

R.12078

T-946

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA

**DESACTIVACIÓN ENZIMÁTICA Y PÉRDIDA DE ACTIVIDAD EN LOS
PROCESOS DE MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL A ALTA
VELOCIDAD: ESTUDIO DE LA RECUPERACIÓN DE
ESTREPTOQUINASA A PARTIR DE CALDOS DE FERMENTACIÓN**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

SECRETARÍA GENERAL

Sevilla, a los 35 días de este mes Doctoral
hasta 5 del libro

Sevilla,

22-11-96
El Jefe del Negociado de Tesis.

Alvaro Kappell

Tesis presentada por la Lda. Inmaculada
Hernández-Pinzón Toscano para optar al
grado de doctor en Biología.

Sevilla, Diciembre de 1996.

LOS 840901

D. ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICA: Que la tesis doctoral titulada *Desactivación enzimática y pérdida de actividad en los procesos de Microfiltración Tangencial a alta velocidad : Estudio de la recuperación de Estreptoquinasa a partir de caldos de fermentación*, presentada por la Lda. INMACULADA HERNÁNDEZ-PINZÓN TOSCANO para optar al grado de doctor en Biología, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Sevilla, Diciembre de 1996.



Fdo. Alberto Machado de la Quintana

D. JUAN BAUTISTA PALOMAS, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA, Y D. FRANCISCO MILLÁN RODRÍGUEZ, COLABORADOR CIENTÍFICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS VEGETALES DEL C.S.I.C.

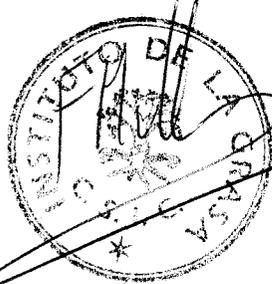
CERTIFICAN: Que la tesis doctoral titulada *Desactivación enzimática y pérdida de actividad en los procesos de Microfiltración Tangencial a alta velocidad : Estudio de la recuperación de Estreptoquinasa a partir de caldos de fermentación*, presentada por la Lda. INMACULADA HERNÁNDEZ-PINZÓN TOSCANO para optar al grado de doctor en Biología, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la Universidad de Sevilla, bajo nuestra dirección y reuniendo los requisitos exigidos, dando conformidad a su presentación.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Sevilla, Diciembre de 1996.



Juan Bautista Palomas

Fdo. Juan Bautista Palomas



Francisco Millán Rodríguez

Fdo. Francisco Millán Rodríguez

Introducción

1. Biotecnología de proteínas.	4
2. Procesos de membrana.	9
2.1 Microfiltración y ultrafiltración.	10
3. Implicaciones de las características de la solución sobre el proceso de microfiltración tangencial a alta velocidad.	13
3.1. Teoría de flujo.	15
3.2. Bloqueo de los poros.	17
4. Implicaciones de las características del proceso de microfiltración tangencial a alta velocidad sobre las proteínas.	21
4.1. Agregación de proteínas.	25
5. Estreptoquinasa.	28
Objetivos y Contenidos	30

Procedimiento Experimental

1. Materiales.	32
1.1. Microorganismo.	32
1.2. Cultivos y fermentaciones.	32
1.3. Métodos de análisis.	33
1.4. Precipitación de los caldos de fermentación.	34

1.5. Filtración tangencial a alta velocidad.	34
1.6. Caracterización de proteínas.	35
1.7. Pruebas físico-químicas.	36
2. Métodos.	38
2.1. Medio y condiciones de crecimiento.	38
2.2. Medio y condiciones de fermentación.	38
2.3. Métodos de análisis.	39
2.3.1. Determinación de proteínas.	39
2.3.2. Determinación de la actividad SK.	41
2.3.3. Densidad celular.	42
2.4. Precipitación del caldo de fermentación.	42
2.5. Filtración tangencial a alta velocidad.	43
2.6. Caracterización de proteínas.	43
2.6.1. Determinación aminoacídica.	43
2.6.2. Determinación de pesos moleculares por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida.	44
2.6.3. Determinación de tamaños moleculares por cromatografía de exclusión molecular.	45
2.6.4. Determinación de puntos isoelectricos.	46
2.7. Medida de la interacción/adsorción de proteínas a membrana.	47
2.8. Obtención de anticuerpos policlonales anti-SK.	48
2.9. Inmunoprecipitación de la actividad SK.	50
2.10. Pruebas físico-químicas.	50
2.10.1. Purificación de la proteína.	50
2.10.2. Calorimetría Diferencial de Barrido.	51
2.10.3. Dicroísmo Circular.	51
2.11. Tratamiento estadístico de los datos.	52

Resultados y Discusión

1. Crecimiento de *Streptococcus equisimilis* en discontinuo:

Producción de estreptoquinasa. 53

2. Recuperación de estreptoquinasa del caldo de fermentación. 58

2.1. Técnicas convencionales: centrifugación-precipitación. 59

2.2. Procesos de membrana: microfiltración-ultrafiltración. 61

3. Microfiltración tangencial a alta velocidad. 65

3.1. Permeabilidad de la membrana a lo largo del proceso de MFTAV. 65

3.2. Influencia de la interacción/adsorción de las proteínas con
la membrana de MF. 69

3.3. Evaluación del rendimiento del proceso de MFTAV. 76

3.4. Estudio de la concentración de proteínas por la membrana de MF. 81

3.4.1. Influencia del tamaño molecular de las proteínas. 83

3.4.2. Influencia de la carga neta de las proteínas. 84

3.5. Estudio de la pérdida de actividad SK. 87

3.6. Caracterización de los daños inducidos en las proteínas
durante el proceso de MFTAV. 90

3.6.1. Agregación de proteínas. 91

3.6.2. Análisis conformacional de la SK. 99

3.7. Evaluación de la influencia de aditivos sobre el proceso de MFTAV. 105

3.7.1. Tratamientos con urea. 106

3.7.2. Tratamientos con cloruro de sodio (NaCl). 112

Conclusiones. 118

Bibliografía. 121

Introducción

Una variedad amplia, en continuo crecimiento, de proteínas están encontrando aplicaciones en los sectores industriales y sanitarios; caben destacar enzimas, anticuerpos, hormonas, y factores sanguíneos, reguladores y de crecimiento (tabla 1). Tales proteínas son obtenidas a partir de diferentes fuentes biológicas incluyendo microorganismos, plantas y animales.

La elección de la fuente de proteína tradicionalmente ha representado uno de los pasos determinantes en la planificación del proceso de producción, cuando la proteína de interés puede ser obtenida a partir de una diversidad de fuentes; paso mucho más limitado cuando la proteína sólo está presente en una o muy pocas fuentes potenciales. Algunas proteínas producidas en plantas pueden ser inactivadas de manera irreversible por las sustancias precipitantes y desnaturizantes de desecho acumuladas en las vacuolas (Swain, 1991). Una desventaja de la utilización en terapéutica de proteínas obtenidas desde fuentes animales es la presencia de patógenos que puedan inducir enfermedades adicionales en los pacientes tratados. Los microorganismos en cambio, representan una fuente muy atractiva de proteínas, sobre todo de enzimas, permitiendo la obtención de productos frecuentemente más estables y más seguros que sus análogos producidos en plantas o animales. Un número limitado de microorganismos clasificados como microorganismos GRAS (*generally recognized as safe*), los cuales se caracterizan por ser no patógenos y no tóxicos, constituyen una garantía a este respecto.

Tabla 1. Algunas proteínas actualmente disponibles para aplicaciones industriales y sanitarias.

<i>Proteína</i>	<i>Aplicación</i>
<i>Proteasas</i>	<i>Industria del queso Preparados de detergentes</i>
<i>Amilasas</i>	<i>Industria del almidón Fermentaciones</i>
<i>Lipasas</i>	<i>Industria de la leche y grasas vegetales</i>
<i>Pectinasas</i>	<i>Procesado de frutas</i>
<i>Insulina</i>	<i>Tratamiento de la diabetes</i>
<i>Factor de necrosis tumoral</i>	<i>Tratamiento del cáncer</i>
<i>Vacunas</i>	<i>Frente a hepatitis B, malaria y herpes</i>
<i>Hormona del crecimiento</i>	<i>Tratamiento del cáncer, SIDA y deficiencias de crecimiento</i>
<i>Interferones (α, β y γ)</i>	<i>Tratamiento del cáncer, SIDA, artritis y enfermedades infecciosas</i>
<i>Anticuerpos monoclonales</i>	<i>Tratamiento del cáncer y la artritis reumatoide Aplicaciones de diagnóstico in vivo e in vitro</i>
<i>Activador tisular del plasminógeno</i>	<i>Afecciones de corazón Tratamiento de infartos y trombosis</i>

El empleo de microorganismos supone además otras ventajas respecto a las otras fuentes de proteínas, especialmente en cuanto a que pueden ser cultivados en grandes cantidades en tiempos cortos por métodos establecidos de fermentación, y a que pueden ser sujetos de manipulaciones genéticas con más facilidad que las plantas y animales. En relación a la tecnología de cultivos celulares, las células microbianas también resultan más atractivas que las células de organismos superiores dado que sus requerimientos nutricionales son bastante menos complejos (Datar *et al.*, 1993), lo cual se traduce en una ventaja económica a la hora de balancear el proceso de producción. Finalmente, los avances recientes en el área de la tecnología del ADN recombinante han potenciado a

ciertos microorganismos, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* entre otros, como sistemas de expresión apropiados de proteínas usualmente obtenidas desde otras fuentes biológicas (Cullen *y col.*, 1987; La Vallie *y col.*, 1993).

Por todo ello, profundizar en los procesos biotecnológicos que siguen a la producción microbiana por métodos de fermentación, *downstream processing*, parece de extraordinario interés con miras a mejorar los sistemas de recuperación de productos y la calidad de los mismos. En este contexto, los estudios sobre la utilización de membranas se han centrado fundamentalmente en la relación entre los parámetros de operación y las características hidrodinámicas de las soluciones procesadas (DaCosta *y col.*, 1993; Parnham y Davis, 1995); sin embargo, han aportado escasa información acerca de las alteraciones que pueden sufrir las proteínas durante los procesos.

Dada nuestra experiencia previa en la producción de estreptoquinasa (SK) por *Streptococcus equisimilis* (Parrado *y col.*, 1993), enzima de interés farmacológico importante debido a su utilización como agente fibrinolítico, hemos llevado a cabo un estudio detallado del proceso de microfiltración tangencial a alta velocidad (MFTAV) como primera operación unitaria para la recuperación del producto, abordando los mecanismos moleculares que están afectando a las proteínas y las posibles consecuencias funcionales sobre la SK.

1. Biotecnología de proteínas.

La mayoría de las proteínas actualmente disponibles, tanto para aplicaciones médico-farmacéuticas como para aplicaciones industriales, son producidas por fermentación de células microbianas (LaVallie *y col.*, 1993) o por cultivos de células animales (Hu y Peshwa, 1993).

Se distinguen dos tipos de células, unas que retienen sus productos intracelularmente y otras que los excretan al medio de cultivo. Generalmente, si la proteína es intracelular su posterior purificación requiere de procedimientos exhaustivos, dado que la rotura inicial de las células origina una mezcla muy compleja de moléculas a partir de la cual la proteína de interés debe ser aislada. La producción exocelular de una proteína, por el contrario, resulta menos tediosa en términos de los subsiguientes procedimientos biotecnológicos que se requieren para su recuperación, aunque los compuestos pertenecientes al medio de cultivo puedan complicar el proceso final de purificación. En ambos casos, las células enteras o los desechos celulares deben ser removidos del medio como primera operación unitaria del proceso, seguido de la concentración del volumen resultante (sobre todo en el caso de proteínas exocelulares) como segunda operación unitaria, antes de la purificación del producto (Wiseman, 1987; Walsh y Headon, 1994).

A continuación se detallan algunos aspectos de los métodos más usuales en las dos operaciones unitarias mencionadas anteriormente.

i. Métodos de separación de células.

Centrifugación (Rosen, 1984). Se trata de una metodología que utiliza la fuerza gravitatoria para aumentar la velocidad de sedimentación de las células. La mayoría de las células microbianas son sedimentadas aplicando una fuerza centrífuga de aproximadamente

5.000 g durante 15 minutos o menos, mientras que la separación eficiente de los fragmentos celulares requiere la aplicación de fuerzas centrífugas más elevadas durante periodos de tiempo mayores, típicamente 10.000 g durante 45 minutos. Esta técnica disfruta de ciertas ventajas tales como tiempos de residencia cortos, importante a la hora de trabajar con actividades enzimáticas, y posibilidad de procesar productos en condiciones estériles. Sin embargo, también se pueden mencionar algunas desventajas relacionadas con los grandes equipos (supercentrífugas) requeridos a niveles industriales para procesar volúmenes grandes (10.000-50.000 litros), que suponen inversiones considerables de capital a la vez que, debido a las elevadas velocidades de operación (16.000-20.000 g), generan un estrés mecánico fuerte sobre las células, causando la rotura de las mismas con la consiguiente liberación de elementos contaminantes al medio.

Floculación/sedimentación (Bautista *y col.*, 1986; Aunins y Wang, 1989). La adición de polielectrolitos (floculantes) a los caldos de fermentación puede neutralizar las células, por lo general cargadas negativamente, las cuales se aglomeran formando interacciones que facilitan la sedimentación. La floculación es una técnica lenta que requiere de al menos un procedimiento adicional, tal como la centrifugación, para llegar a su término, ya que los cuerpos celulares tras la sedimentación quedan empaquetados como máximo en un volumen entre el 20 y el 30% del volumen original, desventaja ésta tanto para el diseño del proceso como desde el punto de vista económico.

Extracción líquido-líquido (Kula *y col.*, 1982). Los caldos de fermentación pueden ser fraccionados en dos fases líquidas formadas por la adición de dos polímeros diferentes o de una mezcla de un polímero y una sal. La ventaja potencial de esta técnica radica en que permite la purificación primaria de las proteínas conjuntamente a la separación de las células; por el contrario, la desventaja mayor que posee es el costo elevado de los polímeros utilizados (polietilenglicol, dextrano, etc.), aunque en algunos casos puedan ser reutilizados.

Microfiltración (MF). Es considerada una de las técnicas más efectivas para recuperar proteínas desde células enteras u homogenados celulares obteniéndose separaciones esencialmente de 100% (Bowen, 1993). Esta técnica se basa en la capacidad selectiva de algunas membranas sintéticas semipermeables para retener la biomasa a la vez que permiten que las proteínas pasen a través de sus poros. La MF puede operar de diversas formas dependiendo de la configuración del sistema: MF convencional (Iritani *y col.* 1995), en la cual la mezcla a separar circula perpendicularmente a la superficie de la membrana; MF tangencial (Parnham y Davis, 1995), cuyo diseño requiere que la solución pase paralelamente a la superficie de la membrana, y MF a través de membranas cilíndricas (Lee *y col.*, 1995), en las cuales la solución entra en el espacio central que deja el material filtrante.

Las consideraciones acerca de las ventajas e inconvenientes de la MF como proceso de membrana serán revisadas en sucesivos apartados de esta Introducción.

ii. Métodos de concentración de volumen.

Precipitación. La precipitación de proteínas puede ser promovida por sales neutras como el sulfato amónico o el cloruro sódico (Shih *y col.*, 1992), por solventes orgánicos como el etanol (Hao *y col.*, 1980), por algunos polímeros como es el caso del polietilenglicol (PEG) (Atha e Ingham, 1981), o ajustando el pH de la solución apropiadamente. La adición de pequeñas cantidades de sales neutras por lo general aumenta la solubilidad de las soluciones de proteínas (efecto *salting in*); sin embargo, las concentraciones de sales más elevadas conducen a la desestabilización de las proteínas en solución, lo cual puede promover la precipitación (efecto *salting out*) (Kristjansson y Kinsella, 1997). En este último caso, la sal compite con las moléculas de proteínas por el agua de hidratación promoviéndose, de esta forma, las interacciones entre las regiones hidrofóbicas de la superficie de moléculas de proteína adyacentes cuyo resultado puede ser la precipitación de las mismas. Los solventes orgánicos bajan el potencial dieléctrico de

las soluciones acuosas; adicionados a las soluciones de proteínas aumentan la atracción electrostática entre grupos de carga opuesta de la superficie de las moléculas de proteína, promoviendo la precipitación. Algunos polímeros, por ejemplo el PEG, pueden inducir la precipitación de proteínas por un mecanismo de exclusión estérica (Miekkka e Ingham, 1978); las moléculas de proteínas, expulsadas de los lugares de la solución que han sido ocupados por las moléculas del polímero, se aglomeran hasta exceder el nivel de solubilidad y, en consecuencia, precipitan.

La validez de los métodos de precipitación está influenciada por una serie de desventajas asociadas. Por un lado, pueden inducir la desnaturalización de las proteínas y como consecuencia la inactivación de las enzimas. Por otro lado, aumentan considerablemente la viscosidad de las soluciones resultantes, lo cual dificulta la recuperación del precipitado normalmente llevada a cabo por centrifugación.

Ultrafiltración (UF). Se trata, al igual que ocurre con la MF, de un proceso de membrana que ejerce un mecanismo sencillo de tamizado sobre las moléculas de proteína presentes en la solución a concentrar en base al tamaño (Sanchez y Gekas, 1992). Las moléculas de tamaño más pequeño que los poros de la membrana, aquí se incluyen las sales, el agua y los componentes de bajo peso molecular, pasan a través de la membrana, mientras que las especies moleculares de mayor tamaño que los poros de la membrana son retenidas. Como consecuencia de la eliminación de agua, las moléculas retenidas quedan convenientemente concentradas. La UF puede operar en las modalidades convencional (Da Costa y col., 1993) y tangencial (Dumon y Barnier, 1992), o con diseños especiales de membranas, como es el caso de los sistemas de fibra hueca (Klein y col., 1994) que proporcionan una relación superficie/volumen de filtración elevada (Cheryan, 1986c).

Otros aspectos relacionados con la UF como proceso de membrana serán tratados posteriormente junto a la MF.

El esquema a seguir para la obtención biotecnológica de una proteína, suponiendo una enzima, podría ser el representado en la figura 1 (tomado de Protein Biotechnology. Walsh, G. y Headon, D., eds. John Wiley & Sons, England, 1994). A medida que aumenta el número de etapas en el procedimiento, aumenta la pureza del producto, pero paralelamente disminuye la eficiencia coincidiendo, por regla general, las pérdidas mayores con las primeras etapas relativas a la eliminación de cuerpos celulares y a la reducción de volumen (Wang, 1983). El número y la complejidad de los pasos finales de purificación dependen del destino del

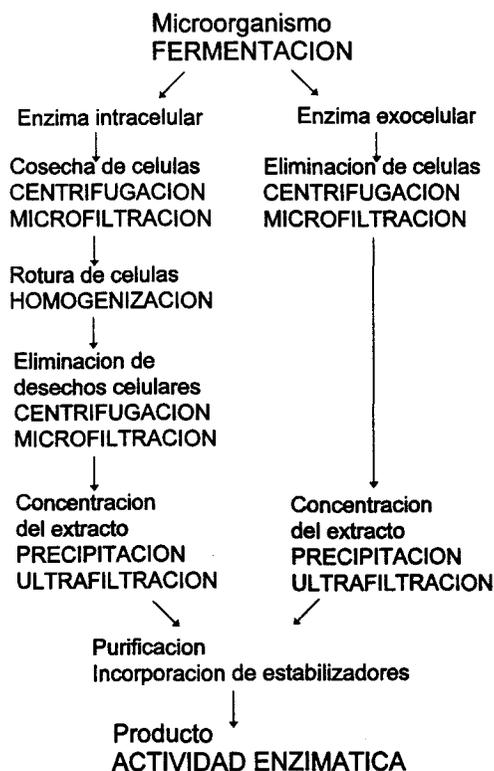


Figura 1. Obtención de enzimas microbianas destinadas a aplicaciones industriales y sanitarias.

producto. Las enzimas utilizadas en aplicaciones de diagnóstico o terapéutica requieren grados de purificación muy elevados, en orden a minimizar o eliminar las reacciones clínicas adversas frente a las trazas de contaminantes presentes en el preparado proteico. Por el contrario, las enzimas de uso industrial normalmente aparecen en el mercado como preparados crudos que, a lo sumo, han superado algún paso grosero de purificación. La adición de estabilizadores y de sustancias preservativas de la degradación de proteínas por mecanismos de agregación, deaminación u oxidación, para aumentar la vida media del producto, resulta conveniente en todos los casos (Cleland y col., 1993).

