymatic synthesis of semi-synthetic β -lactam antibiotics. *Ind Eng Chem Res* 46, 7695–7702. <https://doi.org/10.1021/ie0614071>
- Feuser, J., Halfar, M., Lütkemeyer, D., Ameskamp, N., Kula, M.R., Thömmes, J., 1999. Interaction of mammalian cell culture broth with adsorbents in expanded bed adsorption of monoclonal antibodies. *Process Biochemistry* 34, 159–165. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00083-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00083-1)

Bibliografia

- Ficner, R., Lobeck, K., Schmidt, G., Huber, R., 1992. Isolation, Crystallization, Crystal Structure Analysis and Refinement of B-Phycoerythrin of the Red Alga *Porphyridium sordidum* at 2.2 Å Resolution, *J. Mol. Biol.*
- Gaignard, C., Gargouch, N., Dubessay, P., Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Fendri, I., Abdelkafi, S., Michaud, P., 2019. New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnol Adv* 37, 193–222. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.014>
- Gailliot, F.P., Gleason, C., Wilson, J.J., Zwarick, J., 1990. Fluidized Bed Adsorption for Whole Broth Extraction. *Biotechnol Prog* 6, 370–375. <https://doi.org/10.1021/bp00005a009>
- Galland-Irmouli, A.V, Pons, L., Luçon, M., Villaume, C., Mrabet, N.T., Gueant, J.L., Fleurence, J., 2000. One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis, *Journal of Chromatography B*.
- Gantt, E., Lipschultz, C.A., 1974. Phycobilisomes of *Porphyridium Cruentum*. Pigment Analysis. *Biochemistry* 13, 2960–2966. <https://doi.org/10.1021/bi00711a027>
- Gao, X., Kong, B., Vigil, R.D., 2015. Characteristic time scales of mixing, mass transfer and biomass growth in a Taylor vortex algal photobioreactor. *Bioresour Technol* 198, 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.013>
- Giordano, R.C., Giordano, R.L.C., Prazeres, D.M.F., Cooney, C.L., 1998. Analysis of a Taylor-Poiseuille vortex flow reactor-I: Flow patterns and mass transfer characteristics. *Chem Eng Sci* 53, 3635–3652. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(98\)00179-1](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(98)00179-1)
- Giordano, R.L.C., Giordano, R.C., Cooney, C.L., 2000. Performance of a continuous Taylor-Couette-Poiseuille vortex flow enzymic reactor with suspended particles. *Process Biochemistry* 35, 1093–1101. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00143-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00143-6)
- Glazer, A.N., Apell, G.S., Hixson, C.S., Bryant, D.A., Rimon, S., Brown, D.M., 1976. Biliproteins of cyanobacteria and Rhodophyta: Homologous family of

Bibliografía

- photosynthetic accessory pigments (phycobiliproteins/amino-terminal sequences/evolution/structure-function relationships), *Biochemistry*.
- Goey, C.H., Alhuthali, S., Kontoravdi, C., 2018. Host cell protein removal from biopharmaceutical preparations: Towards the implementation of quality by design. *Biotechnol Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.021>
- González, Y., Ibarra, N., Gómez, H., González, M., Dorta, L., Padilla, S., Valdés, R., 2003. Expanded bed adsorption processing of mammalian cell culture fluid: Comparison with packed bed affinity chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 784, 183–187. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00712-2](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00712-2)
- Gottschalk, U., 2008. Bioseparation in antibody manufacturing: The good, the bad and the ugly. *Biotechnol Prog* 24, 496–503. <https://doi.org/10.1021/bp070452g>
- Grabowski, J., Gantt, E., 1977. Excitation energy migration in phycobilisomes: comparison of experimental results and theoretical predictions. *Photochem Photobiol* 28, 47–54.
- Guillard, R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, in: *Culture of Marine Invertebrate Animals*. pp. 29–60. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3
- Guiochon, G., Beaver, L.A., 2011. Separation science is the key to successful biopharmaceuticals. *J Chromatogr A* 1218, 8836–8858. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.008>
- Hage, D.S., Anguizola, J.A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., Pfaunmiller, E., Vargas, J., Zheng, X., 2012. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *J Pharm Biomed Anal.* <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.004>
- Hilditch, C.M., Smith, A.J., Balding, P., Rogers, L.J., 1991. C-Phycocyanin from the cyanobacterium *aphanothece halphytica*, *Phytochemistry*.
- Hjorth, R., 1997. Expanded-bed adsorption in industrial bioprocessing: recent developments. *Trends Biotechnol* 15, 230–235. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(97\)01045-7](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(97)01045-7)