2. Procesos de membrana.

Los métodos tradicionales de centrifugación y precipitación utilizados para recuperar proteínas desde componentes celulares, tras procesos de fermentación, representan una desventaja económica que, sumada a los riesgos de desnaturalización que sufren las proteínas, puede cuestionar la viabilidad de tales procesos.

Durante los últimos años, se han desarrollado alternativas biotecnológicas nuevas que intentan mejorar o solucionar los problemas relacionados con la recuperación de proteínas. Entre estas alternativas se encuentran los procesos de membrana, en los cuales un medio filtrante (membrana) actúa de barrera física en la trayectoria de una solución o dispersión modificando selectivamente su velocidad de transporte (Cheryan, 1986a).

Según el factor discriminante, los principales procesos de membrana se han clasificado en: ósmosis reversa y pervaporación, capaces de separar especies moleculares de tamaño comparable, debido a la diferencia de afinidad y de capacidad de difusión de los componentes a través de la membrana; electrodiálisis y electrofiltración, en los cuales la aplicación de un campo eléctrico sirve para separar moléculas de diferente carga a través de la membrana, y microfiltración (MF) y ultrafiltración (UF), que involucran mecanismos de separación en base al tamaño, siendo las dimensiones de las moléculas en relación al tamaño de los poros de la membrana el factor que determina el transporte de las especies moleculares a través de la misma. Estos últimos son los más utilizados actualmente como procesos biotecnológicos para recuperar productos en la industria alimentaria (Kaiser y Glatz, 1988; Cuperus y Nijhuis, 1993) y en la industria químico-farmacéutica (Forman y col., 1990; Bohdziewicz y col., 1994), así como para el tratamiento de aguas (Cheryan, 1986d). También es interesante mencionar los avances recientes en el diseño de bioreactores de membrana, los cuales permiten, al mismo tiempo, retener el biocatalizador en el medio de reacción y separar los productos que se van formando a través de un módulo de membrana, generalmente de UF (Mehaia y Cheryan, 1990).

2.1. Microfiltración y ultrafiltración.

la fuerza responsable de la separación a nivel molecular en los procesos de MF y UF es el gradiente de presión a través de la membrana conocido como presión transmembrana¹; paralelamente, los factores que están determinando la separación a nivel de membrana son el tamaño y la estructura interna de los poros (Belfort, 1987). En principio, las moléculas de tamaño molecular mayor que los poros de la membrana se retienen, mientras que las moléculas más pequeñas pasan a través de los poros de la membrana. Como consecuencia se obtienen dos efluentes: uno que contiene las especies retenidas, denominado **retenido** o concentrado, y otro que atraviesa la membrana y que se denomina **permeado** o filtrado.

El rango de tamaño molecular típico de la MF se sitúa entre 0,1 y 10 μm donde se incluyen células microbianas (Shimizu y col., 1993), coloides (Persson y col., 1993b) y partículas de latex (Shimizu y col., 1993). En el caso de la UF, el rango de tamaño molecular se encuentra entre 0,5 nm y 0,1 μm y constituye una alternativa para separar macromoléculas, por ejemplo proteínas (Da Costa y col., 1993), y compuestos de bajo peso molecular, por ejemplo azúcares (Sims y Cheryan, 1992).

Actualmente, las membranas más utilizadas en los procesos de MF y UF están construidas de polímeros sintéticos (poliamida, polisulfona, policarbonato, etc.) con miras a mejorar la resistencia mecánica y la estabilidad frente al ataque microbiano (Drioli, 1993). Las membranas de MF se caracterizan por poseer una porosidad (medida relativa de la superficie total de filtración) muy alta, del orden de 80%, y una estructura de poro simétrica. Por esta última razón, normalmente son especificadas en términos del diámetro de poro característico (0,2-0,8 μm). Las membranas de UF en cambio, tienen una porosidad bastante más baja y una estructura de poro totalmente asimétrica, siendo especificadas por su corte nominal (1-500 kilodaltones, kDa). El valor de corte nominal indica que el 95% de las moléculas de dicho tamaño molecular pueden ser retenidas por la membrana (Cheryan, 1986b).

¹ $Presión\ transmembrana = [(Presión_{entrada} + Presión_{salida})/2] - Presión_{permeado}.$

Desde el punto de vista operativo, los procesos de MF y UF pueden proceder en dos modalidades distintas de configuración: convencional y tangencial. En la primera, la solución es bombeada en la misma dirección, perpendicular a la membrana, que el gradiente de presión. A medida que transcurre la filtración, las moléculas retenidas se van acumulando sobre la superficie de la membrana dando lugar a un depósito creciente que ofrece una resistencia progresivamente mayor al transporte (figura 2A). Como consecuencia, el flujo del permeado² disminuye rápidamente en el proceso de separación (Iritani y col., 1995).

En la modalidad tangencial, conocida también con la especificación de "alta velocidad", la solución es bombeada tangencialmente a la superficie de la membrana formando un ángulo recto con el gradiente de presión. A diferencia de lo que ocurre en la modalidad convencional, el paso de la solución arrastra las moléculas acumuladas permitiendo que el crecimiento del depósito sobre la superficie de la membrana no sea continuo (figura 2B). De esta forma, el proceso de separación puede mantenerse durante periodos de tiempo más prolongados (Shimizu y col., 1994).

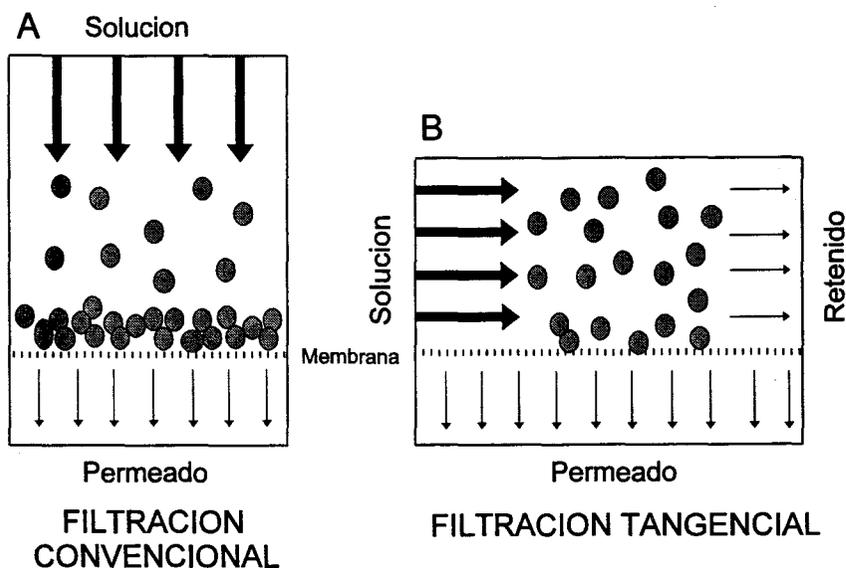


Figura 2. Fundamentos operativos de las modalidades de filtración.

²Flujo del permeado = volumen de permeado por unidad de tiempo y superficie de membrana.

Durante la década de los 70, Henry y Allred fueron los primeros en introducir las técnicas de filtración tangencial para recuperar y concentrar suspensiones de proteínas bacterianas. Desde entonces, los procesos de MF y UF en dicha modalidad han sido progresivamente más utilizados para cosechar células bacterianas (Nagata *y col.*, 1989; Shimizu *y col.*, 1993), levaduras (Matsumoto *y col.*, 1987; Redkar y Davis, 1993), y desechos celulares y enzimas (Kroner *y col.*, 1984; Parnham y Davis, 1995). Algunas de las ventajas asociadas a estas técnicas son:

- (a) los procesos de separación son directos sin involucrar ni cambios de fase, ni el uso imprescindible de aditivos,
- (b) el consumo de energía es muy moderado,
- (c) los daños térmicos sobre los productos son mínimos y
- (d) la relación de perpendicularidad existente entre el paso de la solución y el flujo del permeado permite mejorar la permeabilidad y el nivel de separación en los procesos.

3. Implicaciones de las características de la solución sobre el proceso de microfiltración tangencial a alta velocidad.

De las consideraciones previas, se establece que la microfiltración tangencial a alta velocidad (MFTAV), como la denominaremos a partir de este punto de la Introducción con el objeto de evitar confusiones posteriores a lo largo de la presentación de los resultados, es una operación unitaria la cual puede ser utilizada para cosechar células, clarificar caldos de fermentación o separar productos intracelulares desde fragmentos celulares. Durante el proceso, la solución es presurizada tangencialmente a la superficie de la membrana de microfiltración (MF), el retenido recircula continuamente en el sistema y la separación, en base al tamaño de las moléculas, tiene lugar con un gradiente de presión impuesto a través de la membrana. No obstante, aunque representa una opción muy atractiva como proceso biotecnológico para recuperar proteínas, se conocen algunas limitaciones asociadas a esta técnica (Hernández-Pinzón, 1992; Parnham y Davis, 1995).

Movidas por la trayectoria del permeado, las moléculas presentes en la solución convergen hacia la superficie de la membrana formando una película de materiales depositados. Al mismo tiempo, en la interfase membrana-solución, los mecanismos de difusión de moléculas y la trayectoria tangencial que sigue la solución arrastran las moléculas fuera del depósito. El balance entre las fuerzas de convección y las fuerzas de difusión que están actuando sobre las moléculas permite que el depósito de materiales sobre la superficie de la membrana alcance un espesor estable. Este fenómeno es reversible (Boyaval *y col.*, 1996) y se conoce como "**polarización de la concentración**" (Bowen, 1993).

Otros sucesos que pueden ocurrir durante el proceso de MFTAV involucran mecanismos de integración con la membrana, tal es el caso de la adsorción de moléculas o el bloqueo de los poros. Todos ellos forman parte del fenómeno denominado "**ensuciamiento**" de la membrana (Bowen, 1993), cuyos efectos son generalmente

irreversibles (Boyaval *y col.*, 1996).

La "polarización de la concentración" y el "ensuciamiento" de la membrana pueden alterar, en mayor o menor grado a lo largo del proceso de MFTAV, las propiedades de permeabilidad y de selectividad características de la membrana de MF (Forman *y col.*, 1990; Parnham y Davis 1995). Tales fenómenos, además de depender de parámetros de operación tales como la presión transmembrana y la velocidad de recirculación³, están influenciados por las características de la solución, en relación a la concentración y naturaleza de los solutos, y a la viscosidad; y por propiedades de la membrana, como el tamaño de poro, la carga de superficie y la resistencia hidráulica intrínseca (Shimizu *y col.*, 1990).

En la bibliografía se pueden encontrar diversos trabajos que muestran los efectos de la presión transmembrana y la velocidad de recirculación sobre el flujo del permeado y el coeficiente de transmisión de proteínas⁴ durante la MFTAV de soluciones de proteínas. Utilizando lisados bacterianos y membranas de 0,45 μm de tamaño de poro, Le y colaboradores (1984) observaron que, para concentraciones altas de sólidos, la relación entre el flujo del permeado y la presión transmembrana varía desde una región donde son totalmente independientes hasta una región donde están linealmente relacionados; para concentraciones bajas de sólidos y una presión transmembrana inespecífica, el flujo del permeado es proporcional a la velocidad de recirculación. Sin embargo, los resultados de Parnham y Davis (1995), también en lisados bacterianos y membranas de 0,2 μm de tamaño de poro, muestran que el flujo del permeado es prácticamente independiente de la presión transmembrana, disminuye al aumentar la concentración de sólidos en la solución y aumenta al aumentar la velocidad de recirculación. Estos mismos autores observaron que el coeficiente de transmisión de las proteínas es independiente de la presión transmembrana y de la velocidad de recirculación, mientras que desciende al aumentar la concentración de sólidos en la solución.

³Velocidad de recirculación = velocidad tangencial de la solución.

⁴Coficiente de transmisión de proteínas = $\text{Conc. permeado} / \text{Conc. solución}$

La discrepancia en los resultados bibliográficos demuestra la complejidad de las relaciones entre los parámetros hidrodinámicos y los mecanismos fenomenológicos observados, las cuales están condicionando la operatividad del proceso de MFTAV. Consideraciones al respecto aparecen a lo largo de los subapartados siguientes.

3.1. Teoría de flujo.

La predicción del flujo del permeado en procesos de membrana ha sido muy estudiada para intentar describir cómo el depósito de materiales sobre la superficie de la membrana puede controlar la hidrodinámica del sistema (Green y Belfort, 1980; Wijimans y col., 1984; Davis y Leighton, 1987). En todos los casos, se han desarrollado modelos matemáticos que relacionan los parámetros de operación con las características de la solución y las propiedades de la membrana, si bien difieren con respecto al mecanismo de difusión de partículas (migración lateral, inducida por presión osmótica o por fuerzas de cizalla, etc.). Una revisión de estos modelos se encuentra en Davis (1992).

De un modo simplificado, el flujo del permeado (J) en soluciones de partículas coloidales puede ser expresado según la ley de Darcy (Boyaval y col., 1996):

$$J = \Delta P / \eta \times [1 / (R_m + R_p + R_c)]$$

donde ΔP y η son la presión transmembrana y la velocidad de recirculación respectivamente, R_m es la resistencia hidráulica intrínseca de la membrana, R_p es la resistencia atribuida a la adsorción de partículas y al bloqueo de los poros (fenómeno de "ensuciamiento" de la membrana) y R_c es la resistencia debida al depósito formado sobre la superficie de la membrana (fenómeno de "polarización de la concentración").

En MFTAV, la formación del depósito sobre la membrana, y por tanto el valor de R_c , está restringida por el mecanismo de difusión de partículas hacia la solución, el cual

depende de la velocidad de recirculación, de la concentración y tamaño de las partículas, y de la viscosidad de la solución (Shimizu y col., 1993). Por otra parte, las propiedades de la membrana respecto al tamaño de poro y a la carga de superficie determinan el valor de R_p , durante el periodo inicial de la filtración.

La relación entre los distintos parámetros puede ser explicada en términos del balance entre la velocidad con que las partículas son barridas fuera del depósito (V_b) y el flujo del permeado (J) que transporta las proteínas hacia la membrana (figura 3).

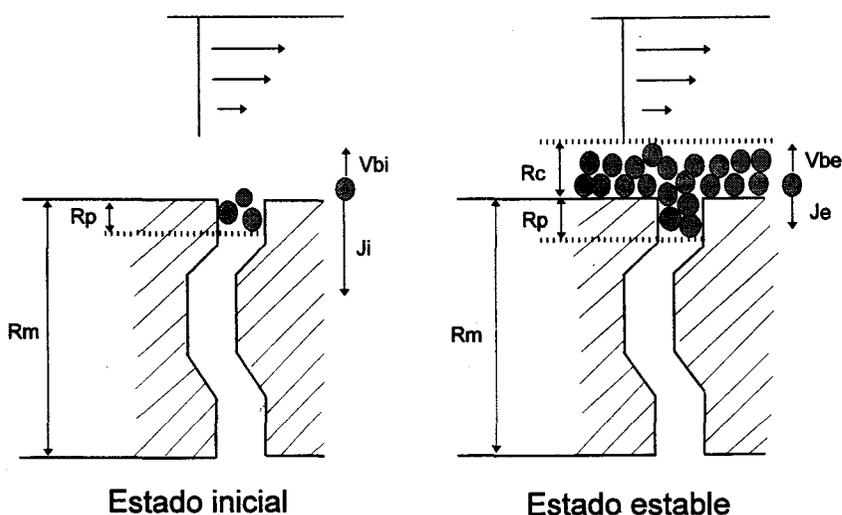


Figura 3. Esquema modelo del balance de fuerzas actuando sobre las partículas durante el proceso de MFTAV.

En el estado inicial de la filtración, V_{bi} depende de los parámetros de operación y de las características de la solución, mientras que J_i (flujo del permeado después del descenso rápido inicial) está determinado solamente por las propiedades de la membrana:

$$J_i = \Delta P / \eta \times [1/R_m + R_p]$$

A medida que transcurre el proceso de filtración y se desarrolla el depósito sobre la membrana, J va disminuyendo como consecuencia del bloqueo interno y superficial de la membrana, al mismo tiempo que V_b aumenta debido al incremento de la viscosidad de la solución en las inmediaciones de la membrana. Un estado estable, en muchos casos pseudoestable, se alcanza cuando ambos parámetros, el flujo del permeado (expresado como velocidad de filtración) y la velocidad de barrido de las partículas, tienden a igualarse:

$$J_{ss} = V_{bss} = \Delta P / \eta \times [1 / (R_m + R_p + R_c)]$$

Los caldos de fermentación, en contraste con las suspensiones coloidales que son homogéneas, contienen partículas de tamaños muy diversos, desde células hasta moléculas de bajo peso molecular pertenecientes al medio de cultivo. Cuando una solución de esta naturaleza es procesada por MFTAV, la velocidad de transporte de las partículas hacia la superficie de la membrana es uniforme e igual al valor del flujo, mientras que la velocidad de barrido depende del tamaño de la partículas (Shimizu *y col.*, 1993). Las partículas más pequeñas presentan los valores más bajos de velocidad de barrido y se depositan selectivamente en la proximidad del periodo estable. En estos casos, el valor del flujo del permeado en el estado estable coincide con el valor contemporáneo más bajo de velocidad de barrido en la mezcla de partículas. (Shimizu *y col.*, 1994).

3.2. Bloqueo de los poros.

Algunos autores (Romero y Davis, 1988; Opong y Zydney, 1991) han explicado el descenso que experimenta el flujo del permeado en procesos de MF de soluciones de proteínas en términos exclusivos de la acumulación de materiales en la superficie de la membrana, es decir, en base al fenómeno de "polarización de la concentración". Sin embargo, esta posibilidad no es muy viable considerando que, en MF, el tamaño de las proteínas es mucho más pequeño que el tamaño de los poros de la membrana y, debido al transporte, resulta difícil que se acumulen masivamente en la superficie de la membrana.

Se conocen además estudios que demuestran cómo la pérdida de permeabilidad de las soluciones de proteínas a través de membranas de MF, sigue siendo evidente en ausencia de depósitos sobre la membrana (Franken y *col.*, 1990; Bowen y Gan, 1991).

La otra posibilidad que ha sido utilizada para explicar el comportamiento del flujo del permeado en procesos de MF de soluciones de proteínas, responde a mecanismos mecánicos relacionados con el bloqueo de los poros de la membrana (Hlavacek y Bouchet, 1993) y que forman parte del fenómeno de "ensuciamiento" de la membrana.

El planteamiento de la teoría del bloqueo de los poros fue introducido originalmente por Hermans y Bredée (1935). Estos autores consideraron dos casos extremos que podían ocurrir en los procesos de filtración convencional de suspensiones de partículas: (a) cada partícula bloquea completamente un poro en la superficie de la membrana (bloqueo completo) y, (b) partículas pequeñas forman un depósito sobre las paredes internas de los poros causando la restricción progresiva del volumen libre del poro (bloqueo estándar). El bloqueo intermedio fue planteado como un compromiso entre las dos posibilidades anteriores.

Durante muchos años no se prestó atención a estos planteamientos hasta que, en 1982, Hermia derivó expresiones matemáticas para cada uno de los modelos de bloqueo de poros, en función del tamaño de los poros de la membrana y el tamaño de las partículas presentes en la suspensión. Desde entonces, las leyes de bloqueo han sido consideradas en la interpretación de los fenómenos implicados en los procesos de membrana; Tanny y colaboradores (1982) y Mietton-Peuchot (1984), entre otros autores, las aplicaron en procesos de MFTAV. Más recientemente, se han llevado a cabo análisis cuantitativos en MF de soluciones de proteínas basados en las leyes de bloqueo (Bowen y Gan, 1992; Hlavacek y Bouchet, 1993; Bowen y Hall, 1995).

A continuación se describe la ley de **bloqueo estándar de filtración**, modelo que ha sido utilizado como aproximación de nuestros datos experimentales.

Este modelo asume dos consideraciones. La primera de ellas es que la membrana experimenta una reducción del volumen libre de poro proporcional al volumen de solución que ha atravesado la membrana, debido a la deposición de partículas sobre las paredes de los poros. La segunda consideración es que la membrana consiste en un conjunto de poros de diámetro y longitud uniformes, lo cual es factible para algunas membranas pero para otras es cuestionable.