Bibliografía

- Hjorth, R., Leijon, P., Barnfield Frej, A.K., Jägersten, C., 1998. Expanded Bed Adsorption Chromatography, in: Subramanian, G. (Ed.), *Bioseparation and Bioprocessing*. WILEY-VCH, Catenbury, UK, pp. 199–226.
- Ho, R.J.Y., Gibaldi, M., 2013. *Biotechnology and Biopharmaceuticals: Transforming Proteins and Genes Into Drugs*, 2nd Edition, 2nd Edition. ed, *Clinical Infectious Diseases*. John Wiley & Sons, Somerset, NJ, USA. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu792>
- Hsieh-Lo, M., Castillo, G., Ochoa-Becerra, M.A., Mojica, L., 2019. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. *Algal Res*. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101600>
- Hubacz, R., Masuda, H., Horie, T., Ohmura, N., 2017. Thermal treatment of starch slurry in couette-Taylor flow apparatus. *Chemical and Process Engineering - Inzynieria Chemiczna i Procesowa* 38, 345–361. <https://doi.org/10.1515/cpe-2017-0027>
- Hubacz, R., Ohmura, N., Dluska, E., 2013. Intensification of starch processing using apparatus with couette-taylor flow. *J Food Process Eng* 36, 774–785. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12046>
- Hubbuck, J.J., Heebøll-Nielsen, A., Hobley, T.J., Thomas, O.R.T., 2002. A new fluid distribution system for scale-flexible expanded bed adsorption. *Biotechnol Bioeng* 78, 35–43. <https://doi.org/10.1002/bit.10170>
- Ibáñez-González, M.J., Cooney, C.L., 2007. Studies on protein adsorption in a vortex flow reactor. *Process Biochemistry* 42, 1592–1601. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.08.012>
- Ibáñez-Gonzalez, M.J., Mazuca Sobczuk, T., Molina Grima, E., 2013. Procedimiento de purificación de biomoléculas que utiliza cromatografía en lecho expandido. ES Patent, Número de Patente 2383866.
- Ibáñez González, M.J., Mazzuca Sobczuk, T., Redondo Miranda, R.M., Molina Grima, E., Cooney, C.L., Orteja Ruiz, J., Torres Castañeda, J., 2015. Reactor de flujo de vórtice para la adsorción y purificación de biomoléculas. 2536461.

- Ichihara, T., Ito, T., Kurisu, Y., Galipeau, K., Gillespie, C., 2018. Integrated flow-through purification for therapeutic monoclonal antibodies processing. *MAbs* 10, 325–334. <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1417717>
- Jung, T.M., Dailey, M.O., 1989. A novel and inexpensive source of aUophycocyanin for multicolor flow cytometry, *Journal of Immunological Methods*.
- Kádár, R., Liu, Z., Kind, M., Bălan, C., 2010. Influence of hydrodynamic activation on a polymerization reaction in a Taylor-Couette reactor. *U.P.B. Sci. Bull., Series D* 72.
- Karau, A., Benken, C., Thö, J.T., Kula, M.-R., 1997. The Influence of Particle Size Distribution and Operating Conditions on the Adsorption Performance in Fluidized Beds 1991) for model proteins on Sepharose were performed, *Biotechnol Bioeng*.
- Kataoka, K., Doi, H., Hongo, T., Futagawa, M., 1975. Ideal plug-flow properties of taylor vortex flow. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 8, 472–476. <https://doi.org/10.1252/jcej.8.472>
- Kataoka, K., Ohmura, N., Kouzu, M., Simamura, Y., Okubo, M., 1995. Emulsion polymerization of styrene in a continuous Taylor vortex flow reactor, *Chemical Engineering Science*.
- Kaye, J., Elgar, E.C., 1958. Modes of adiabatic and diabatic fluid flow in an annulus with an inner rotating cylinder. *Transactions of the American Society of Mechanical Engineers* 80, 753–763. <https://doi.org/10.1115/1.4012502>
- Kilpatrick, K.A., 1985. The development of a method to measure marine cyanobacterial phycoerythrin extracted in solvent. Boston University. <https://doi.org/https://doi.org/10.1115/1.4012502>
- Kim, J.E., Kim, W.S., 2017. Synthesis of Core-Shell Particles of Nickel-Manganese-Cobalt Hydroxides in a Continuous Couette-Taylor Crystallizer. *Cryst Growth Des* 17, 3677–3686. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b00225>
- Kim, M., Park, K.J., Lee, K.U., Kim, M.J., Kim, W.S., Kwon, O.J., Kim, J.J., 2014. Preparation of black pigment with the Couette-Taylor vortex for electrophoretic displays. *Chem Eng Sci* 119, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.08.036>

Bibliografía

- Kong, B., Shanks, J. v., Vigil, R.D., 2013. Enhanced algal growth rate in a Taylor vortex reactor. *Biotechnol Bioeng* 110, 2140–2149. <https://doi.org/10.1002/bit.24886>
- Kronick, M.N., Grossman, P.D., 1983. Immunoassay Techniques with Fluorescent Phycobiliprotein Conjugates, *CLIN. CHEM.*
- Kruljec, N., Bratkovič, T., 2017. Alternative Affinity Ligands for Immunoglobulins. *Bioconj Chem.* <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00335>
- Labrou, N.E., 2021. Protein purification technologies, in: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 3–10. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0775-6_1
- Laminar, 2022. LAMINAR - The world's first Taylor Reactor for Chemical Materials. URL <https://www.laminarm.com> (accessed 1.15.23).
- Langer, E., Rader, R.A., 2017. Top trends in biopharmaceutical manufacturing, 2017. *Pharmaceutical Technology* 41, 58–60.
- Lee, M.C., Yeh, H.Y., Jhang, F.J., Lee, P.T., Lin, Y.K., Nan, F.H., 2021. Enhancing growth, phycoerythrin production, and pigment composition in the red alga *Coelaconema* sp. Through optimal environmental conditions in an indoor system. *Bioresour Technol* 333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125199>
- Lee, S., Lueptow, R.M., 2001. Rotating reverse osmosis: A dynamic model for flux and rejection. *J Memb Sci* 192, 129–143. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(01\)00493-8](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(01)00493-8)
- Lesaut, X., Costioli, M., Jordan, L., Lambert, J., Beighley, R., Provencher, L., Gerwe, B., Mcguire, K., Verlinden, N., Barry, A., 2016. Automated small-scale protein purification and analysis for accelerated development of protein therapeutics. *Eng Life Sci* 16, 179–184. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400252>
- Levenspiel, O., 2012. The dispersion model. *Fluid Mechanics and its Applications* 96, 47–70. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8074-8_6
- Levenspiel, O., 1984. *Engineering Flow and Heat Exchange*. Plenum Press, New York. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6907-7>
- Levenspiel, O., 1974. Ingeniería de la reacción química, in: *Ingeniería de La Reacción Química*.