En base a las asunciones anteriores, el descenso del volumen de los poros coincidirá con el descenso en la sección transversal de éstos. Un balance de masa para las partículas dispersas puede venir dado por (Bowen y Gan, 1991):

$$N \times (-2\pi r dr) \times L = CdV \quad (1.1)$$

donde N es el número de poros, L es la longitud de los poro y C es el volumen de partículas depositadas por unidad de volumen de permeado. Integrando la ecuacion (1.1) se tiene:

$$N \times \pi (r_0^2 - r^2) \times L = C \times V \quad (1.2)$$

donde r_0 es el radio inicial de los poro y r es el radio de los poro después de que un volumen V de solución haya atravesada la membrana.

La ecuación de Poiseuille puede ser usada para describir la velocidad de filtración (flujo del permeado) inicial :

$$Q_0 = N \times (\pi r_0^4 |\Delta P| / 8\eta L) \quad (1.3)$$

donde $|\Delta P|$ es la magnitud de la caída de presión a través de la membrana (presión transmembrana) y η es la viscosidad de la solución. Derivando la ecuación (1.3) se obtiene:

$$Q = Q_0 \times [1 - (K_s V/2)]^2 \quad (1.4)$$

donde Q es la velocidad de filtración para un volumen V de permeado y K_s viene definido como:

$$2C/\pi \text{LN}r_0^2 = 2C/LA_0 \quad (1.5)$$

siendo A_0 la sección transversal de poro inicial.

Integrando la ecuación (1.4) y reagrupando se llega a la expresión:

$$1/V = 1/Q_0 T + K_s/2 \quad (1.6)$$

donde el volumen de permeado aparece como una función del tiempo de filtración [$V = f(T)$].

La ecuación (1.6) caracteriza al modelo de bloqueo estándar de filtración y predice una relación lineal entre $1/V$ y $1/T$ a partir de la cual se puede obtener el valor de K_s y, por tanto, de C , parámetro que determina el volumen de partículas depositadas en los poros para un momento dado del proceso de filtración.

4. Implicaciones de las características del proceso de microfiltración tangencial a alta velocidad sobre las proteínas.

El transporte de las proteínas a través de la membrana es el primer requerimiento que caracteriza a los procesos de microfiltración (MF) a partir de soluciones que contienen proteínas. En estos casos, las interacciones de las proteínas con la estructura interna de los poros de la membrana, junto a las interacciones de superficie, pueden influir sustancialmente en la efectividad del proceso de separación.

A medida que transcurre el proceso de MF se van generando unas condiciones que pueden resultar desfavorables para las proteínas. La posibilidad de diferentes tipos de daños sobre las proteínas ha sido considerada en las investigaciones efectuadas para elucidar los mecanismos responsables de las pérdidas de permeabilidad y de actividad enzimática observadas en las soluciones de proteínas durante procesos de MF (Bowen y Gan, 1991, 1992; Hlavacek y Bouchet, 1993).

La desnaturalización de las proteínas en microfiltración tangencial a alta velocidad (MFTAV) puede ser inducida por varios factores: temperatura de operación, estrés mecánico e interacciones proteína-membrana.

i. Temperatura.

La turbidez de las soluciones se incrementa con la temperatura de operación en los procesos de membrana debido a la desnaturalización de las proteínas (Meireles y col., 1991). Dentro de un margen estrecho de temperatura (0-35°C), conforme aumenta este parámetro, las proteínas se vuelven más flexibles favoreciéndose las colisiones entre moléculas (Creighton, 1985). El resultado es la aparición de asociaciones formadas por

proteínas aún en estado nativo, las cuales pueden ir derivando de forma gradual en proteínas desnaturalizadas, como consecuencia de pequeños cambios conformacionales sufridos por las moléculas mientras permanecen asociadas (Cleland *y col.*, 1993).

Este mismo comportamiento puede ser causado por cambios en las condiciones de pH y/o fuerza iónica de las soluciones de proteínas (Blank, 1987).

ii. Estrés mecánico.

Cuando las proteínas son sometidas a estrés mecánico debido a fuerzas de cizalla pueden sufrir alteraciones en la estructura secundaria y terciaria (Truskey *y col.*, 1987). Estas alteraciones aumentan con el tiempo de exposición de las proteínas a las condiciones de estrés (Kim *y col.*, 1993).

En los procesos de MFTAV, las fuerzas de cizalla están involucradas en el circuito correspondiente a la bomba y en la superficie de la membrana, controladas fundamentalmente por la velocidad de recirculación, y en el interior de los poros, como consecuencia más directa de la presión transmembrana.

La desnaturalización de las proteínas es más rápida y severa al aumentar la velocidad de recirculación en el sistema de filtración (Meireles *y col.*, 1991). Se ha podido establecer además, una correlación fuerte entre la desnaturalización y el número de pasos a través de la bomba en la recirculación de las soluciones de proteínas durante los procesos de MFTAV (Chandavarkar, 1990).

Utilizando técnicas fisico-químicas de dicroísmo y espectroscopía, Franken y colaboradores (1990) observaron pequeños cambios en la estructura secundaria de proteínas que habían sido sometidas al transporte a través de una membrana. Las fuerzas

de cizalla en el interior de los poros probablemente estén induciendo la desnaturalización total o parcial de las proteínas (Jonsson *y col.*, 1991; Bowen y Gan, 1992).

Valores elevados de presión transmembrana operando simultáneamente con condiciones experimentales que favorecen el fenómeno de "polarización de la concentración", ésto es, una velocidad de recirculación baja o una concentración de proteína alta, promueven la desnaturalización de las proteínas (Meireles *y col.*, 1991). Es posible que, bajo tales condiciones, la supersaturación de la entrada de los poros de la membrana por moléculas de proteínas sometidas a un estrés elevado debido a las fuerzas de cizalla generadas en la superficie de la membrana, esté induciendo el despliegamiento de las moléculas (Kim *y col.*, 1993). Al mismo tiempo, una presión transmembrana alta puede estar favoreciendo el "ensuciamiento" de la membrana, como consecuencia de una mayor adsorción y/o deposición sobre las paredes de los poros de proteínas desnaturalizadas por las fuerzas de cizalla que están actuando en el interior de los poros de la membrana (Persson *y col.*, 1993b).

iii. Interacciones proteína-membrana.

Otros mecanismos que puede causar la desnaturalización de las proteínas en los procesos de membrana son las interacciones de las proteínas con la membrana (Persson *y col.*, 1993a, 1993b).

Estudios de adsorción han demostrado que las proteínas pueden sufrir una desnaturalización gradual mientras permanecen adsorbidas a una superficie (Norde, 1986; Sadana, 1992; Steadman *y col.*, 1992). Si la adsorción es reversible, una vez disociadas de la superficie, las moléculas de proteínas se renaturalizan lentamente al azar (Kondo *y col.*, 1991; Wahlgren y Arnebrant, 1991)) o bien, interactúan unas con otras a través de los residuos hidrofóbicos que permanecen expuestos tras la desnaturalización (Andrade *y col.*, 1992).

La adsorción a superficies también puede descender la termoestabilidad de las proteínas (Steadman *y col.*, 1992). Por esta razón, el aumento de la temperatura derivado de la recirculación de las soluciones en los procesos de filtración tangencial puede favorecer la desnaturalización de las proteínas, si se están produciendo fenómenos de adsorción de proteínas a membrana.

Una serie de factores están determinando la adsorción de las proteínas a la membrana, incluyendo la naturaleza química de la membrana, la estructura tanto de las proteínas, como de la membrana, y la magnitud y signo de la carga de ambos elementos, proteínas y superficie de la membrana. En el primer caso, el comportamiento adsorptivo de una membrana aumenta con el carácter hidrofóbico de su superficie (Persson *y col.*, 1993a). Los polímeros sintéticos, como la polisulfona o el polietileno, confieren a las membranas una gran estabilidad física y frente al ataque microbiano, pero, por contra, son muy hidrófobos; la hidrofiliación de las superficies de las membranas fabricadas con tales polímeros es requerida normalmente al objeto de reducir la adsorción inespecífica de proteínas, así como la irreversibilidad de la adsorción (Kim *y col.*, 1994). En el segundo caso, las proteínas con una flexibilidad conformacional alta (*soft proteins*) tienen mayor tendencia a la adsorción, debido a que los pequeños cambios conformacionales que regularmente están sufriendo pueden generar una fuerza directriz de las interacciones hidrofóbicas con la superficie de la membrana (Wahlgen y Arnebrant, 1991). Respecto a la influencia de la estructura de la membrana, los niveles de adsorción de proteínas aumentan al aumentar la rugosidad de la superficie externa de la membrana, mientras que disminuyen al aumentar la tortuosidad interna de los poros (Chen *y col.*, 1995). El aumento del tamaño de poro y de la superficie interna de filtración (porosidad) favorecen, además, la adsorción de proteínas (Persson *y col.*, 1993a). Por último, considerando el efecto de la carga eléctrica, las interacciones proteína-membrana dependen del pH (Bowen y Gan, 1991), el cual está controlando la carga tanto de las proteínas, como de la superficie de la membrana. En condiciones atractivas, Hlavacek y Bouchet (1993) han observado un incremento de la adsorción, asociado a la desnaturalización, de seroalbúmina bovina a membranas de MF.

Las consecuencias moleculares de la desnaturalización de las proteínas en los procesos de MFTAV pueden traducirse en la inactivación de las enzimas, como ha sido sugerido por Bowen y Gan (1992), y en la agregación de proteínas. Para este último caso, algunas notaciones interesantes son presentadas a continuación.

4.1. Agregación de proteínas.

La agregación de proteínas usualmente es un proceso irreversible que involucra la interacción de dos o más moléculas de proteína desnaturalizadas (Cleland *y col.*, 1993). Conforme a esta definición, la desnaturalización debe ocurrir antes de la formación del agregado. Tras la desnaturalización, los residuos hidrofóbicos de las proteínas quedan expuestos al solvente (Shortle *y col.*, 1992) favoreciéndose, por tanto, las interacciones hidrofóbicas. Esta circunstancia resulta en la agregación de las proteínas y en un incremento de la tendencia de las moléculas a la adsorción (Persson y Gekas, 1994).

Los agregados de proteínas han sido visualizados *in situ* formando parte del material depositado sobre membranas de MF (Wandelt *y col.*, 1992) y ultrafiltración (UF) (Kim *y col.*, 1993). Trazas cuantitativas de agregados de proteínas y/o proteínas desnaturalizadas depositadas sobre las membranas en procesos de MF han sido consideradas como soportes iniciales para la deposición posterior de moléculas de proteína desde la solución (Kelly *y col.*, 1993).

El aspecto y el grosor del depósito formado sobre la superficie de la membrana durante los procesos de MFTAV varían con las condiciones de operación, en relación a la velocidad de recirculación y a la presión transmembrana (Wandelt *y col.*, 1992). Obviamente, la resistencia hidráulica de la membrana debida al depósito dependerá de las propiedades físicas de este último y del número de agregados interceptados por el mismo (Hlavacek y Bouchet, 1993).

Tomando como referencia el modelo de simulación planteado por Shmitz y colaboradores (1993) para describir la deposición y formación de agregados de partículas coloidales durante procesos de MFTAV, las distintas situaciones que puede albergar una proteína desnaturalizada en la proximidad de la superficie de la membrana de MF aparecen reflejadas en la figura 4. Cada molécula de proteína, considerada como una partícula, sigue una trayectoria incidente determinada por el balance entre las fuerzas de convección y las de difusión, relativas a la membrana, que están actuando sobre ella. Cuando experimenta el contacto directo con la superficie de la membrana o con otra proteína que esté formando parte del depósito en crecimiento, es capturada inmediatamente siempre que las fuerzas de adhesión proteína-membrana o proteína-proteína predominen sobre las fuerzas hidrodinámicas que tienden a arrastrar a las moléculas fuera del depósito (A y B respectivamente). Sin embargo, la proteína incidente puede sufrir una sucesión de contactos y de reordenamientos, ya sea con la membrana o, en su caso, con las proteínas depositadas previamente, antes de alcanzar la posición final dentro del depósito si las fuerzas hidrodinámicas del sistema son muy influyentes sobre las moléculas en movimiento (C); esta habilidad parece estar directamente relacionada con la intensidad de las fuerzas de cizalla que están actuando en la vecindad de la superficie de la membrana (Shmitz y Houi, 1991).

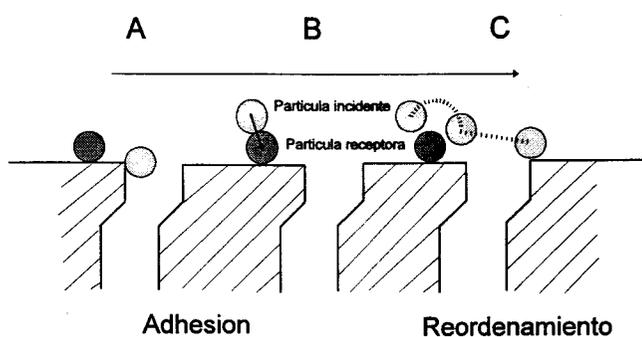


Figura 4. Papeles de la adhesión (A y B) y el reordenamiento (C) en el transcurrir de las partículas que se encuentran próximas a la superficie de la membrana de MF.

La morfología del depósito formado sobre la membrana viene determinada por el predominio de una de las dos posibilidades empíricas anteriores, las cuales han permitido explicar, al menos cualitativamente, resultados reales observados en procesos de MFTAV (Wandelt *y col.*, 1992). El efecto de la velocidad tangencial de la solución resulta ser muy significativo reduciendo el crecimiento vertical (grosor) del depósito y la compactación del mismo. Así, el primer caso, cuyo análogo experimental puede ser una velocidad de recirculación baja, origina un depósito bastante heterogéneo y poroso, de aspecto dendrítico, que ofrece poca resistencia al flujo del permeado. Por el contrario, para una velocidad de recirculación alta, como puede asignarse al segundo caso, el depósito resultante es más grueso, homogéneo y compacto, que da lugar a una resistencia de la membrana elevada. Consideraciones tales permiten relacionar las condiciones hidrodinámicas del sistema y los aspectos físico-químicos de la solución, con la dinámica de formación de agregados sobre la superficie de la membrana y, extensiblemente, sobre la superficie interna de los poros de la membrana, en MFTAV.

Desde un punto de vista tecnológico, dada la sensibilidad de las proteínas a las agresiones del entorno, es importante identificar las condiciones que aseguren un buen diseño del proceso de MFTAV. Como regla general, el "ensuciamiento" de la membrana se mantiene en niveles bajos si las moléculas de proteínas se hallan en estado estable respecto al pH, temperatura, interacciones con la membrana y fuerzas de cizalla; y cuando el fenómeno de la "polarización de la concentración" se ha eliminado en la mayor proporción posible (control de la velocidad de recirculación, presión transmembrana y concentración de la solución), evitándose, al mismo tiempo, la deposición masiva de materiales en el interior de los poros de la membrana.

Finalmente, en el siguiente apartado se resumen los principales aspectos de la SK, enzima que ha servido de objeto para los estudios presentados en este trabajo.

5. Estreptoquinasa.

La estreptoquinasa (SK) es una proteína exocelular producida por los estreptococos β -hemolíticos pertenecientes a los grupos A, C y G de Lancefield (Huang y col., 1989); aunque no tiene actividad enzimática intrínseca (Radek y Castellino, 1989), es capaz de activar al precursor inactivo plasminógeno para su transformación en la enzima fibrinolítica plasmina (Paques, 1986) que posteriormente disuelve los filamentos de fibrina en los coágulos de sangre. La activación es mediada ya sea por un complejo equimolar formado entre la SK y el plasminógeno, en el cual la molécula de plasminógeno experimenta una serie de cambios conformacionales que terminan originando un centro activo para la función activadora sobre el plasminógeno libre, o bien a través de un complejo de estequiometría similar entre la SK y la plasmina, el cual desempeña la función activadora sobre el plasminógeno mediante el propio centro activo de la molécula de plasmina (Bakshy y col., 1986). Este último complejo se origina por la rotura de un enlace peptídico intramolecular en el plasminógeno dentro del complejo SK-plasminógeno y/o por la unión de la SK a la plasmina previamente formada (Castellino, 1983).

Desde los últimos 30 años, la SK viene utilizándose como agente trombolítico eficaz en el tratamiento de infartos de miocardio y de trombosis (Martin, 1982). Ensayos clínicos internacionales, GISSI-1 (1986), ISIS-2 (1988), GISSI-2 (1990) e ISIS-3 (1992), han coincidido en compararla con el activador tisular del plasminógeno (t-PA) de mamíferos, en cuanto a su uso terapéutico por reducir de manera equitativa la mortalidad hospitalaria, sin dejar de representar una ventaja económica respecto del mismo (Habid, 1995a).

La SK producida por *Streptococcus equisimilis*, la cual permite la activación específica de los plasminógenos humano y felino (Castellino, 1979), es una proteína de 414 aminoácidos, monomérica y con una masa molecular aproximada de 47 kilodaltones (kDa) (Malke y col., 1985). Su secuencia no presenta homología significativa con otras proteínas,

salvo con las serín-proteasas del tipo tripsina, si bien no exhibe ninguna de las propiedades clásicas de tales enzimas (Jackson y Tang, 1982), estando desprovista de carbohidratos, cisteínas y cistinas (Brockway y Castellino, 1974); carece además de grupo protético y de sitios de unión para cationes divalentes (Welfle *y col.*, 1992b). Dichas características han facilitado su clonación y expresión eficiente en diversos huéspedes, tales como *Escherichia coli* (Campos *y col.*, 1991; Estrada *y col.*, 1992) y *Bacillus subtilis* (Klessen y Malke, 1986; Wong *y col.*, 1994).

La estructura secundaria de la SK ha sido estudiada por difracción circular (Radek y Castellino, 1989; Parrado *y col.*, 1996) y espectroscopía infrarroja (Fabian *y col.*, 1992) y de Raman (Welfle *y col.*, 1992a). Estos estudios han dejado establecido que se trata de una proteína constituida por estructuras alfas y betas. Se conoce bastante poco, sin embargo, acerca de la disposición espacial de los elementos de estructura secundaria en la molécula, dada las dificultades que plantea su relativamente elevada masa molecular (47 kDa) y la carencia, hasta el momento, de cristales apropiados para su estudio por difracción de rayos X; no obstante, los resultados obtenidos a partir de experimentos de fraccionamiento proteolítico (Brockway y Castellino, 1974; Parrado *y col.*, 1996) y de resonancia magnética nuclear (Teuten *y col.*, 1993; Parrado *y col.*, 1996) apuntan a la existencia de varios dominios funcionalmente semiindependientes dentro de la molécula. Desde el punto de vista termodinámico, también se ha demostrado la presencia en la SK de dominios de estabilidad independientes (Radek y Castellino, 1989; Welfle *y col.*, 1992b).

De todo lo expuesto se puede deducir que la SK es una proteína suficientemente estudiada para permitir un análisis molecular concluyente en diferentes estados y/o comportamientos derivados de situaciones diferentes, mediante técnicas fiables y bien contrastadas.

Objetivos y Contenidos

El objetivo principal de este trabajo fue investigar la efectividad práctica del proceso de microfiltración tangencial a alta velocidad (MFTAV) para la recuperación de proteínas exocelulares altamente sensibles, caso de las enzimas, desde caldos de fermentación.

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio habían puesto de manifiesto la dificultad en la transmisión de las enzimas a través de la membrana de microfiltración (MF), así como pérdidas de actividades enzimáticas, durante la MFTAV a partir de caldos de fermentación de estreptococos (Hernández-Pinzón y Bautista, 1992). En base a estos hechos, se plantearon los siguientes objetivos experimentales:

Evaluación del rendimiento del proceso de MFTAV para la recuperación de la enzima estreptokinasa (SK) producida por *Streptococcus equisimilis*.

Estudio de los fenómenos implicados en el condicionamiento de las características hidrodinámicas del proceso.

Estudio de la capacidad selectiva de la membrana de MF a lo largo del proceso.

Caracterización de los daños inducidos en las proteínas presentes en el caldo de fermentación durante el proceso y, más concretamente, en relación a la enzima SK.

Para el cumplimiento de los objetivos planteados, el trabajo se ha estructurado como sigue:

Primero, crecimiento de la cepa en un medio definido y estudio de la expresión de la actividad SK.

Segundo, recuperación de SK por métodos tradicionales de centrifugación-precipitación y por procesos de membrana, microfiltración-ultrafiltración. Los dos abordajes son analizados en cuanto al balance de recuperación para, finalmente, presentar una comparación de los resultados obtenidos.

Tercero, estudio detallado del proceso de MFTAV en el que se describen:

- (a) los cambios en la permeabilidad del caldo de fermentación a través de la membrana de microfiltración (MF) y con ello,
- (b) la influencia de la interacción de las proteínas con la membrana de MF;
- (c) la retención de las proteínas por la membrana de MF y el estudio de las posibles causas;
- (d) las pérdidas de actividad SK y la determinación de los mecanismos responsables, unido a,
- (e) la caracterización de las alteraciones de las proteínas y las repercusiones directas sobre la SK, y por último,
- (d) el efecto de algunos aditivos en la recuperación de la actividad SK.

Procedimiento Experimental

1. Materiales.

1.1. Microorganismo.

El microorganismo utilizado en el presente trabajo ha sido una cepa de estreptococo β -hemolítico (HG003), perteneciente al grupo C de Lancefield, obtenida por mutación con nitrosoguanidina a partir de la cepa H46, cepa original de Cristensen (Bautista, 1985). Esta cepa actualmente está siendo utilizada para la producción industrial de estreptoquinasa (SK) por un laboratorio químico-farmacéutico español.

1.2. Cultivos y fermentaciones.

Todo el material empleado para el cultivo de los microorganismos ha sido material de vidrio o plástico transparente. La mayor parte de los productos utilizados para la elaboración de los medios de cultivo (agar, peptonas, medios, etc.) fueron suministrados por Difco Laboratories (Detroit, USA).

Las fermentaciones fueron llevadas a cabo en un reactor Biolab (Braun, Alemania) con sistemas de control de pH, temperatura y agitación, según se muestra en la figura 5. Sus principales componentes incluyen: una cuba de vidrio Pyrex de 1 ó 10 litros de capacidad con cabeza de seis entradas, un electrodo de pH (Ingold 465), una sonda de temperatura de platino-100, un agitador mecánico y reguladores de pH, temperatura y agitación.

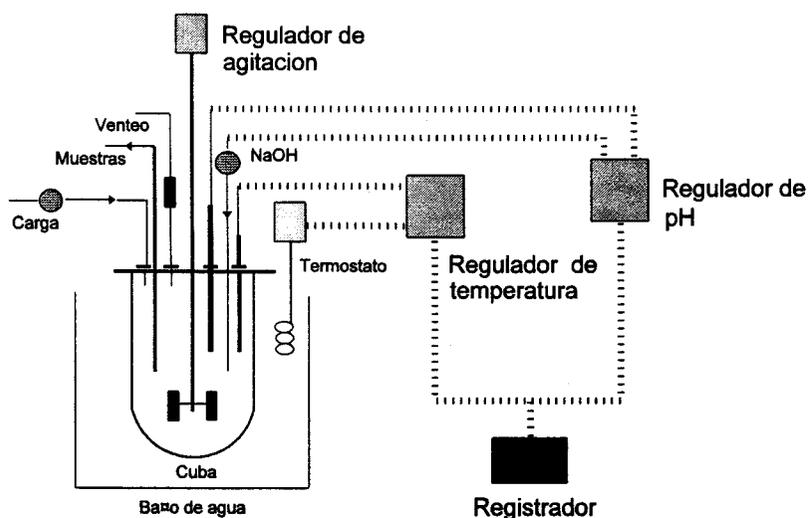


Figura 5. Esquema del reactor utilizado para las fermentaciones bajo condiciones controladas de pH, temperatura y agitación.

1.3. Métodos de análisis.

Las medidas de cantidad de proteína y actividad SK fueron determinadas en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón). La seroalbúmina bovina fue suministrada por Sigma, S.A. (St. Louis, USA). EL plasminógeno y el sustrato cromogénico para la valoración de la actividad SK fueron suministrados por KabiVitrum (Estocolmo, Suecia) y la Varidasa Tópica por Cyanamic Iberica, S. A. (Madrid, España).

La densidad celular a lo largo de las fermentaciones se ha seguido por espectrofotometría (Shimadzu UV-160A) y para la determinación de la biomasa se ha utilizado: un portafiltro de vidrio Pyrex de 47 mm de diámetro, una membrana de 0,22 μm (Millipore, MA, USA), una estufa selecta y una balanza de precisión (Metler AE50).

La concentración de glucosa en los caldos de fermentación fue ensayada enzimáticamente usando un analizador de glucosa Beckman Glucose Analyser 2 (Beckman Inst. Inc., USA) y el *kit* de análisis Glucosa-Oxidasa de Beckman.

1.4. Precipitación de los caldos de fermentación.

El ácido clorhídrico (HCl) y el etanol absoluto utilizados para precipitar el caldo de fermentación libre de células fueron de calidad analítica y suministrados por E. Merck (Darmstadt, Alemania). El polietilenglicol de peso molecular 6.000 (PEG-6.000) se obtuvo a partir de I.Q.A.S.A. (Tarragona, España).

Tanto para clarificar el caldo de fermentación como para recuperar los distintos precipitados, se utilizó una centrífuga Centricon H-401 (Kontron AG., Zurich, Suiza).

1.4. Filtración tangencial a alta velocidad.

El sistema de filtración tangencial empleado se muestra en la figura 6. Consta básicamente de una célula de filtración (Minissette Cell, Filtron Tech. Corp., MA, USA) equipada con membranas de polietersulfona de 0,07 m² de superficie de filtración (Serie Omega, Filtron), accesorios complementarios (tornillos de apriete, manómetros, tubos de conexión, etc.) y una bomba de desplazamiento positivo tipo Procon (Cole-Parmer Inst. Co., Chicago, USA) capaz de proporcionar una presión máxima de 1.000 kilopascales (kPa).

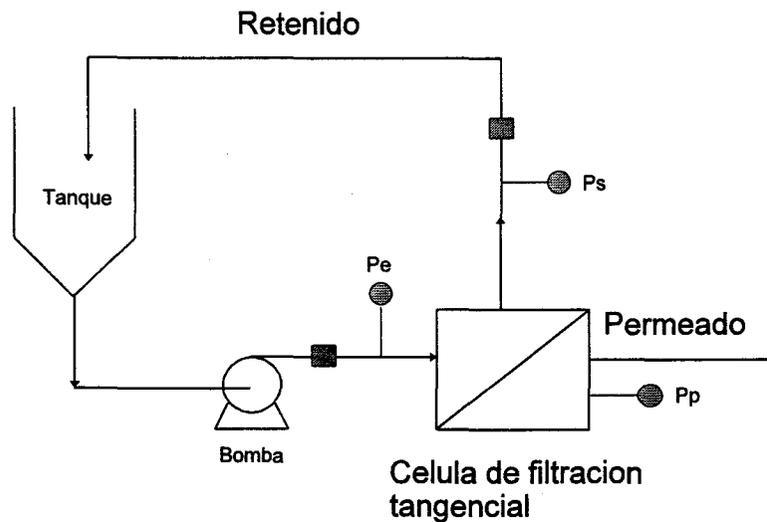


Figura 6. Esquema del sistema de filtración tangencial utilizado para clarificar y concentrar el caldo de fermentación.

Se han utilizado membranas de microfiltración (MF) de 0,3 y 0,8 μm de tamaño de poro y membranas de ultrafiltración (UF) de corte nominal 10.000 (10 kilodaltones, kDa).

1.5. Caracterización de proteínas.

El equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) (Waters, Millipore Cop. USA) utilizado para el análisis de aminoácidos consistió en un sistema cuaternario de mezcla de solventes Model 600E , un inyector automático Model 712, un detector Model 484 UV-VIS y un regulador de temperatura Jubalo F10. Las separaciones fueron llevadas a cabo en una columna de fase reversa Nova-Pack C₁₈ (Waters) de 300 por 3,9 mm y 4 μm de tamaño de partícula. Los datos fueron procesados mediante soporte informático utilizando el programa Maxima 820 versión 3.3 (Waters). El dietiletoximetilmalonato para la derivatización de lo aminoácidos fue suministrado por Fluka, AG (Bucks, Suiza) y el acetonitrilo de grado HPLC por Romil Chemicals (Loughborough, UK).

Para la caracterización de tamaños moleculares se ha utilizado un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Presión (FPLC) (Farmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) cuyos principales componentes son: un controlador tipo LCC 500 con un sistema binario de bombas Pump 500 y un detector ultravioleta UV-M. Las columnas de filtración molecular utilizadas para las separaciones han sido Superose 12 HR 10/30 con un rango de discriminación entre 1 y 300 kDa y Superose 6 HR 10/30 con un rango mayor entre 5 y 5.000 kDa, ambas suministradas por Pharmacia. Los datos fueron procesados con el programa de ordenador FPLCdirector™ (Pharmacia).

Las electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) fueron llevadas a cabo en un sistema Mini-Protein II (Bio-Rad Lab., Richmoud, CA) y los isoelectroenfoques (IEF) en un sistema Linus Mini-Cell (Cultek, S.L., Madrid, España). Todos los reactivos utilizados para la elaboración de los geles fueron suministrados por Bio-Rad.

Las bandas de proteína sobre geles SDS-PAGE fueron cuantificadas en un densitómetro laser Molecular Dynamic Model 300A (Sunnyvale, CA), utilizando el programa de ordenador ImageQuant versión 3.0 (Molecular Dynamic) para procesar los datos.

1.6. Pruebas físico-químicas.

El microcalorímetro utilizado para los experimentos de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) ha sido básicamente el modelo DASM-4M diseñado por Dr.P.L. Privalov (1980). En la figura 7 se muestra un esquema de la unidad calorimétrica. Se observan dos células M y R, de muestra y de referencia respectivamente, construidas en oro, de aproximadamente 0,47 cm³ de volumen. Las células están en contacto íntimo con una termopila que detecta cualquier diferencia de temperatura entre ambas células. El análisis y procesamiento de los datos, así como la deconvolución de las curvas

calorimétricas, se ha realizado mediante el programa de informática DSC-Master diseñado por el Departamento de Química-Física Farmacéutica de la Universidad Complutense de Madrid e instalado en un PC.

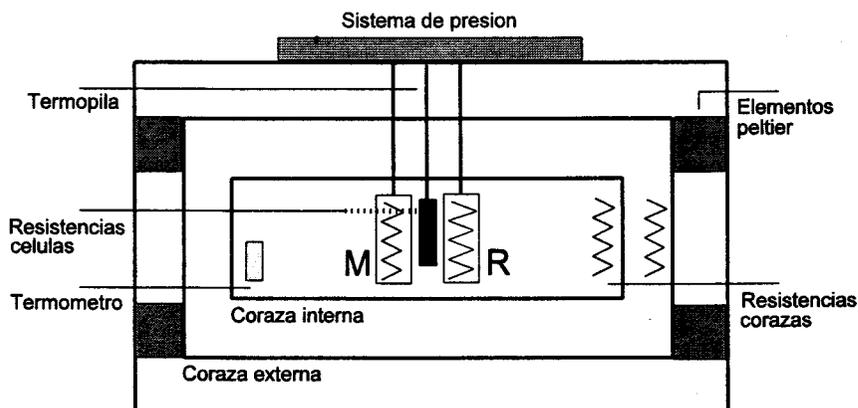


Figura 7. Esquema de la unidad calorimétrica utilizada para los análisis de DSC.

Los espectros de Dicroísmo Circular (CD) en el ultravioleta lejano y cercano han sido realizados en un espectropolarímetro Jasco C-720 (Easton, MD, USA). Para la deconvolución de los mismos se ha utilizado el algoritmo propuesto por Yang y colaboradores (1986).

2. Métodos.

2.1. Medio y condiciones de crecimiento.

El medio y las condiciones de crecimiento fueron las previamente optimizadas en nuestro laboratorio (Bautista *et al.*, 1986). El microorganismo (**semilla**) se mantuvo a 37°C en cultivo sólido sobre placas Petri con Dextrose-Agar (Difco). Para la preparación del **inóculo**, una porción de células tomada a partir de estos cultivos se inoculó en 50 ml de Dextrose-Broth (Difco) y se incubó a 37°C sin agitación hasta alcanzar una densidad de crecimiento de 70-75% de Transmitancia (a 620 nm). Unos 25 ml de este inóculo fueron transferidos al **tanque de siembra** lleno con 1.000 ml de medio de cultivo (pH 7,4) cuya composición por litro fue la siguiente: 10 g de dextrosa; 2 g de extracto de levaduras; 10 g de NZ-Amina; 3,2 g de NaH₂PO₄; 0,2 g de MgSO₄·7H₂O; 10 ml de solución salina y 10 ml de solución vitamínica; y se dejó cultivar a 37°C hasta alcanzar una densidad celular de 80% de Transmitancia (a 620 nm), momento en que el tanque de siembra es trasvasado, vía estéril, **al fermentador**.

Los medios fueron esterilizados en autoclave a 120°C y 1,2 atmósferas durante 20 minutos, excepto las vitaminas y las soluciones de minerales que fueron esterilizadas por filtración a través de filtros estériles de 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore, MA, USA).

2.2. Medio y condiciones de fermentación.

La composición del medio de fermentación por litro fue la siguiente: 50 g de dextrosa; 25 g de extracto de levaduras; 3,2 g de NaH₂PO₄; 0,2 g de MgSO₄·7H₂O; 10 ml de solución salina y 10 ml de solución vitamínica.

Una vez trasvasado el tanque de siembra a la cuba del reactor (**fermentador**), la fermentación fue llevada a cabo en discontinuo a 37°C, a un pH constante de 7,4 mantenido por la adición de NaOH 10 N y bajo una agitación de 50 rpm. El cultivo se mantuvo hasta que la concentración de glucosa en el medio, medida por el método de la Glucosa-Oxidasa, fue $\leq 0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. El tamaño del inóculo (10% del volumen de fermentación) fue determinado a fin de garantizar que el cultivo presente una fase de latencia lo más corta posible y entre rápidamente en fase exponencial, terminándose la fermentación al cabo de 12-13 horas.

Las muestras para el análisis del crecimiento celular, el consumo de glucosa y la producción de estreptoquinasa (SK) fueron retiradas a intervalos de 2 horas.

2.3. Métodos de análisis.

2.3.1. Determinación de proteínas.

El contenido de proteína se determinó por el método de Lowry y colaboradores (1951) o por el método de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina para la realización de las rectas de calibrado (figuras 8 y 9 respectivamente).

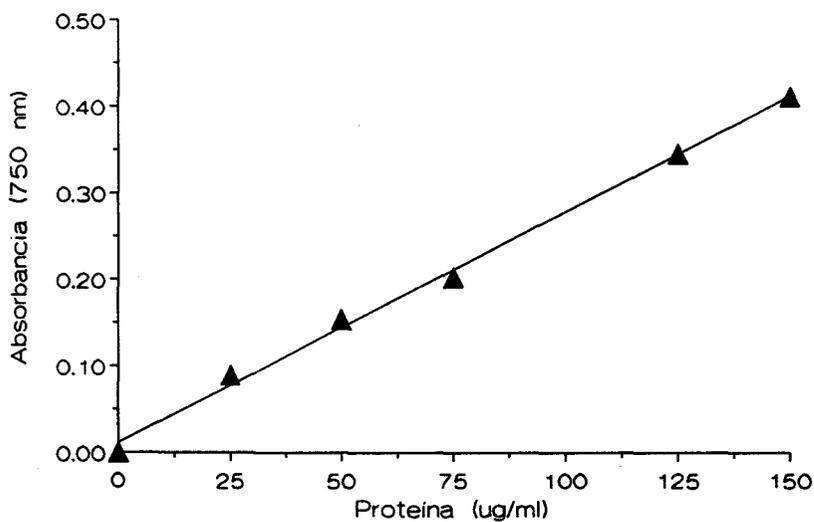


Figura 8. Recta de calibrado para la determinación de la cantidad de proteína por el método de Lowry. Patrón: seroalbúmina bovina. Ecuación de regresión lineal: $Y = 0,0113 + 2,676 \cdot 10^{-3} X$ ($r = 0,998$).

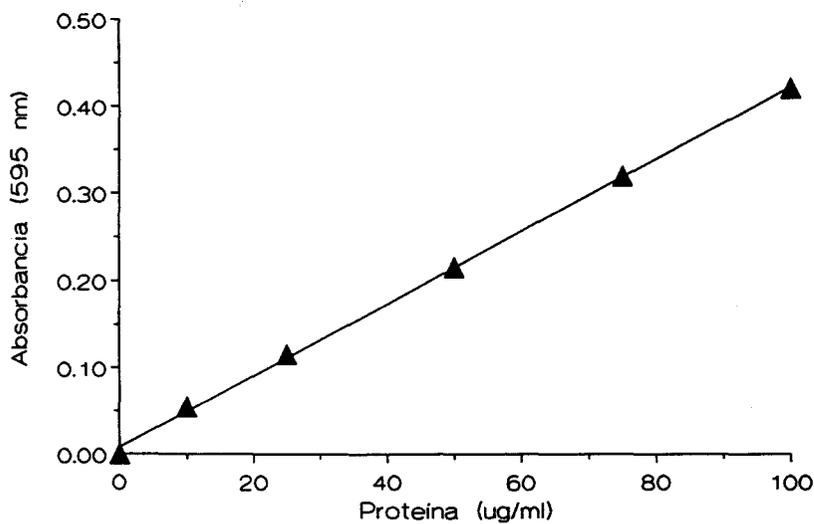


Figura 9. Recta de calibrado para la determinación de la cantidad de proteína por el método de Bradford. Patrón: seroalbúmina bovina. Ecuación de regresión lineal: $Y = 8,174 \cdot 10^{-3} + 4,150 \cdot 10^{-3} X$ ($r = 0,999$).

2.3.1. Determinación de la actividad SK.

La actividad SK fue medida por un método cromogénico (Hernández y col., 1990) usando H-D-Valina-L-Leucina-L-Lisina-p-nitroanilina (S-2251) como sustrato y Varidasa tópica como patrón determinándose a partir de la recta de calibrado (figura 10) las unidades de actividad SK (USK). Se incubaron 0,1 ml de una disolución de plasminógeno (1,25 unidades de caseína, CU·ml⁻¹) preparada en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,4 (a 37°C) con 0,56 ml del mismo tampón, durante 15 minutos a 37°C. Seguidamente se añadieron 0,1 ml de la muestra y se volvió a incubar durante otros 15 minutos a 37°C. Por último se disparó la reacción añadiendo 0,24 ml de sustrato S-2251 3 mM y se midió en cubeta termostatzada el incremento de Absorbancia a 405 nm durante al menos 3 minutos.

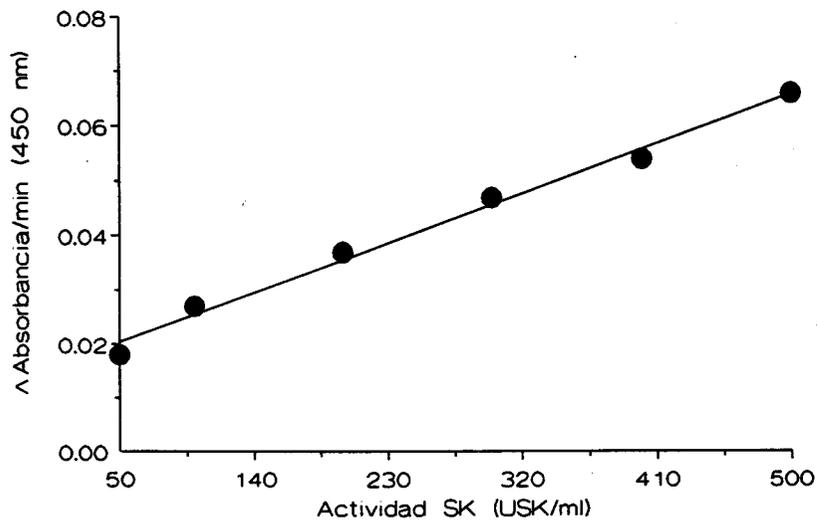


Figura 10. Recta de calibrado para la determinación de actividad SK por un método cromogénico. Patrón: Varidasa tópica. Ecuación de regresión lineal: $Y = 0,0154 + 1,011 \cdot 10^{-3}X$ ($r = 0,995$).