- Levenspiel, O., 1972. Chemical reaction engineering. Wiley, New York.
- Li, J., Chase, H.A., 2009a. Characterization and evaluation of a macroporous adsorbent for possible use in the expanded bed adsorption of flavonoids from *Ginkgo biloba* L. *J Chromatogr A* 1216, 8730–8740. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.092>
- Li, J., Chase, H.A., 2009b. Use of expanded bed adsorption to purify flavonoids from *Ginkgo biloba* L. *J Chromatogr A* 1216, 8759–8770. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.03.002>
- Li, P., Gomes Ferreira, P., Loureiro, J.M., Rodrigues, A.E., 2014. Proteins Separation and Purification by Expanded Bed Adsorption and Simulated Moving Bed Technology, in: Subramanian, G. (Ed.), *Continuous Processing in Pharmaceutical Manufacturing*. pp. 1–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9783527673681.ch01>
- Li, P., Xiu, G., Rodrigues, A.E., 2004. A 3-zone model for protein adsorption kinetics in expanded beds. *Chem Eng Sci* 59, 3837–3847. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.06.008>
- Li, S., Ji, L., Shi, Q., Wu, H., Fan, J., 2019. Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae *Porphyridium* spp. *Bioresour Technol*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122048>
- Li, T., Xu, J., Wang, W., Chen, Z., Li, C., Wu, Hualian, Wu, Houbo, Xiang, W., 2021. A novel three-step extraction strategy for high-value products from red algae *porphyridium purpureum*. *Foods* 10. <https://doi.org/10.3390/foods10092164>
- Liu, Z., Kádár, R., Kind, M., 2011. Hydrodynamic activation of the batch-polymerization of methyl methacrylate in a taylor-couette reactor, in: *Macromolecular Symposia*. pp. 169–178. <https://doi.org/10.1002/masy.201000045>
- Luan, P., Lee, S., Arena, T.A., Paluch, M., Kansopon, J., Viajar, S., Begum, Z., Chiang, N., Nakamura, G., Hass, P.E., Wong, A.W., Lazar, G.A., Gill, A., 2018. Automated high throughput microscale antibody purification workflows for accelerating antibody discovery. *MAbs* 10, 624–635. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1445450>

Bibliografia

- Lueptow, R.M., Docter, A., Min, K., 1992. Stability of axial flow in an annulus with a rotating inner cylinder. *Physics of Fluids A* 4, 2446–2455. <https://doi.org/10.1063/1.858485>
- Ma, J., Cooney, C.L., 2004. Application of Vortex Flow Adsorption Technology to Intein-Mediated Recovery of Recombinant Human α 1-Antitrypsin. *Biotechnol Prog* 20, 269–276. <https://doi.org/10.1021/bp0341803>
- Majji, M. v., Morris, J.F., 2018. Inertial migration of particles in Taylor-Couette flows. *Physics of Fluids* 30. <https://doi.org/10.1063/1.5020220>
- Mallock, A., 1896. Experiments on fluid viscosity. *Philos Trans R Soc Lond* 187, 41–56.
- Mallock, A., 1888. Determination of the viscosity of water. *Proceedings of the Royal Society of London* 45, 126–132.
- Manikandan, N.A., Pakshirajan, K., Pugazhenti, G., 2021. A novel rotating wide gap annular bioreactor (Taylor-Couette type flow) for polyhydroxybutyrate production by *Ralstonia eutropha* using carob pod extract. *J Environ Manage* 299. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113591>
- Margules, M., 1881. On Determining the Coefficients of Friction and Sliding From Horizontal Movements in Liquids. *Sitz. Akad. Wissen. Wien, Math.—Natur.* 83, 588–602.
- Masuda, H., Horie, T., Hubacz, R., Ohmura, N., 2013. Process intensification of continuous starch hydrolysis with a Couette-Taylor flow reactor. *Chemical Engineering Research and Design* 91, 2259–2264. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.08.026>
- Milly, P.J., Toledo, R.T., Kerr, W.L., Armstead, D., 2008. Hydrodynamic cavitation: Characterization of a novel design with energy considerations for the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice. *J Food Sci* 73. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00827.x>
- Moore, C.M.V., 1994. Characterization of a Taylor-Couette Vortex Flow Reactor. Tesis Doctoral. Massachusetts Institute of Technology.