2.3.3. Densidad celular.

La densidad celular para elaborar las curvas de crecimiento fue determinada por medida directa de la Transmitancia de la muestra diluída 25 veces a una longitud de onda de 620 nm.

2.4. Precipitación del caldo de fermentación.

El caldo de fermentación, previamente a la precipitación con los distintos agentes, fue centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos para eliminar la masa celular. Medio litro de este caldo clarificado fue ajustado a pH 2-2,5 por la adición de HCl 6 N en frío (temperatura no superior a 10°C) y se dejó decantar a 4°C durante toda la noche. El precipitado fue recuperado por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 minutos y resuspendido en tampón fosfato 100 mM pH 8,0 con urea 1 M. Una agitación suave se mantuvo hasta obtener una disolución transparente que se reajustó a pH 7,5 por la adición de HCl 0,1 N a partir de la cual se determinó la recuperación de actividad SK (ver apartado 2.3).

Para la precipitación con etanol, se partió del mismo volumen de caldo clarificado al que añadimos etanol absoluto hasta una concentración final de 45% (v/v), bajo agitación suave y temperatura no superior a los 10°C. Tras decantar a 4°C durante toda la noche, el precipitado se recuperó por centrifugación y se reconstituyó de la misma manera que el precipitado ácido.

El procedimiento seguido para precipitar el caldo clarificado con polietilenglicol de peso molecular 6.000 (PEG-6.000) se basó en el método puesto a punto por Bautista (1985). Se añadió PEG-6.000 hasta alcanzar una concentración de 300 g·l⁻¹, referida al volumen de caldo utilizado, y se dejó agitando hasta su disolución total. A continuación se dejó decantar a temperatura ambiente durante 2 horas y el material precipitado fue

separado por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 minutos. La reconstitución del precipitado fue llevada a cabo como se indica anteriormente.

2.5. Filtración tangencial a alta velocidad.

La separación de cuerpos celulares por microfiltración tangencial a alta velocidad (MFTAV) fue realizada con membranas "viejas" (utilizadas más de cinco veces) de 0,3 μm de tamaño de poro bajo las siguientes condiciones: temperatura ambiente, presión transmembrana de 63 kilopascales (kPa) y velocidad de recirculación de 3 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Se tomaron muestras de permeado y de retenido a distintos valores de concentración de volumen (FCV), las cuales fueron analizadas para cantidad de proteína y actividad SK según se indica en el apartado 2.3. El valor máximo de FCV en todos los casos fue 8 veces. Este valor se seleccionó teniendo en cuenta la aparición de espuma y el aumento de temperatura que experimenta el caldo durante la recirculación.

Para la concentración de los caldos libres de células, el sistema de filtración tangencial operó bajo las mismas condiciones anteriores a través de membranas "viejas" de ultrafiltración (UF) de corte nominal 10.000 (10 kilodaltones, kDa).

Al final de cada experimento de filtración, se procedió al lavado de la membrana por recirculación secuencial de las siguientes soluciones: NaCl 0,1% (p/v), NaOH 0,5% (p/v), hipoclorito sódico 0,1% (p/v) y finalmente agua destilada hasta registrar pH neutro en el permeado. Una vez finalizado el lavado se comprobó la recuperación del flujo inicial, medido con agua destilada.

2.6. Caracterización de proteínas.

2.6.1. Determinación aminoacídica.

Las proteínas fueron hidrolizadas previamente bajo atmósfera de nitrógeno con HCl 6 N a 110°C durante 24 horas. Los aminoácidos resultantes fueron determinados básicamente por el método descrito por Alaiz y colaboradores (1992). Las muestras, tras la hidrólisis, fueron llevadas a sequedad, reconstituídas en 5 ml de tampón borato pH 9,0 y mezcladas con 4,0 ml de dietiletoximetilenmalonato para la derivatización. La reacción fue llevada a cabo a 50°C durante 50 minutos y con agitación. De entre 10 y 60 μ l de la mezcla prefiltrada por 0,22 μ m (Millipore, MA, USA) fueron inyectados en el cromatógrafo.

La resolución en columna de los aminoácidos derivatizados se realizó bajo un gradiente discontinuo acetato sódico 25 mM pH 6,0:acetonitrilo (Alaiz y col., 1992), a un flujo constante de 0,9 ml·min⁻¹. Las concentraciones de los distintos aminoácidos fueron determinadas a partir de curvas de calibrado realizadas separadamente para cada aminoácido.

2.6.2. Determinación de pesos moleculares por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida.

Las electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizaron siguiendo básicamente el método descrito por Laemmli (1970). Muestras de proteínas fueron mezcladas en proporción 1:1 con tampón Tris-HCl 10 mM pH 6,8 que contiene glicerol 20% (v/v), β -mercaptoetanol 10% (v/v), SDS 2,3% (p/v) y azul de bromofenol 0,005% (p/v), calentadas a ebullición durante 5 minutos y aplicadas sobre los geles. Seguidamente, los geles se corrieron en tampón Tris-HCl 25 mM pH 8,4 con glicina 0,19 M y SDS 0,1% (p/v) a una intensidad constante de 15 ó 20 miliamperios.

Como patrones para la determinación de los pesos moleculares a través de la correspondiente recta de calibrado (figura 11), se emplearon marcadores de peso molecular entre 29,0 y 119,0 kDa: anhidrasa carbónica (29,0), fumarasa (48,5), tetrámero de la hemoglobina (64,0), fructosa-6-fosfato kinasa (84,0) y β -galactosidasa (119,0) (Sigma S.A., St. Louis, USA).

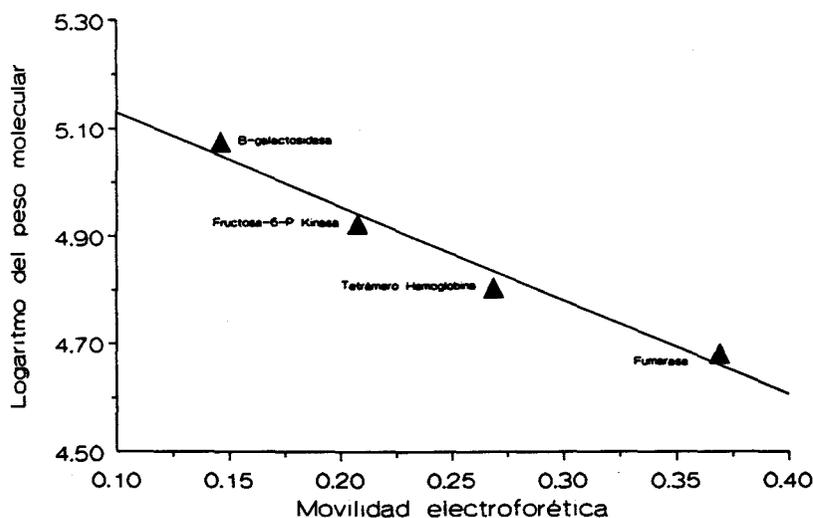


Figura 11. Recta de calibrado para la determinación de pesos moleculares por electroforesis. Ecuación de regresión lineal: $Y = 5,3047 - 1,7452X$ ($r = -0,987$).

Una vez finalizada la electroforesis, los gels se tiñeron con azul de Coomassie (Bio-Rad Lab., Richmond, CA) al 0,04% (p/v) en agua:metanol:acético (5:4:1) durante 30 minutos y finalmente se destiñeron con una solución que contenía ácido acético glacial 10% (v/v) y metanol 25% (v/v).

2.6.3. Determinación de tamaños moleculares por cromatografía de exclusión molecular.

Fue realizada en un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Presión (FPLC) con una columna Superose 12 HR 10/30 (1-300 kDa). Como eluyente se utilizó tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 que contenía NaCl 0,15 M y azida sódica 0,02% (p/v). En cada inyección se aplicaron 200 μ l de muestra (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de proteína) prefiltrada por 0,22 μm (Millipore, MA, USA). Las separaciones se llevaron a cabo a un flujo constante de 0,4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ y fueron monitoreadas a 280 nm. Una recta de calibrado relacionando los volúmenes de elución de proteínas patrones (Pharmacia, Uppsala, Suecia) con el logaritmo

de sus pesos moleculares (figura 12), permitió determinar el tamaño molecular promedio de las proteínas presentes en las muestras.

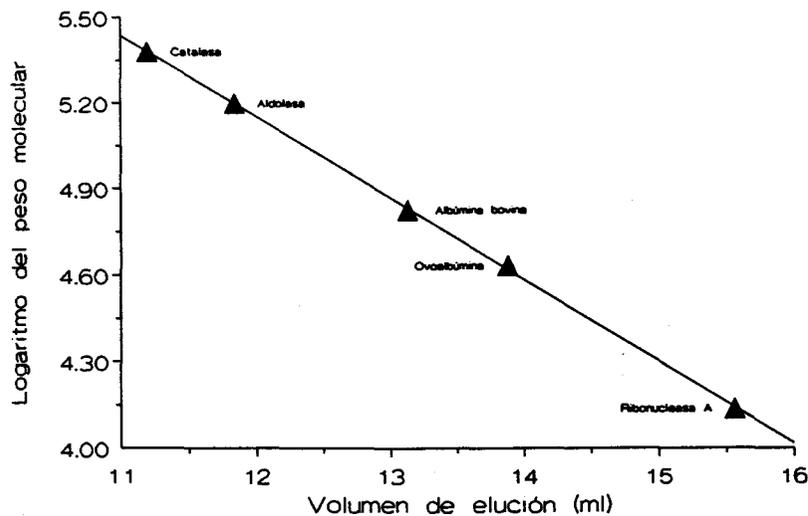


Figura 12. Recta de calibrado para la determinación de tamaños moleculares por cromatografía de exclusión molecular en columna Superose 12. Ecuación de regresión lineal: $Y = 8,5595 + 0,2839X$ ($r = -0,999$).

En los casos en que se utilizó la columna Superose 6 HR 10/30 (5-5000 kDa), las condiciones de elución y preparación de las muestras fueron similares.

2.6.4. Determinación de puntos isoeléctricos.

Con el fin de determinar el punto isoeléctrico (pI) de bandas individuales separadas por SDS-PAGE, los trozos de geles fueron cortados con un bisturí, depositados en tripas de diálisis de corte nominal 5.000 (5 kDa) (Spectrum Med. Ind. Inc., Canadá) y sumergidas en el mismo tampón de corrido utilizado para las electroforesis. Las proteínas fueron electroeluidas por aplicación de una corriente de 100 voltios durante 3 horas. Seguidamente se recolectaron los volúmenes del interior de las tripas de diálisis y se llevaron a sequedad en un concentrador Speed Vac SVC100 (Savant Inst. Inc., USA).

Para los isoelectroenfoces (IEF) se siguió el método descrito por Redpath (1992) con algunas modificaciones. Las muestras fueron disueltas en un tampón que contenía urea 9 M, chaps 0,05% (p/v) y una mezcla de anfolitos de rango de pH entre 2,5 y 6,5 (concentración final de 2,4 v/v), y centrifugadas durante 5 minutos a 12.000 rpm antes de su aplicación sobre geles de poliacrilamida 4% (p/v) con urea 9 M, chaps 2% (p/v) y anfolitos 2,4% (v/v) (pH 2,5-6,5). Una solución de NaOH 20 mM fue utilizada como anolito y otra de ácido fosfórico 10 mM como catolito, realizándose el enfoque de las proteínas durante 3 horas a intensidad constante de 4 miliamperios, un voltaje limitante de 1.000 voltios y a 10°C. Se utilizaron patrones de punto isoelectrónico entre 3,6 y 5,9: amilogucosidasa (3,6), inhibidor de la tripsina (4,6) y anhidrasa carbónica (5,9) (Sigma S.A., St. Louis, USA).

Finalmente los geles fueron lavados durante 2 horas con varios cambios de ácido tricloroacético 1% (p/v) para eliminar los anfolitos, y teñidos/desteñidos tal como se describe anteriormente (SDS-PAGE).

2.7. Medida de la interacción/adsorción de proteínas a membrana.

La interacción/adsorción de proteínas a las membranas de MF (0,3 y 0,8 μm) fue analizada recirculando durante 2 horas en el módulo de filtración tangencial medio litro de caldo de fermentación, en presencia y en ausencia de células, a diferentes concentraciones de proteína entre 0,2 y 1,0 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Para eliminar las células, el caldo de fermentación se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos. Los ensayos se realizaron bajo las mismas condiciones operacionales que los experimentos de MFTAV (ver apartado 2.5).

Muestras de 2 ml fueron retiradas del reservorio a distintos tiempos y utilizadas para valorar la cantidad de proteína tal como se ha descrito en el apartado 2.3.1. La cantidad de proteína que interactúa con la membrana fue determinada por diferencia respecto al valor de partida.

2.8. Obtención de anticuerpos policlonales anti-SK.

La SK purificada por electroelución desde el caldo de fermentación, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 2.6.4 , fue dializada durante toda la noche a 4°C frente a agua destilada. El dializado se concentró por UF en un microconcentrador provisto de una membrana de corte nominal 10.000 (10 kDa) (Microsep™, Filtron Techn. Corp., MA, USA), y se analizó en geles de SDS-poliacrilamida al 10% (p/v) dando como resultado la aparición de una banda mayoritaria de peso molecular 47 kDa (figura 13). El concentrado, 0,5 ml, conteniendo unos 94 µg de proteína purificada, fue emulsionado con coadyuvante completo de Freund (Sigma S.A., St. Louis, USA) en proporción 1:1 e inyectado subcutáneamente en la parte dorsal a lo largo de la columna vertebral de conejos blancos New Zealand previamente sangrados para la obtención de suero preimmune. A los 30 y 52 días de la primera inmunización se volvieron a inyectar unos 130 µg de SK purificada emulsionada con coadyuvante incompleto de Freund (1:1). El suero provisto de anticuerpos anti-SK fue obtenido a los 10 días después de la segunda inmunización.

Para titular el suero obtenido con tal procedimiento se procedió a inmunoprecipitar la actividad SK, según se indica en el apartado siguiente, utilizando como antígeno la SK (150 USK) purificada. En la figura 14 se muestra la curva de inmunoprecipitación donde puede observarse que 3 µl del anticuerpo policlonal anti-SK precipitan el 93,71% de la actividad SK presente. Esta inmunoprecipitación está acompañada de la desaparición casi paralela de la actividad en el sobrenadante. Para cantidades mayores de suero la actividad SK empieza a disminuir en el precipitado debido probablemente a inhibición por impedimento estérico en presencia del anticuerpo.

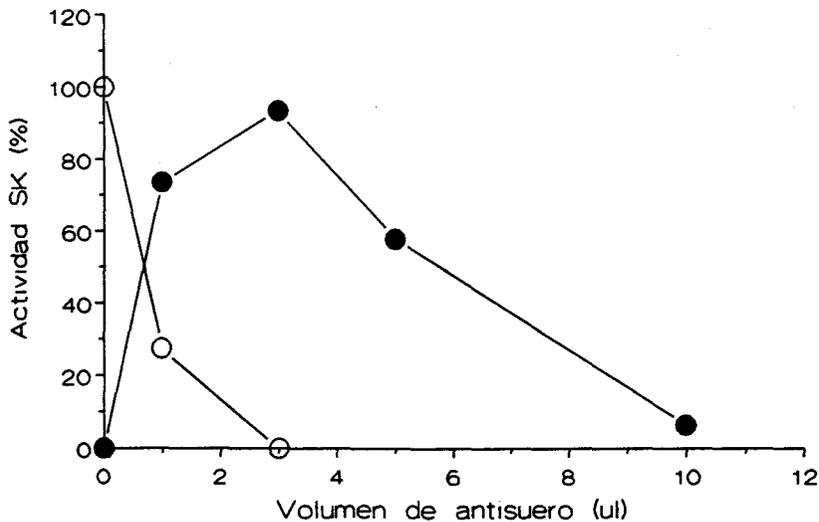


Figura 14. Titulación del anticuerpo anti-SK por inmunoprecipitación. La inmunoprecipitación se realizó utilizando SK purificada como antígeno y se determinó cuantificando el porcentaje de actividad en el precipitado (●) y en el sobrenadante (○).

La especificidad de anti-SK frente a las distintas proteínas presentes en el caldo de fermentación se realizó mediante *immunoblotting* sobre membranas de nitrocelulosa de 0,45 μm de tamaño de poro (Bio-Rad Lab., CA), después de la transferencia de las proteínas desde SDS-PAGE según describe Towbin y colaboradores (1981). Las membranas transferidas fueron incubadas durante 3 horas con el anticuerpo anti-SK diluído 1.000 veces y posteriormente reveladas utilizando el *kit de immunoblotting* Amplified Alkaline Phosphatase suministrado por Bio-Rad y siguiendo las instrucciones especificadas en el mismo. Tras la incubación con el primer anticuerpo (anti-SK), la membrana se lavó 2 veces durante 10 minutos con tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,5 conteniendo NaCl 0,5 M y Tween 20 0,05% (v/v) y se incubó con un segundo anticuerpo *anti-rabbit* biotinilado diluído 3.000 veces en el mismo tampón de lavado, durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación suave. Finalmente se lavó la membrana y se trató con una solución de fosfatasa

alcalina biotinilada y acomplejada con estreptavidina, durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación suave, procediéndose seguidamente al revelado.

2.9. Inmunoprecipitación de la actividad SK.

Los experimentos de inmunoprecipitación fueron llevados a cabo como sigue: 50 μ l de varias diluciones de anticuerpo anti-SK fueron precipitados utilizando 50 μ l de una suspensión de proteína A-sefarosa CL-4B (Sigma S.A., St. Louis, USA) al 10% (p/v) en tampón Tris- HCl 10 mM pH 7,5 con NaCl 140 mM y tritón-X-100 0,05% (p/v), durante 4 horas a 4°C y agitación, y en un volumen final de 300 μ l del mismo tampón. El complejo anti-SK-proteína A-sefarosa fue lavado tres veces e incubado con 100 μ l (100 USK) de permeado o de retenido a un factor de concentración de volumen de 8 veces (FCV = 8,0), así como de caldo de fermentación original. Tras la incubación, el complejo SK-anti-SK-proteína A-sefarose se separó de la SK no inmunoprecipitada por centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos y se procedió a determinar la actividad SK (ver apartado 2.2.3) en los sobrenadantes y en los precipitados.

2.10. Pruebas físico-químicas.

2.10.1. Purificación de la proteína.

La SK purificada para las distintas pruebas físico-químicas fue obtenida a partir de geles nativos de poliacrilamida al 6% (p/v). La preparación de los geles y las condiciones de corrido fueron las mismas que las especificadas en el apartado 2.6.2, salvo que se obvió la presencia de SDS.

Para la identificación en los geles de la banda de SK desde muestras de caldo de fermentación y de retenido (FCV = 8,0), se utilizó como patrón un preparado comercial de SK purificada y estabilizada para uso hospitalario (Streptase, Behringwerke AG.,

Alemania). Una vez reconocida, la banda fue cortada con un bisturí, homogenizada en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,5 con EDTA 0,1 mM y NaCl 150 mM, y recuperada por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 minutos. En todos los casos se midió la actividad enzimática en el sobrenadante tras ser ajustado a pH 7,5 por la adición de HCl 0,1 N. La proteína obtenida de esta forma mostró una banda mayoritaria de peso molecular 47 kDa al ser analizada por SDS-PAGE.

2.10.2. Calorimetría Diferencial de Barrido.

Antes de los experimentos calorimétricos, las muestras fueron dializadas en membranas de corte nominal 12.000 (Sigma S.A., St. Louis, USA), durante 24 horas a 4°C, frente a tampón HEPES 10 mM pH 7,5 que contenía NaCl 0,1 M y CaCl₂ 10 mM. Todas las medidas se realizaron con este mismo tampón y en el rango de concentración de proteína 0,1-0,5 mg·ml⁻¹ de soluciones previamente desgasificadas.

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) fue llevada a cabo en un volumen de célula de 0,4669 cm³ y bajo una sobrepresión de 2 atmósferas con nitrógeno, para evitar la formación de burbujas y la ebullición durante el calentamiento de la muestra por encima de los 100°C. La velocidad de barrido utilizada fue 1 °K·min⁻¹. Para chequear la reversibilidad de la desnaturalización inducida térmicamente se efectuó un segundo barrido de la muestra, análogo al primero, tras ser enfriada ésta a la temperatura inicial del experimento.

Los registros fueron corregidos respecto a la línea base correspondiente al tampón utilizado, y respecto a la diferencia de capacidad de calor entre los estados nativo y desnaturalizado. Esto último, trazando una sigmoide que une las temperaturas inicial y final de la transición (Takahashi y Sturtevant, 1981).

2.10.3. Dicroísmo Circular.

Las medidas de Dicroísmo Circular (CD) fueron llevadas a cabo en tampón fosfato 10 mM pH 7,5 a 25°C y un paso de luz de 0,2 cm para el ultravioleta lejano (190-

255 nm) y 1 cm en el caso del ultravioleta cercano (260-320 nm). La velocidad de barrido fue $50 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ y el tiempo de respuesta del aparato 1 segundo.

Los espectros (promedio de 5 barridos) fueron corregidos respecto a la línea base obtenida con el solvente y los datos fueron expresados como elipticidad molar por residuo, $[\Theta]$, en unidades de $\text{grad cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$, según la expresión $[\Theta] = \theta^\circ \text{ MMR} \cdot c^{-1} l^{-1}$, donde θ° es la elipticidad en mgrad, MMR la masa media por residuo (117,29 para la SK), c la concentración en $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ y l el paso de luz de la cubeta de cuarzo. El porcentaje de los distintos tipos de estructura secundaria en la proteína previamente purificada fue estimado con el correspondiente algoritmo (ver apartado 1.6).

2.11. Tratamiento estadístico de los datos.

Los experimentos se realizaron por triplicado o cuadruplicado y, en cada caso, se expresa la media y la desviación estándar (SD) de los valores obtenidos.

Las comparaciones estadísticas de los resultados se hicieron mediante análisis de la varianza (ANOVA) y el test de Tukey.

Resultados y Discusión

1. Crecimiento de Streptococcus equisimilis en discontinuo: Producción de estreptoquinasa.

Los estreptococos son microorganismos potencialmente útiles para la producción de diversas enzimas de provecho médico-farmacéutico, tales como la estreptoquinasa (SK), la estreptodornasa (SD) y la hialuronato liasa (HL) (Sprecher, 1984; Bautista, 1985). De entre todas las actividades enzimáticas exocelulares presentes en los caldos de fermentación de *Streptococcus equisimilis*, la SK ha sido elegida para nuestro trabajo por el gran interés que ha despertado en los últimos años, debido a su función como agente fibrinolítico (Chibber y col., 1985; Reddy, 1988; GISSI-2, 1990; ISIS-3, 1992; Habib, 1995a y b).

Uno de los principales inconvenientes que presentan los estreptococos pertenecientes al grupo piógenes en general, y *Streptococcus equisimilis* en particular, para su utilización como fuente de enzimas destinadas ya sea a la industria químico-farmacéutica, o incluso a la alimentaria, es la producción de estreptolisina (SLO) (Alouf, 1980). Por este motivo, hemos utilizado la cepa HG003 obtenida por mutación con nitrosoguanidina a partir de la cepa original H46 y seleccionada por su baja producción en SLO (Bautista, 1985).

Para evaluar la producción de SK por *Streptococcus equisimilis* procedimos a crecer la cepa HG003 en un medio de cultivo definido de sencilla preparación y compuesto de materias primas industrialmente disponibles— lógicamente, el desarrollo de una fermentación a escala piloto o industrial basada en la utilización de medios comerciales es impensable pues resultaría económicamente inviable. Como fuente de sales y vitaminas se han utilizado las soluciones propuestas por Milligan y colaboradores (1978) para el cultivo de estreptococos, la fuente carbonada ha sido dextrosa y la fuente nitrogenada principal, NZ-amina, un hidrolizado pancreático de caseína usado por la industria, suplementada con urea (ver apartado 2.1 del Procedimiento Experimental).

La elección de un hidrolizado de proteína como sustrato nitrogenado, constituido por péptidos de corto tamaño y por aminoácidos libres, se ha realizado de acuerdo con la influencia positiva que los péptidos pequeños ejercen sobre el crecimiento tanto de bacterias (Berg *y col.*, 1981; Leh, 1989; Lund, 1992; Parrado *y col.*, 1993), como de hongos (Leonhartsberger *y col.*, 1993) y levaduras (Tchorvanov y Lazarova, 1988; Perea *y col.*, 1993), acortando la fase de latencia con el consiguiente ahorro de tiempo, y dando lugar a altos rendimientos— los péptidos cortos tetra-, tri- y dipéptidos son asimilados de manera más directa y/o eficiente por los microorganismos que los aminoácidos libres (van Boven y Könings, 1986).

Los estreptococos presentan fermentación homoláctica en la que la glucosa es metabolizada a ácido láctico (Pelczar *y col.*, 1981). Esto significa que para mantener el pH constante de 7,4 es necesario añadir una base, generalmente sosa (NaOH), siendo el consumo de la base a lo largo de la fermentación una señal clara del crecimiento bacteriano (figura 15).

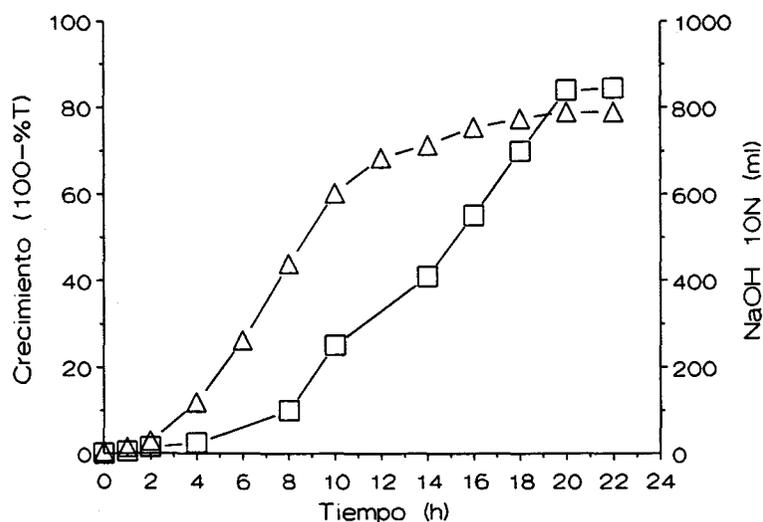


Figura 15. Comparación entre el crecimiento de *Streptococcus equisimilis* (Δ) en medio definido, que contiene dextrosa como fuente carbonada y NZ-amina como fuente nitrogenada principal, y el consumo de NaOH (\square) a lo largo de la fermentación.

En la figura 16 se observa que la producción de SK va prácticamente asociada al crecimiento exponencial, y que cesa cuando se agota la fuente carbonada en el medio de cultivo según la figura 17. Estos resultados son comparables a los obtenidos en nuestro laboratorio por Parrado y colaboradores (1993) para la producción de la misma enzima, y a los descritos para otras enzimas exocelulares producidas por estreptococos, como la SD (Blanco y col., 1983) y la HL (Bautista y col., 1985).

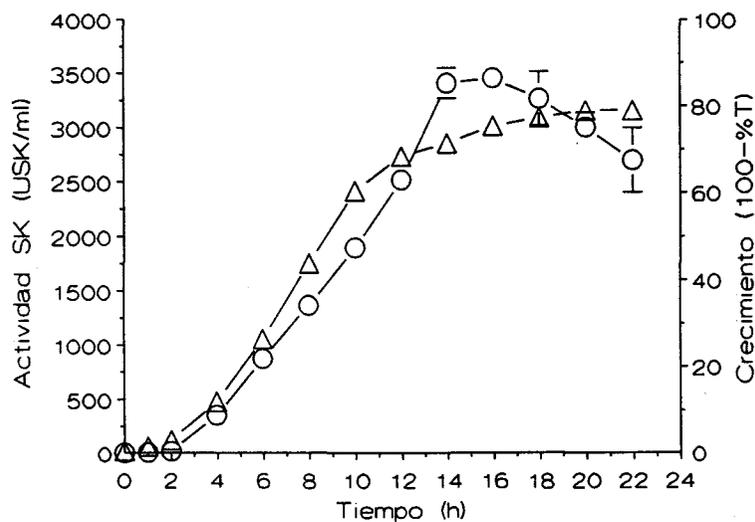


Figura 16. Producción de SK (○) asociada al crecimiento de *Streptococcus equisimilis* (△) en medio de cultivo definido.

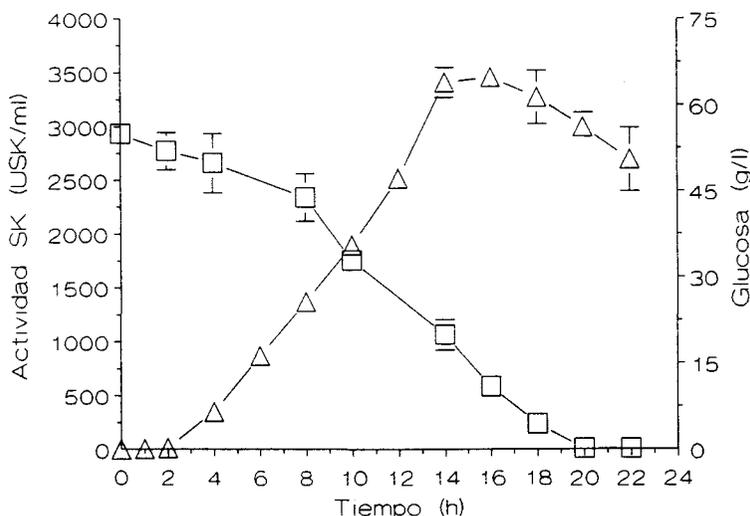


Figura 17. Producción de SK (\triangle) asociada al contenido de glucosa (fuente carbonada) (\square) en el medio de cultivo durante la fermentación.

Después de 16 horas de fermentación, coincidiendo con el cultivo ya en fase estacionaria, la concentración de actividad SK alcanza un valor medio de 3460 ± 57 $\text{USK} \cdot \text{ml}^{-1}$ y una productividad media de $216,5 \pm 3,6$ $\text{USK} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (tabla 2). A partir de este tiempo, la actividad comienza a disminuir alcanzándose una potencia de 2700 ± 297 $\text{USK} \cdot \text{ml}^{-1}$ a las 22 horas de cultivo. Este comportamiento puede explicarse teniendo en cuenta que para concentraciones relativamente altas de biomasa, entre 8 y 9 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, y una vez consumida la fuente carbonada del medio, se induce la producción de una sulfhidril proteasa similar a la papaína (Liu y Elliot, 1971) aumentando considerablemente la actividad proteolítica en los caldos de fermentación de estreptococos (Ozegowski y col., 1981); hecho que hemos podido verificar al medir la disminución de la cantidad de proteína en el medio a lo largo de la fermentación (tabla 2).

Tabla 2. Actividad SK y cantidad de proteína a lo largo del crecimiento de *Streptococcus equisimilis* en medio de cultivo definido.

Tiempo h	Crecimiento %T	Actividad SK USK ml ⁻¹	Proteína mg ml ⁻¹
1	99,5 ± 0,71	n. d.	n. d.
4	88,0 ± 1,41	355 ± 78	0,5 ± 0,1
8	56,0 ± 1,41	1.375 ± 106	4,8 ± 0,01
12	31,5 ± 0,71	2.520 ± 127	8,1 ± 0,7
16	24,5 ± 0,71	3.460 ± 57	10,4 ± 0,2
18	22,5 ± 0,71	3.275 ± 247	9,2 ± 0,1
20	21,0 ± 1,41	3.004 ± 136	8,3 ± 0,4
22	21,0 ± 1,41	2.700 ± 297	6,5 ± 0,5

T Transmitancia a 620 nm.

n. d. no determinado.

El interés por favorecer la obtención de una enzima para satisfacer, en un momento dado, las demandas concretas del mercado puede abordarse desde el punto de vista del aumento de la productividad y la eficiencia durante la etapa de fermentación. Un ejemplo en este sentido es el trabajo de Bautista y colaboradores (1986) quienes consiguieron duplicar la producción de HL optimizando la fracción de cosecha en procesos de fermentación discontinua repetida. El cultivo en continuo también supone una posibilidad al respecto que nos ocupa, si bien, en el caso de los estreptococos, tal procedimiento no ha resultado muy satisfactorio.()

El perfeccionamiento de las etapas relativas a la recuperación de productos representa otra alternativa posible para mejorar los rendimientos globales en la obtención de una enzima y, justamente, el trabajo que presentamos a continuación puede englobarse dentro de este ámbito como parte integrante del estudio para un mejor conocimiento de los fenómenos que controlan la efectividad de los procesos de recuperación por tecnología de membranas.

2. Recuperación de estreptoquinasa del caldo de fermentación.

Independientemente de que el producto de interés sea intracelular o exocelular, la primera etapa u operación unitaria para su recuperación, en todo proceso biotecnológico basado en la producción mediante técnicas de fermentación, consiste en la eliminación o separación de los cuerpos celulares. Esta operación puede realizarse por centrifugación (Rosen, 1984), floculación/sedimentación (Aunins y Wang, 1989) o microfiltración (MF) (Nagata *y col.*, 1989).

En el caso particular de una enzima exocelular, como es la estreptoquinasa SK, el paso siguiente, una vez obtenido el caldo clarificado libre de células, consistiría en la reducción del volumen, paso necesario para concentrar la actividad y facilitar las posteriores manipulaciones de la misma. La concentración puede ser llevada a cabo por procesos de precipitación fraccionada (Shih *y col.*, 1992) o mediante ultrafiltración (UF) (Dumon y Barnier, 1992).

Con el fin de evaluar la importancia de los procesos de membrana en la recuperación de SK a partir de caldos de fermentación de estreptococos, hemos diseñado dos grupos de experimentos. En el primer grupo, utilizamos técnicas convencionales de centrifugación para clarificar y diferentes modalidades de precipitación (ácida, alcohólica, con polietilenglicol) para recuperar las proteínas exocelulares. Paralelamente, en un segundo grupo de experimentos, trabajamos en un módulo de filtración tangencial a alta velocidad con una membrana de microfiltración (MF) para eliminar la masa celular y otra de ultrafiltración (UF) para concentrar el producto (SK) presente en el caldo clarificado. Contrastando con las técnicas de filtración estándar (convencional) en las cuales la solución es presentada perpendicularmente a la superficie de la membrana, durante los procesos de filtración tangencial, la solución es bombeada paralelamente a la superficie de la membrana evitándose, de esta forma, el depósito masivo de materiales sobre la misma (Kroner *y col.*, 1984).

En todos los casos se determinó el balance global para la recuperación de actividad SK lo que nos permitió llevar a cabo la comparación de los procedimientos utilizados.

2.1. Técnicas convencionales: centrifugación-precipitación.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para la recuperación de SK por centrifugación y precipitación con los agentes: ácido clorhídrico, etanol y polietilenglicol (PEG-6.000).

Tabla 3. Recuperación de SK a partir de caldos de fermentación de estreptococos por centrifugación y prercipitación con diferentes agentes.

	USK ml ⁻¹	USK	%
Caldo de fermentación	3.882 ± 248	2.079.844 ± 287.934	100
Caldo centrifugado	3.134 ± 214	1.648.618 ± 225.083	79,29 ± 1,07
Precipitado con HCl	19.212 ± 1.269	1.067.599 ± 129.975	52,30 ± 1,84
Precipitado con etanol	28.045 ± 2.102	1.634.014 ± 320.234	75,50 ± 0,71
Precipitado con PEG-6000	25.587 ± 3.176	1.387.065 ± 234.923	66,90 ± 1,70

USK unidades de actividad SK.

La centrifugación convencional en continuo realizada a escala de laboratorio con volúmenes medios de 5 litros, supone pérdidas de actividad del 20,71 ± 1,09%, probablemente relacionadas con la formación de aerosoles y espumas que conducen a la desactivación de las enzimas (Wang, 1983; Viehweg y Shuegerl, 1983). Trasladando la problemática a niveles industriales, la única modalidad de centrifugación compatible con

los volúmenes de trabajo (10.000-50.000 litros) sería la centrifugación en continuo a alta velocidad, puesto que permite llevar a cabo el proceso en tiempos relativamente cortos y con un número moderado de supercentrífugas, hechos que se traducen en la reducción de los costos globales de operación. Sin embargo, la centrifugación en supercentrífugas, además de los problemas asociados a la formación de aerosoles y espumas, presenta otros inconvenientes como consecuencia de las grandes velocidades a las que opera (16.000-20.000 g) las cuales originan un efecto fuerte de cizalla sobre las células y las enzimas (Rosen, 1984). Este efecto en las células produce la rotura, aumentando en el sobrenadante los niveles de elementos intracelulares contaminantes (proteínas y ácidos nucleicos fundamentalmente), y en las enzimas conlleva importantes pérdidas por desactivación que en el caso de la SK pueden suponer hasta un 30% (comunicación personal de Cyanamic Ibérica, S.A., 1995).

Durante las etapas de precipitación, los pHs bajos entre 2-2,5 parecen tener un efecto drástico sobre la actividad SK provocando pérdidas del $47,73 \pm 1,84\%$, mientras que el etanol afecta en menor grado, con pérdidas del $24,5 \pm 0,71\%$. Estos valores se encuentran dentro del rango descrito para la recuperación de enzimas altamente sensibles a la acción de agentes precipitantes que pueden conducir a desnaturalización, como sales inorgánicas, ácidos o alcoholes. Así, Bernard y colaboradores (1995) al evaluar la precipitación de lisozima con ácidos grasos, obtienen pérdidas del orden del 27%. Para la precipitación con etanol, Hao y colaboradores (1980) comentan la dificultad de obtener enzimas en sus formas nativas en las fracciones precipitadas, pero desconocen los mecanismos por los cuales el etanol induce agregación y precipitación de proteínas.

En relación al PEG, a pesar de las ventajas que presenta como agente precipitante: no es tóxico (Curling, 1980), actúa como estabilizante de proteínas (Maron y Filisku, 1972) y posee un calor de solución muy bajo, prácticamente nulo, lo que permite trabajar a temperatura ambiente (Chun y col., 1967), origina pérdidas de hasta el $33,13 \pm 1,70\%$, superiores incluso a las encontradas con etanol. Atha y Ingham (1981) han sugerido que el mecanismo por el cual el PEG induce precipitación es la exclusión estérica de las

proteínas de las regiones ocupadas por el polímero, las cuales se concentran hasta superar los niveles de solubilidad y precipitan. Esta explicación excluye la posibilidad de interacciones químicas específicas entre proteína y polímero, pero no descarta que se estén produciendo interacciones proteína-proteína que puedan inducir desnaturalización. Por otra parte, dichos autores trabajaron con proteínas purificadas sin que sus resultados puedan extrapolarse directamente a mezclas complejas de material proteico, como por ejemplo los caldos de fermentación.

El patrón de proteínas presente en los distintos precipitados y en el caldo clarificado de partida fue seguido por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) (figura 18), sin que se observen diferencias importantes que puedan significar la precipitación selectiva de proteínas.

2.2. Procesos de membrana: microfiltración-ultrafiltración.

La característica que define la capacidad de fraccionamiento de una membrana es el tamaño de las partículas a separar en relación a la distribución de tamaño de poro de la membrana (Cheryan y Mehaia, 1985). En este sentido, y teniendo en cuenta el tamaño de las células estreptococales ($\approx 1 \mu\text{m}$), hemos utilizado una membrana de MF de $0,3 \mu\text{m}$ para separar las proteínas solubles presentes en el caldo de las células y otros componentes insolubles. Este procedimiento que retiene la biomasa (células) permitiendo que las proteínas y enzimas pasen a través de la membrana, origina una solución totalmente transparente a partir de la cual, por UF mediante una membrana de 10 kilodaltones (kDa) (retiene las moléculas de peso molecular superior a 10 kDa), procedimos a reducir el volumen 8 veces (FCV = 8,0) concentrando así la actividad SK (47 kDa) objeto de nuestro trabajo.

Las variables de operación en el módulo de filtración tangencial (ver apartado 2.5 del Procedimiento Experimental) fueron elegidas con miras a obtener una presión

transmembrana inicial aproximada de 60 kilipascales (kPa) y minimizar el calentamiento del sistema.