Bibliografía

- Moore, C.M.V., Cooney, C.L., 1995. Axial dispersion in Taylor-Couette flow. *AIChE Journal* 41, 723–727. <https://doi.org/10.1002/aic.690410329>
- Murtaugh, J.J., Guilford, Caldas, I., Lawrenceburg, J., 1961. Ion-exchange methods for the purification of streptomycin. 2,970,138.
- Nguyen, A.T., Kim, W.S., 2017. Effect of sinusoidal Taylor vortex flow on cooling crystallization of L-lysine. *Korean Journal of Chemical Engineering* 34, 1896–1904. <https://doi.org/10.1007/s11814-017-0059-4>
- Owczarek, B., Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., 2019. A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals. *Biomed Res Int.* <https://doi.org/10.1155/2019/4216060>
- Palsson, E., Axelsson, A., Larsson, P.-O., 2001. Theories of chromatographic efficiency applied to expanded beds, *Journal of Chromatography A*.
- Parker, J., Merati, P., 1996. An Investigation of Turbulent Taylor-Couette Flow Using Laser Doppler Velocimetry in a Refractive Index Matched Facility.
- Park, K., Yang, D.R., 2015. Modeling and simulation for feasibility study of Taylor-Couette crystallizer as crystal seed manufacturing system, in: *IFAC-PapersOnLine*. pp. 321–324. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2015.08.201>
- Pharmacia Biotech, 1997. Introduction to Expanded Bed Adsorption 1–160.
- Queiroz, J.A., Tomaz, C.T., Cabral, J.M.S., 2001. Hydrophobic interaction chromatography of proteins, *Journal of Biotechnology*.
- Ramos-de-la-Peña, A.M., González-Valdez, J., Aguilar, O., 2019. Protein A chromatography: Challenges and progress in the purification of monoclonal antibodies. *J Sep Sci* 42, 1816–1827. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800963>
- Ray, A.K., 1999. Design, modelling and experimentation of a new large-scale photocatalytic reactor for water treatment, *Chemical Engineering Science*.
- Reboloso Fuentes, M.M., Acien Fernández, G.G., Sánchez Pérez, J.A., Guil Guerrero, J.L., 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chem* 70, 345–353.

Bibliografia

- Recktenwald, A., Lücke, M., Müller, H.W., 1993. Taylor vortex formation in axial through-flow: Linear and weakly nonlinear analysis. *Phys Rev E* 48, 4444–4458. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.48.4444>
- Resende, M.M., Sousa, R., Tardioli, P.W., Giordano, R.L.C., Giordano, R.C., 2005. Enzymatic tailor-made proteolysis of whey in a vortex flow reactor. *AIChE Journal* 51, 314–322. <https://doi.org/10.1002/aic.10241>
- Resende, M.M., Vieira, P.G., Sousa, R., Giordano, R.L.C., Giordano, R.C., 2004. Estimation of mass transfer parameters in a Taylor-Couette-Poiseuille heterogeneous reactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 21, 175–184. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322004000200006>
- Richardson, J.F., Zaki, W.N., 1954. Sedimentation and fluidisation: Part I. *Chemical Engineering Research and Design* 75, S82–S100. [https://doi.org/10.1016/s0263-8762\(97\)80006-8](https://doi.org/10.1016/s0263-8762(97)80006-8)
- Richter, O., Hoffmann, H., Kraushaar-Czarnetzki, B., 2008. Effect of the rotor shape on the mixing characteristics of a continuous flow Taylor-vortex reactor. *Chem Eng Sci* 63, 3504–3513. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2008.04.003>
- Rida, Z., Cazin, S., Lamadie, F., Dherbécourt, D., Charton, S., Climent, E., 2019. Experimental investigation of mixing efficiency in particle-laden Taylor–Couette flows. *Exp Fluids* 60. <https://doi.org/10.1007/s00348-019-2710-9>
- Rosa, S.A.S.L., dos Santos, R., Aires-Barros, M.R., Azevedo, A.M., 2016. Phenylboronic acid chromatography provides a rapid, reproducible and easy scalable multimodal process for the capture of monoclonal antibodies. *Sep Purif Technol* 160, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.002>
- Schmidt, P.M., Abdo, M., Butcher, R.E., Yap, M.Y., Scotney, P.D., Ramunno, M.L., Martin-Roussety, G., Owczarek, C., Hardy, M.P., Chen, C.G., Fabri, L.J., 2016. A robust robotic high-throughput antibody purification platform. *J Chromatogr A* 1455, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.076>
- Schrimpf, M., Esteban, J., Warmeling, H., Färber, T., Behr, A., Vorholt, A.J., 2021. Taylor-Couette reactor: Principles, design, and applications. *AIChE Journal* 67, 1–24. <https://doi.org/10.1002/aic.17228>