Los resultados obtenidos en relación a la recuperación de actividad SK por procesos de membrana se presentan en la tabla 4. Durante la etapa de MF, contrariamente a lo esperado según el tamaño de poro de la membrana ($0,3 \mu\text{m}$) frente al tamaño de la enzima (47 kDa), la actividad SK en el permeado es $1,68 \pm 0,35$ veces menor que en el caldo de fermentación original, recuperándose el $53,23 \pm 7,9\%$ de la actividad en el permeado y permaneciendo el $35,04 \pm 3,99\%$ de la misma en el retenido. El balance de recuperación en este punto del proceso supone una pérdida de actividad SK de $12,77 \pm 5,08\%$.

Tabla 4. Recuperación de SK a partir de caldos de fermentación de estreptococos por procesos de membrana, MF y UF.

	USK·ml ⁻¹	USK	%
Caldo de fermentación	1.154 ± 375	$5.540.688 \pm 1.801.527$	100
Permeado $0,3 \mu\text{m}$	679 ± 82	$2.851.464 \pm 343.493$	$53,23 \pm 7,90$
Retenido $0,3 \mu\text{m}$	3.152 ± 536	$1.890.972 \pm 321.575$	$35,04 \pm 3,99$
Retenido 10 kDa	7.040 ± 141	$4.224.000 \pm 84.853$	$80,55 \pm 6,25$

USK unidades de actividad SK.

La concentración de actividad en el retenido puede explicarse considerando los dos fenómenos que limitan el transporte en un proceso de MF, la "**polarización de la concentración**" (Nagata y col., 1989; Opong y Zydney, 1991) y el "**ensuciamiento**" de la membrana (Kawakatsu y col., 1993; Parnham y col., 1995). El primero de ellos hace referencia al progresivo y reversible intercambio de moléculas entre la superficie de la membrana y la solución, y el segundo, involucra todos los mecanismos que suponen interacción de solutos con la membrana tanto con su superficie, como con el interior de sus

poros. Ambos fenómenos, descritos de manera similar en procesos de UF (Miller *y col.*, 1993; Ding *y col.*, 1993), pueden suponer una acumulación de material tal, que disminuya considerablemente el tamaño de poro efectivo de una membrana. El coeficiente de transmisión para la SK, calculado a partir de la expresión $S = 1 - R = C_{perm} / C_{caldo}$ (Quirk y Woodrow, 1984), es de 0,6, lo cual significa una retención importante del producto por la membrana de MF (van Reis *y col.*, 1991).

En cuanto a la pérdida de actividad SK durante la MF, podría ser causada bien por interacción o adsorción de la enzima a la membrana (Bowen y Gan, 1991), o por desnaturalización debida al efecto de las fuerzas de cizalla que actúan sobre la enzima a lo largo del proceso (Bowen y Gan, 1992).

Los resultados mostrados en la tabla 4 reflejan que la pérdida de actividad SK durante la etapa de UF continúa siendo evidente, aunque menor respecto a la observada durante la MF, originando una pérdida global para el proceso de recuperación del $19,45 \pm 6,25\%$.

Algunos autores (Meirelles *y col.*, 1991; Dumon y Barnier, 1992; Ko *y col.*, 1993; Chen *y col.*, 1995) han descrito pérdidas de actividad y alteraciones de proteínas en procesos de UF atribuyéndolas a efectos de adsorción y de fuerzas de cizalla análogos a los comentados anteriormente para los procesos de MF. Dado que en ningún caso hemos detectado actividad enzimática en las muestras de permeado, la pérdida de actividad SK en la etapa de UF podría ser debida a las interacciones de la enzima con la membrana de UF y a los mecanismos de desnaturalización de la enzima.

Al comparar los rendimientos obtenidos para la recuperación de actividad SK en los dos abordajes experimentales tratados (ver tablas 3 y 4), se establece que los procesos de membrana presentan ventajas respecto a los procedimientos convencionales de centrifugación-precipitación con recuperaciones globales superiores, del orden del 80%,

salvo en el caso de la centrifugación-precipitación con etanol cuyos resultados son prácticamente similares. Este rendimiento promedio sería aún más ventajoso, si nos trasladamos a una escala industrial, donde las pérdidas en la primera etapa de eliminación de cuerpos celulares por centrifugación pueden ser muy considerables.

Otras ventajas adicionales de la utilización de membranas (Cuperus y Nijhuis, 1993), como fraccionamiento directo sin pretratamiento del caldo de fermentación, posibilidad de trabajar a temperatura ambiente sin grandes daños térmicos en los productos (una vez establecidas las condiciones idóneas de trabajo) y consumo muy moderado de energía (únicamente la necesaria para presurizar la solución por medio de la bomba), hacen que esta tecnología sea muy atractiva para cosechar y separar células, y para recuperar enzimas tras procesos de fermentación. No obstante, no parece estar exenta de problemas (Hernández-Pinzón y Bautista, 1992) y determinados fenómenos, aún poco estudiados y conocidos, relacionados con las interacciones membrana-solución limitan su efectividad.

En los sucesivos apartados de este trabajo, nos hemos centrado en la etapa de MF estudiando algunos aspectos de los fenómenos implicados en el proceso y las consecuencias moleculares, fundamentalmente en lo referente a la desnaturalización de la SK y su interpretación en base a la relación estructura/función.

3. Microfiltración tangencial a alta velocidad.

Durante la recuperación de estreptoquinasa (SK) por microfiltración tangencial a alta velocidad (MFTAV), como hemos indicado antes y contrariamente a lo esperado, la actividad en el permeado al final del proceso es aproximadamente dos veces más baja que la actividad en el caldo de fermentación de partida, concentrándose parte de la misma en el retenido (ver tabla 4).

Además de la transmisión del producto a través de la membrana de microfiltración (MF), otros parámetros del proceso tales como la permeabilidad de la membrana, la presión transmembrana en el sistema y la calidad de la SK recuperada, pueden también estar afectados.

3.1. Permeabilidad de la membrana a lo largo del proceso de MFTAV.

La permeabilidad del caldo de fermentación a través de la membrana va disminuyendo a medida que transcurre la MF (figura 19). El flujo del permeado inicial, $26,9 \pm 0,35 \text{ l}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, experimenta una caída rápida al comienzo del proceso seguida de un descenso mucho más lento y moderado que continúa hasta el final del mismo, alcanzándose un valor de $18,5 \pm 0,99 \text{ l}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$; en paralelo, la presión transmembrana del sistema va aumentando a lo largo del proceso. No hemos observado, sin embargo, cambios de permeabilidad del agua pura a través de la membrana de MF en las mismas condiciones de trabajo.

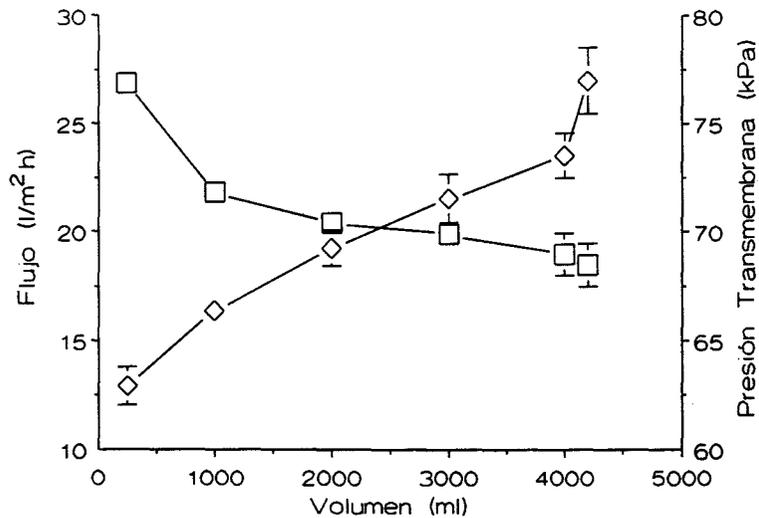


Figura 19. Variación del flujo del permeado (□) y la presión transmembrana (◇) en función del volumen de caldo de fermentación procesado a través de la membrana durante el proceso de MFTAV.

El flujo del permeado en procesos de MFTAV a partir de caldos de fermentación puede estar influenciado por la concentración y naturaleza de los distintos componentes presentes en el caldo, incluidas células, proteínas y demás solutos procedentes del medio de cultivo (Nagata *y col.*, 1989; Tanaka *y col.*, 1993; Shimizu *y col.*, 1993, 1994). A medida que transcurre la MF se va formando una película de materiales retenidos sobre la superficie de la membrana. Esta acumulación tiende a ser removida por la diferencia de concentración en la interfase membrana-solución, la cual origina un intercambio de partículas entre ambas fases (membrana y solución) que será continuo hasta que las concentraciones se igualen, y por la velocidad tangencial de la solución que barre materiales fuera del depósito. El fenómeno se conoce como "polarización de la concentración" (Bowen, 1993) y depende de la naturaleza y concentración de los solutos presentes en la solución. Como consecuencia de la "**polarización de la concentración**",

el flujo del permeado disminuye al aumentar la resistencia al transporte y la presión osmótica dentro del sistema (Opong y Zydney, 1991).

Utilizando caldos de *Bacillus polymyxa*, Nagata y colaboradores (1989) han observado la disminución del coeficiente de permeabilidad de la membrana de MF al aumentar la concentración de células en el tanque de alimentación. Asimismo, Tanaka y colaboradores (1992) han sugerido que aproximadamente una décima parte del descenso del flujo del permeado observado durante la MFTAV de suspensiones de levaduras, está causado por la presencia de partículas muy finas procedentes del medio de cultivo que se depositan sobre la superficie de la membrana formando parte de la capa de polarización. Las pérdidas de permeabilidad descritas por los autores anteriores alcanzan niveles del orden de un 70%, partiendo de valores elevados de flujo del permeado. Esta discrepancia respecto a nuestros resultados, disminución del de flujo del permeado alrededor de un 31%, puede explicarse considerando que estamos trabajando con membranas "viejas", probablemente alteradas de forma irreversible debido al uso continuado (Scott, 1988), en un intento de simular condiciones industriales que suponen la reutilización de las membranas durante periodos largos de operación (25-50 veces).

El "**ensuciamiento**" de la membrana causado por la adsorción o interacción con los solutos presentes en la solución (Bowen, 1993), es otro fenómeno que puede modificar las propiedades filtrantes de la membrana, disminuyendo el flujo del permeado (Boyaval y col., 1996) y aumentando la retención de productos a lo largo del proceso de MF (Parnham y Davis, 1995). La magnitud del "ensuciamiento" está determinada por una serie de factores que controlan la adsorción y deposición de materiales en la membrana: la naturaleza físico-química tanto de la membrana, como de las moléculas implicadas (proteínas, desechos celulares y otros componentes del medio), y las condiciones de pH y fuerza iónica utilizadas.

Concretamente, la influencia del pH sobre la cantidad de proteína adsorbida a membranas de MF ha sido estudiada por Bowen y Gan (1991), quienes establecieron que

la adsorción aumenta con el pH, alcanzando un máximo para el valor de pH que coincide con el punto isoeléctrico (pI) de la solución; en nuestro caso (pI = 5,3), todos los experimentos han sido realizados a pH 7-7,5 evitando pHs alcalinos, dado que para valores de pH \gt 8 la SK es inestable con pérdidas de actividad importantes (Bautista y Blanco, 1985).

Por último, el comportamiento, disminución, del flujo del permeado que hemos observado puede haber sido afectado por varios parámetros de operación tales como la temperatura, la presión transmembrana y la velocidad de recirculación, relacionados directamente con los fenómenos de "polarización de la concentración" y "ensuciamiento" de la membrana. En primer lugar, el flujo del permeado se incrementa con la temperatura debido a que aumenta la solubilidad del depósito acumulado sobre la membrana (Kroner y col., 1984; Sanchez y Gekas, 1992); también en nuestro caso, para evitar los problemas de desnaturalización de la SK por efecto de la temperatura (Brockway y Castellino, 1974), los experimentos han sido llevados a cabo a 25°C. En segundo lugar, aunque el flujo del permeado inicial aumenta con los valores de presión transmembrana y velocidad de recirculación, al mismo tiempo, se favorece tanto la "polarización de la concentración" como el "ensuciamiento" de la membrana (Tanaka y col., 1992; Shimizu y col., 1993, 1994).

La "**polarización de la concentración**" y el "**ensuciamiento**" de la membrana son los dos fenómenos que pueden estar limitando el transporte a través de la membrana y por tanto, el tiempo efectivo del proceso de MF. El primero de ellos ha sido definido como un fenómeno reversible que domina durante la mayor parte del proceso de MF, controlando el flujo del permeado y las fuerzas de cizalla presentes en el sistema; mientras que el segundo ha sido considerado como un fenómeno irreversible o parcialmente reversible que predomina en los primeros tiempos de la MF, cuando la membrana experimenta los primeros contactos con la solución, siendo responsable de la caída del flujo del permeado al inicio del proceso (Boyaral y col., 1996).

3.2. Influencia de la interacción/adsorción de las proteínas con la membrana de MF.

Con el fin de evaluar la influencia directa de la interacción/adsorción de las proteínas sobre la pérdida de flujo observada a lo largo de la MFTAV, recirculamos a través de la membrana de MF (0,3 μm) distintas diluciones del caldo de fermentación durante 2 horas y en las mismas condiciones de presión transmembrana (63 kilopascales, kPa) y velocidad de recirculación ($3\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$) utilizadas en el proceso de MF. El procedimiento de recirculación en tales condiciones fue preferido a la inmersión estática de la membrana en la solución (Chen *y col.*, 1995) y a la recirculación en baja presión (Bowen y Gan, 1991) dado nuestro interés en reproducir el comportamiento adsorptivo de las proteínas durante la MFTAV. Los resultados han sido expresados en miligramos de proteína por metro cuadrado de superficie de membrana.

La figura 20A muestra un perfil de interacción/adsorción representativo para cada una de las diferentes concentraciones de proteína ensayadas ($0,2\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$; $0,5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ y $1,0\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). Se observa un periodo inicial de interacción/adsorción rápida seguido de una etapa de interacción/adsorción mucho más lenta hasta que se alcanza el nivel de saturación (equilibrio) después de unos 30 minutos de exposición. Las isothermas de interacción/adsorción dependen de la cantidad de proteína presente en la solución de partida: al aumentar la concentración de proteína aumenta proporcionalmente la cantidad de proteína que interactúa con la membrana.

Si la interacción/adsorción de las proteínas tiene lugar sobre la superficie de la membrana es probable que esté siendo afectada por las células presentes en el caldo de fermentación, las cuales pueden contribuir al fenómeno de "polarización de la concentración" (Nagata *y col.*, 1989). Para comprobar esta idea, recirculamos a través de la membrana de MF (0,3 μm) caldo de fermentación centrifugado en las mismas condiciones y cantidades de proteína. En relación al caldo de fermentación sin centrifugar, la evolución de las isothermas de interacción/adsorción para el caldo centrifugado (figura

20B) muestra una dependencia similar de la concentración de proteína de partida; sin embargo, los niveles de interacción/adsorción alcanzados tras la saturación son ligeramente pero significativamente superiores, excepto para la concentración de proteína más baja ($0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) cuya diferencia no es significativa (tabla 5). Este comportamiento sugiere que la interacción/adsorción de las proteínas sea extensible al interior de los poros de la membrana. En este sentido, las células pueden estar bloqueando la entrada de los poros y, como consecuencia, disminuyendo la interacción/adsorción de las proteínas con la membrana.

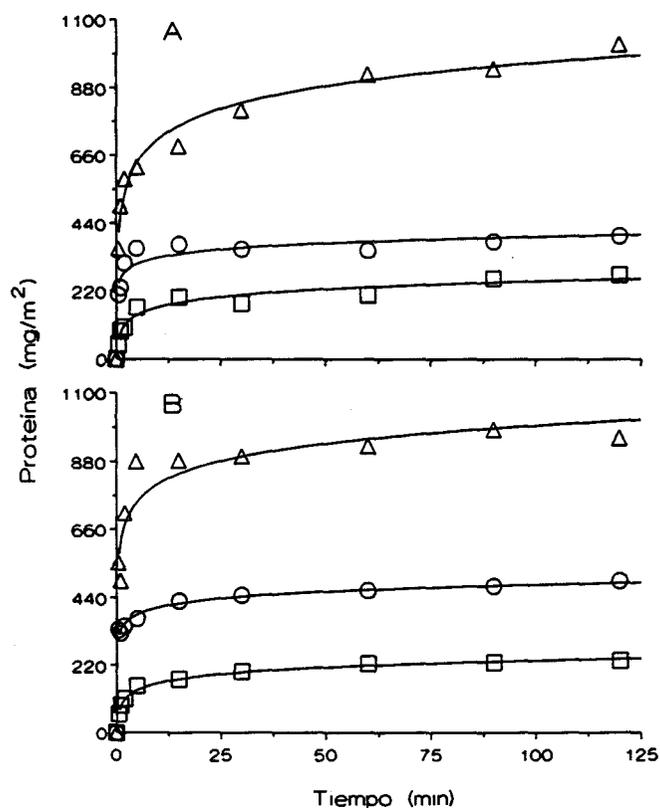


Figura 20. Isothermas de interacción/adsorción de proteínas con la membrana de $0,3 \mu\text{m}$ de tamaño de poro, en presencia (A) y ausencia (B) de células, para diferentes concentraciones de proteína en el caldo de fermentación: $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (□); $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (○) y $1,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Δ).

Tabla 5. Cantidad de proteína que interactúa con la membrana de 0,3 μm de tamaño de poro, una vez alcanzado el equilibrio, para diferentes concentraciones de proteína en el caldo de fermentación.

	Concentración de proteína en el caldo de fermentación		
	0,2 g·l ⁻¹	0,5 g·l ⁻¹	1,0 g·l ⁻¹
Caldo sin centrifugar	239,4 ± 13,5	386,1 ± 32,0	871,9 ± 55,6
Caldo centrifugado	224,4 ± 23,0	451,0 ± 19,0*	978,1 ± 12,0*

Los resultados están expresados en miligramos de proteína por metro cuadrado de superficie de membrana ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$).

*Diferencias significativas con respecto al caldo de fermentación sin centrifugar ($P < 0,05$).

Por otra parte, cuando realizamos los experimentos con una membrana de la misma naturaleza química (polietersulfona) y superficie de filtración (0,07 m^2), pero de mayor tamaño de poro (0,8 μm), la cantidad de proteína que interactúa con la membrana una vez alcanzado el equilibrio es más baja respecto a la membrana de 0,3 μm para las tres concentraciones de proteína ensayadas (tabla 6), aunque los perfiles de interacción/adsorción (figura 21) sean similares.

Tabla 6. Cantidad de proteína que interactúa con la membrana de 0,8 μm de tamaño de poro, una vez alcanzado el equilibrio, para diferentes concentraciones de proteína en el caldo de fermentación.

	Concentración de proteína en el caldo de fermentación		
	0,2 g·l ⁻¹	0,5 g·l ⁻¹	1,0 g·l ⁻¹
Caldo sin centrifugar	160,4 ± 3,8	280,5 ± 25,2	692,7 ± 32,1
Caldo centrifugado	153,6 ± 10,2	384,9 ± 43,7*	753,3 ± 10,2*

Los resultados están expresados en miligramos de proteína por metro cuadrado de superficie de membrana ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$).

*Diferencias significativas con respecto al caldo de fermentación sin centrifugar ($P < 0,05$).