Bibliografia

- Szczechowski, J.G., Koval, C.A., Noble, R.D., 1995. A Taylor vortex reactor for heterogeneous photocatalysis. *Chem Eng Sci* 50, 3163–3173. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(95\)00176-6](https://doi.org/10.1016/0009-2509(95)00176-6)
- Sekar, S., Chandramohan, M., 2008. Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization. *J Appl Phycol* 20, 113–136. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9188-1>
- Sengupta, T.K., Kabir, M.F., Ray, A.K., 2001. A Taylor vortex photocatalytic reactor for water purification. *Ind Eng Chem Res* 40, 5268–5281. <https://doi.org/10.1021/ie001120i>
- Sieberz, J., Stanislawski, B., Wohlgemuth, K., Schembecker, G., 2014. Identification of parameter interactions influencing the precipitation of a monoclonal antibody with anionic polyelectrolytes. *Sep Purif Technol* 127, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.02.033>
- Silva, M.F.F., Fernandes-Platzgummer, A., Aires-Barros, M.R., Azevedo, A.M., 2014. Integrated purification of monoclonal antibodies directly from cell culture medium with aqueous two-phase systems. *Sep Purif Technol* 132, 330–335. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.05.041>
- Snyder, H.A., 1962. Experiments on the stability of spiral flow at low axial Reynolds numbers. *Proc R Soc Lond A Math Phys Sci* 265, 198–214. <https://doi.org/10.1098/rspa.1962.0004>
- Sohail, S., 2018. Biopharmaceuticals Market. URL <https://www.alliedmarketresearch.com/biopharmaceutical-market> (accessed 2.8.23).
- Soni, B., Kalavadia, B., Trivedi, U., Madamwar, D., 2006. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*-Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochemistry* 41, 2017–2023. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.018>
- Spalding, B.J., 1991. Downstream processing: key to slashing production costs 100 folds. *Nat Biotechnol* 9, 229–233. <https://doi.org/10.1038/nbt0391-229>

Bibliografia

- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101, 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Stengel, D.B., Connan, S., Popper, Z.A., 2011. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnol Adv* 29, 483–501. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.016>
- Subramanian, M., Kannan, A., 2010. Photocatalytic degradation of phenol in a rotating annular reactor. *Chem Eng Sci* 65, 2727–2740. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.01.004>
- Swanson, R. v., Glazer, A.N., 1990. Separation of phycobiliprotein subunits by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem* 188, 295–299. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90609-D](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90609-D)
- Swinnen, K., Krul, A., van Goidsenhoven, I., van Tichelt, N., Roosen, A., van Houdt, K., 2007. Performance comparison of protein A affinity resins for the purification of monoclonal antibodies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 848, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.04.050>
- Tang, Z., Zhao, J., Ju, B., Li, W., Wen, S., Pu, Y., Qin, S., 2016. One-step chromatographic procedure for purification of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Protein Expr Purif* 123, 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.01.018>
- Taylor, G.I., 1923. Stability of a viscous liquid contained between two rotating cylinders. *Philos Trans R Soc Lond* 223, 289–343. <https://doi.org/10.1098/rsta.1923.0008>
- Tcheruov', A.A., Minkova, K.M., Georgiev, D.I., Houbavenska, N.B., 1993. Method for B-phycoerythrin purification from *porphyridium cruentum*, BIOTECHNOLOGY.
- Teeters, M., Benner, T., Bezila, D., Shen, H., Velayudhan, A., Alred, P., 2009. Predictive chromatographic simulations for the optimization of recovery and aggregate clearance during the capture of monoclonal antibodies. *J Chromatogr A* 1216, 6134–6140. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.066>
- Thömmes, J., Bader, A., Halfar, M., Karau, A., Kula, M.R., 1996. Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth using a protein A coated adsorbent in expanded beds. *J Chromatogr A* 752, 111–122. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00504-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00504-3)

Bibliografía

- Thömmes, J., Weiher, M., Karau, A., Kula, M. -R, 1995. Hydrodynamics and performance in fluidized bed adsorption. *Biotechnol Bioeng* 48, 367–374. <https://doi.org/10.1002/bit.260480409>
- Tong, X.D., Sun, Y., 2002. Nd-Fe-B alloy-densified agarose gel for expanded bed adsorption of proteins. *J Chromatogr A* 943, 63–75. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01435-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01435-2)
- Tong, X.D., Xue, B., Sun, Y., 2003. Modeling of expanded-bed protein adsorption by taking into account the axial particle size distribution. *Biochem Eng J* 16, 265–272. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00058-5](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00058-5)
- Torres-Tiji, Y., Fields, F.J., Mayfield, S.P., 2020. Microalgae as a future food source. *Biotechnol Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107536>
- Tran, T.S., Park, S.J., Yoo, S.S., Lee, T.R., Kim, T.Y., 2016. High shear-induced exfoliation of graphite into high quality graphene by Taylor-Couette flow. *RSC Adv* 6, 12003–12008. <https://doi.org/10.1039/c5ra22273g>
- Usmani, S.S., Bedi, G., Samuel, J.S., Singh, S., Kalra, S., Kumar, P., Ahuja, A.A., Sharma, M., Gautam, A., Raghava, G.P.S., 2017. THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181748>
- van der Wiel, J.P., 1989. Continuous recovery of bioproducts by adsorption. *Academsch Boeken Centru* , Rotterdam.
- Vedantam, S., Joshi, J.B., 2006. Annular centrifugal contactors - A review. *Chemical Engineering Research and Design* 84, 522–542. <https://doi.org/10.1205/cherd.05219>
- Vega, M., Elviro, M., del Valle, E.M.M., Cerro, R., Galán, M.Á., 2017. Kinetic and Mass Transfer Model for Separation of Protein Using Ceramic Monoliths as a Stationary Phase. *Chem Eng Commun* 204, 750–760. <https://doi.org/10.1080/00986445.2017.1313243>
- Vlieghe, M., Coufort-Saudejaud, C., Frances, C., Liné, A., 2014. In situ characterization of floc morphology by image analysis in a turbulent Taylor-Couette reactor. *AIChE Journal* 60, 2389–2403. <https://doi.org/10.1002/aic.14431>

Bibliografia

- Wang, Z., Wang, G., Lu, H., Li, H., Tang, M., Tong, A., 2022. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Molecular Biomedicine* 3, 35. <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00100-4>
- Wei, X., Takahashi, H., Sato, S., Nomura, M., 2001. Continuous Emulsion Polymerization of Styrene in a Single Couette-Taylor Vortex Flow Reactor.
- Wereley, S.T., Lueptow, R.M., 1999. Velocity field for Taylor-Couette flow with an axial flow. *Physics of Fluids* 11, 3637–3649. <https://doi.org/10.1063/1.870228>
- Whintehom, J., 1923. Whitehorn, J. *Biol. Chem.* 56 (1923) 751. *J. Biol. Chem.*
- Wilbankss, S.M., Glazer4, A.N., 1993. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Rod Structure of a Phycoerythrin 11-containing Phycobilisome 11. COMPLETE SEQUENCE AND BILIN ATTACHMENT SITE OF A PHYCOERYTHRIN γ SUBUNIT*.
- Yu, W., Gregory, J., Campos, L.C., 2011. Breakage and re-growth of flocs: Effect of additional doses of coagulant species. *Water Res* 45, 6718–6724. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.016>
- Zafirakos, E., Lihme, A., 1999. EBA columns with a distribution system based on local stirring. *Bioseparation* 8, 85–91. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1519-5_8
- Zhang, J., Siva, S., Caple, R., Ghose, S., Gronke, R., 2017. Maximizing the functional lifetime of Protein A resins. *Biotechnol Prog* 33, 708–715. <https://doi.org/10.1002/btpr.2448>
- Zhu, X.H., Arifin, D.Y., Khoo, B.H., Hua, J., Wang, C.H., 2010. Study of cell seeding on porous poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) sponge and growth in a Couette-Taylor bioreactor. *Chem Eng Sci* 65, 2108–2117. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2009.12.006>