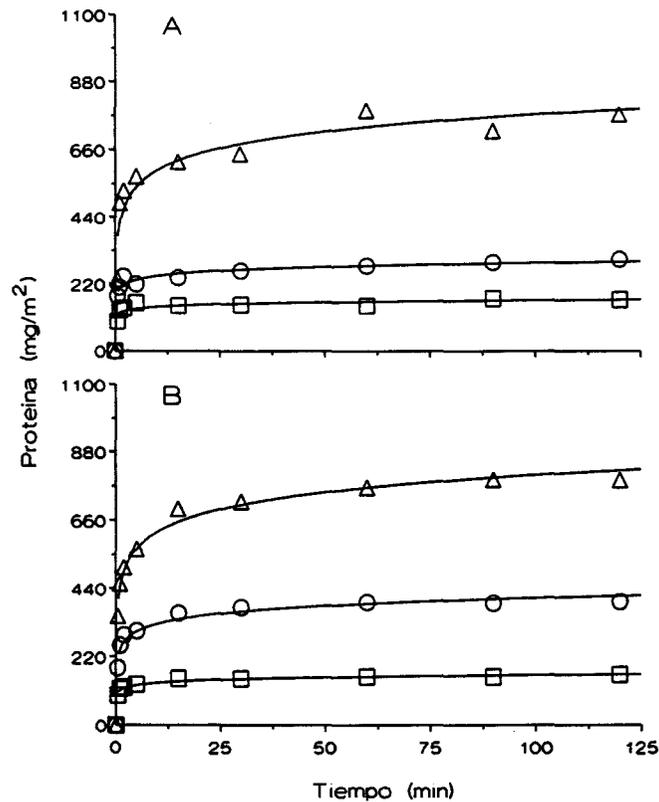


Figura 21. Isotermas de interacción/adsorción de proteínas con la membrana de $0,8 \mu\text{m}$ de tamaño de poro, en presencia (A) y ausencia (B) de células, para diferentes concentraciones de proteína en el caldo de fermentación: $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (\square); $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (\circ) y $1,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Δ).

Los resultados muestran que la interacción/adsorción de las proteínas con la membrana de MF disminuye al aumentar el tamaño de poro y aumenta con la concentración de proteína de partida, estando desfavorecida por la presencia de células en el caldo de fermentación. Todo ello nos ha llevado a considerar que las proteínas estén interactuando no sólo con la superficie de la membrana sino también con la estructura interna de los poros, tal como ha sido encontrado por Persson y colaboradores (1993) para la interacción/adsorción de β -lactoglobulina a membranas de polivinildifluoruro (PVDF).

La naturaleza química de la membrana es otro factor determinante de la cantidad de proteína que interactúa con la misma. Chen y colaboradores (1995) han comunicado niveles de interacción/adsorción superiores a nuestros datos, en el rango de 300-900 mg·m², para membranas de polisulfona en contacto con seroalbúmina bovina al 0,1%. Esta diferencia numérica puede explicarse teniendo en cuenta las características especiales de adsorción que presenta la seroalbúmina debido a su función biológica. Por otro lado, los autores mencionados trabajaron con membranas "nuevas" de ultrafiltración (UF) con un tamaño de poro considerablemente más pequeño (100 kilodaltones, kDa) y una estructura interna menos tortuosa que las membranas de MF, circunstancias que favorecen la interacción/adsorción de proteínas (Ko *y col.*, 1993).

Una forma de evaluar el efecto de la interacción/adsorción de las proteínas sobre las características hidrodinámicas de la membrana es comparando el flujo de agua pura antes y después del equilibrio de interacción/adsorción, una vez que se ha eliminado el material depositado sobre la membrana mediante el lavado previo con agua. La figura 22 muestra los resultados obtenidos para la membrana de 0,3 μm, expresados como permeabilidad residual (%) al agua pura en función de la concentración de proteína presente en las distintas diluciones del caldo de fermentación. La pérdida de permeabilidad máxima es del orden del 25%, lo cual indica que la pérdida global de permeabilidad del caldo de fermentación observada durante la MFTAV, sea debida mayormente a la interacción/adsorción de las proteínas con la superficie y con las paredes de los poros de la membrana; y de aquí, la contribución adicional del fenómeno de "polarización de la concentración" explicaría el descenso continuo del flujo del permeado a lo largo del proceso (ver figura 19).

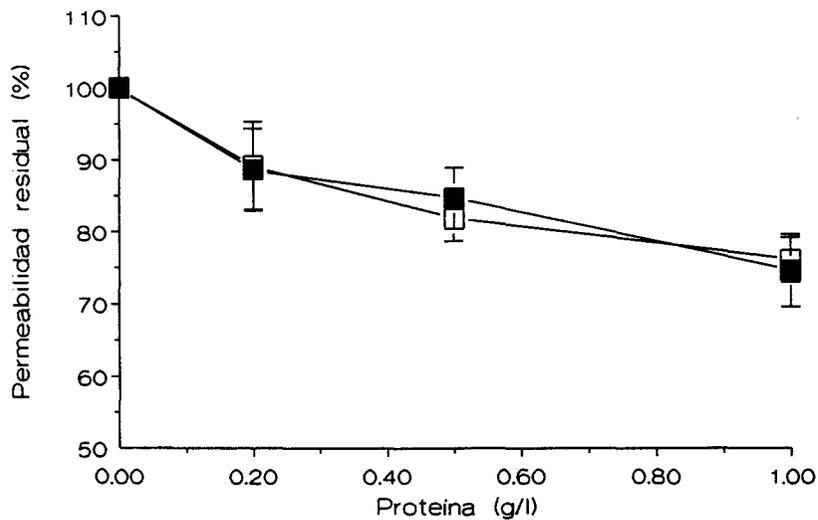


Figura 22. Permeabilidad residual al agua pura de la membrana de 0,3 μm , después de la interacción/adsorción de proteínas, en función de la concentración de proteína en el caldo de fermentación sin centrifugar (■) y centrifugado (□).

La ley de bloqueo estándar de filtración, descrita por Hermia (1982) para explicar la colmatación de filtros y membranas por partículas finas, ha sido aplicada a la MF de seroalbúmina bovina y alcohol deshidrogenasa a través de membranas de óxido de aluminio de 0,22 μm de tamaño de poro (Bowen y Gan, 1991, 1992). El modelo establece que, a lo largo del proceso, se produce una reducción del volumen libre de los poros de la membrana por deposición de moléculas sobre sus paredes. El volumen de poro desciende proporcionalmente al volumen de solución que ha atravesado la membrana. Esta última es considerada como un conjunto de poros con diámetro y longitud uniformes, de forma que el descenso del volumen de los poro coincide con el descenso de la sección transversal de los mismos.

El modelo de bloqueo estándar de filtración conduce a una expresión que predice una relación lineal entre la inversa del volumen de permeado ($1/V$) y la inversa del tiempo de filtración ($1/T$) (Bowen y Gan, 1991):

$$1/V = 1/Q_0 T + C/LA_0 \quad (7)$$

donde Q_0 es la velocidad de filtración inicial, C es el volumen de proteína depositada por unidad de volumen de permeado, L es la longitud de los poro y A_0 es la sección transversal de poro inicial. En la figura 23 se representan los valores medios de $1/V$ frente a los de $1/T$ para nuestros experimentos, observándose un ajuste con un coeficiente de regresión lineal $r = 0,999$.

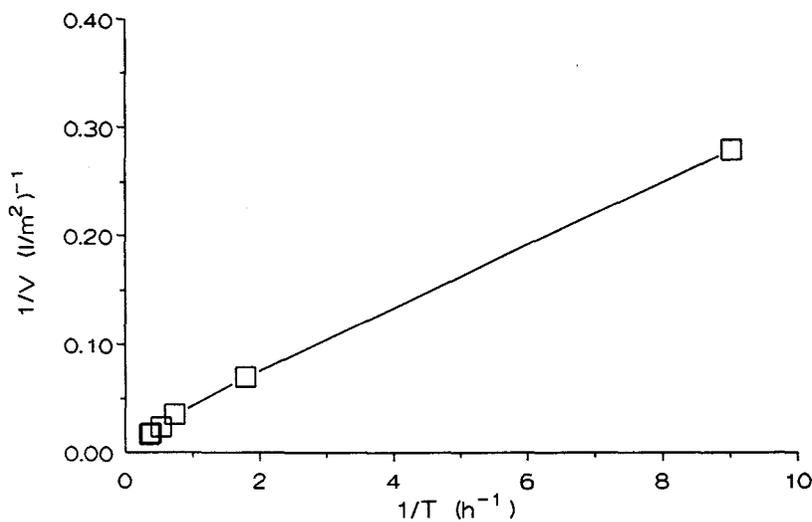


Figura 23. Permeabilidad del caldo de fermentación a través de la membrana de $0,3 \mu m$ de tamaño de poro durante el proceso de MFTAV. Los datos están representados de acuerdo a la ecuación (7).

A partir de estos resultados, establecemos que el modelo de **bloqueo estándar de filtración** supone una aproximación buena para explicar la disminución del flujo del

permeado observada durante la MFTAV a partir de caldos de fermentación de estreptococos. Adaptaciones similares a este modelo en procesos de MF utilizando caldos de fermentación han sido encontradas por Blanpain y colaboradores (1993).

La permeabilidad de las membranas de MF, caracterizadas como membranas simétricas de porosidad elevada, está determinada fundamentalmente por un número reducido de poros grandes (Persson *y col.*, 1993b). El bloqueo de estos poros debido a la deposición de materiales en sus paredes producirá alteraciones en la capacidad de filtración de la membrana. Dado el tamaño de poro de las membranas de MF (0,1-10 μm), es difícil que los monómeros individuales de proteína sean la causa de tal efecto, a diferencia de lo que ocurre en membranas de UF (Kawakatsu *y col.*, 1993) cuyos poros son significativamente más pequeños (0,5 nm-0,1 μm) y la porosidad de las membranas bastante más baja. Sin embargo, los agregados de proteínas, de mayor tamaño que los monómeros individuales, presentes en la solución podrían estar bloqueando algunos de los poros grandes importantes para el flujo de líquido a través de la membrana. Así pues, junto al depósito acumulativo de proteínas en los poros, la presencia de agregados de proteínas puede contribuir a la pérdida de flujo durante los procesos de MF.

3.3. Evaluación del rendimiento del proceso de MFTAV.

La utilización de caldos de fermentación, provistos de proteínas con actividad enzimática, para estudiar la MFTAV permite hacer un balance promedio del proceso no sólo a nivel de proteína sino también a nivel de actividad.

Los resultados obtenidos para la recuperación de actividad SK y proteína a lo largo del proceso de MFTAV aparecen en la tabla 7. En el permeado la actividad SK se mantiene alrededor de 1,7 veces más baja que la presente en el caldo de fermentación original, mientras que en el retenido la actividad SK se va concentrando a medida que transcurre el proceso. Cuando el volumen de partida se ha concentrado 8 veces (FCV = 8,0), la actividad

SK en el retenido es $2,81 \pm 0,45$ veces más alta que la actividad SK en el caldo de fermentación. Tales hechos han sido corroborados analizando la actividad específica de la enzima ($USK \cdot mg^{-1}$) en las muestras de permeado y retenido durante el transcurso del proceso (figura 24).

Tabla 7. Recuperación de actividad SK y proteína durante el proceso de MFTAV a partir de caldos de fermentación de estreptococos.

	FCV	Volumen		Actividad SK		Proteína	
		ml	SK $\cdot ml^{-1}$	%	mg ml^{-1}	%	
Caldo de fermentación	1,00	4.800	1.154 ± 375	100	$10,3 \pm 1,8$	100	
Permeado	1,05	250	698 ± 55	$3,28 \pm 0,82$	$9,0 \pm 1,6$	$4,58 \pm 0,35$	
Retenido		4.550	1.154 ± 375	$94,79 \pm 0,01$	$10,4 \pm 1,6$	$96,29 \pm 6,16$	
Permeado	1,30	1.000	660 ± 109	$12,24 \pm 2,02$	$9,8 \pm 1,4$	$19,28 \pm 0,94$	
Retenido		3.800	1.135 ± 402	$77,47 \pm 2,41$	$10,5 \pm 1,5$	$80,01 \pm 3,51$	
Permeado	1,70	2.000	556 ± 17	$21,10 \pm 6,26$	$9,9 \pm 1,7$	$38,70 \pm 1,17$	
Retenido		2.800	1.193 ± 321	$60,84 \pm 3,55$	$10,6 \pm 1,7$	$60,15 \pm 2,23$	
Permeado	2,70	3.000	556 ± 17	$35,36 \pm 4,14$	$9,6 \pm 1,2$	$58,74 \pm 3,38$	
Retenido		1.800	1.269 ± 213	$41,34 \pm 8,26$	$11,3 \pm 1,8$	$41,23 \pm 1,25$	
Permeado	6,00	4.000	660 ± 109	$43,98 \pm 15,06$	$9,7 \pm 1,4$	$78,93 \pm 4,40$	
Retenido		800	2.788 ± 454	$41,37 \pm 6,90$	$14,1 \pm 4,0$	$22,45 \pm 2,52$	
Permeado	8,00	4.200	679 ± 82	$53,28 \pm 7,90$	$9,7 \pm 1,5$	$84,23 \pm 2,24$	
Retenido		600	3.152 ± 536	$35,04 \pm 3,99$	$16,0 \pm 4,7$	$20,87 \pm 2,32$	

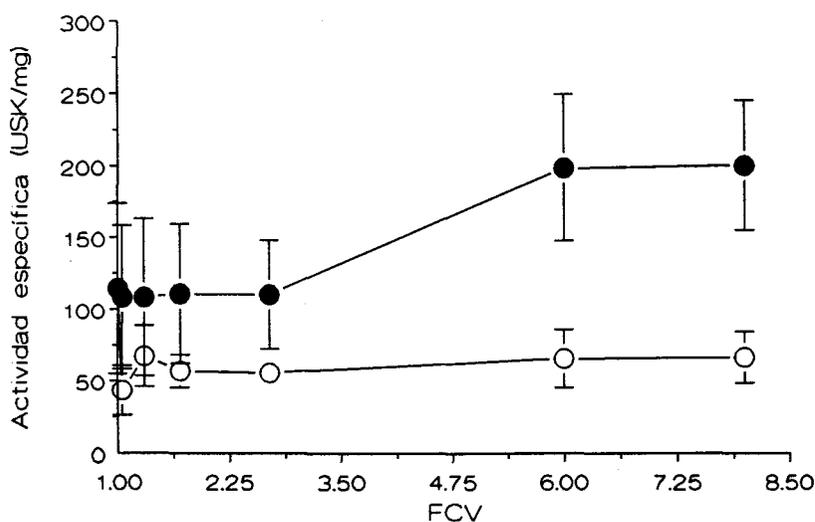


Figura 24. Actividad específica en el permeado (○) y en el retenido (●) a diferentes FCV durante el proceso de MFTAV.

Los resultados están indicando que la SK (47 kDa), aunque es mucho más pequeña que los poros de la membrana de MF (0,3 μm), está siendo retenida por esta última como si se tratase de una membrana de UF. El coeficiente de transmisión de la enzima a través de la membrana (S), medido como la razón entre la actividad SK en el permeado y en el caldo de fermentación original para un tiempo dado de filtración (Quirk y Woodrow, 1984), tiende a un valor de 0,6 durante todo el proceso de MFTAV. Siguiendo a van Reis y colaboradores (1991), este valor del coeficiente de transmisión supone que la retención de SK por la membrana de MF es significativa ($S < 0,9$), permaneciendo una cantidad considerable de la enzima en el retenido. En tales condiciones y para procesos industriales de gran escala, dichos autores recomiendan un aumento de la superficie total de filtración que permita un flujo del permeado al menos tres veces superior al observado antes de que la retención del producto sea significativa ($S < 0,9$) correspondiéndose, en nuestro caso, con el flujo del permeado inicial.

La tendencia a la retención de SK, manifestada por un coeficiente de transmisión de la enzima inferior a la unidad ($S = 0,6$), podría atribuirse a la formación de depósitos de materiales sobre la superficie y en el interior de los poros de la membrana (Quirk y Woodrow, 1984; Heinemann *y col.*, 1988; Parnham y Davis, 1995). Dichos depósitos estarían modificando la capacidad original de separación que posee la membrana de MF en función del tamaño de sus poros (Bowen y Gan, 1991).

Valores similares del coeficiente de transmisión de proteínas han sido comunicados por Parnham y Davis (1995) durante la MFTAV de lisados bacterianos con membranas de PVDF de $0,2 \mu\text{m}$ de tamaño de poro. Estos autores encontraron que la transmisión de proteínas a través de la membrana es independiente de los parámetros operacionales de presión transmembrana y velocidad de recirculación, mientras que disminuye con el aumento de la concentración de sólidos en el lisado celular. La independencia de la presión transmembrana supone que la transmisión de proteínas a través de la membrana está controlada, más que por la propia membrana, por la resistencia del material que se ha depositado en la misma. Es decir, la **"polarización de la concentración"** y el **"ensuciamiento" de la membrana** son vistos como los fenómenos responsables del control y la limitación del paso de moléculas a través de la estructura microporosa.

Consideremos de nuevo el rendimiento de la recuperación de actividad SK a lo largo del proceso de MFTAV (ver tabla 7). Los resultados reflejados en la figura 25 como actividad residual (%) muestran que la pérdida de actividad SK es especialmente rápida y notable en los estados iniciales del proceso, alcanzando un valor del $18,0 \pm 9,0\%$ para un FCV de 1,7 veces. Posteriormente, las variaciones son menos acentuadas, si bien la actividad residual aumenta para los FCV de 6 y 8 veces; al final del proceso (FCV = 8,0), la pérdida de actividad SK ha descendido hasta un valor del $12,77 \pm 5,08\%$, recuperándose el $53,23 \pm 7,9\%$ en el permeado y permaneciendo el $35,04 \pm 3,99\%$ en el retenido.

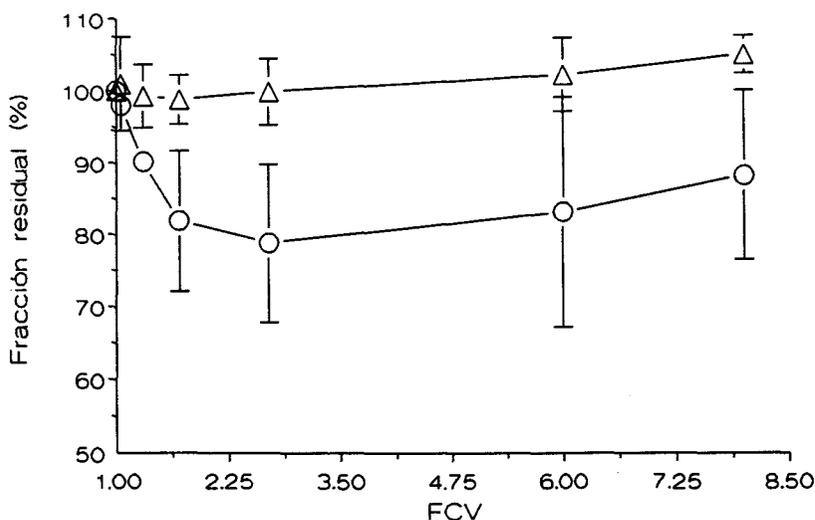


Figura 25. Fracción residual de actividad (○) y de proteína (Δ) durante el proceso de MFTAV. Los datos han sido determinados sumando las fracciones correspondientes desde el permeado y el retenido para cada FCV.

El efecto inicial, disminución, sobre la actividad SK de partida puede explicarse teniendo en cuenta que al comienzo de la MFTAV, cuando la membrana de MF experimenta los primeros contactos con el caldo de fermentación que se está procesando, las proteínas interactúan con la membrana (ver figura 19) depositándose y adsorbiéndose fundamentalmente en el interior de sus poros y, como consecuencia, tiene lugar la pérdida mayoritaria de permeabilidad del caldo de fermentación a través de la membrana (ver figura 20). Estos sucesos iniciales pueden evitar o, al menos, disminuir las posteriores interacciones de las proteínas con la membrana, las cuales han sido consideradas responsables de la desactivación de las enzimas (Bowen y Gan, 1992).

En cuanto al balance de proteína (ver tabla 7), los resultados reflejados también en la figura 25 como proteína residual (%), muestran que no se producen pérdidas importantes de cantidad de proteína durante la MFTAV, aumentando ligeramente la proteína residual

para los FCV de 6 y 8 veces. Asimismo, al final del proceso (FCV = 8,0), la cantidad de proteína en el retenido es $1,54 \pm 0,18$ veces mayor que en el caldo de fermentación original, poniéndose de manifiesto el efecto de retención por la membrana de MF.

El exceso de la cantidad de proteína para los FCV finales del proceso de MFTAV sugiere que se está produciendo la rotura de células liberándose moléculas de proteína a la solución. Entre estas moléculas, algunas de SK que no habían sido transportadas al medio exocelular explicarían el aumento de la actividad residual.

Resumiendo los resultados mostrados hasta el momento, podemos establecer que, durante la MFTAV para la recuperación de SK a partir de caldos de fermentación de estreptococos, las consecuencias de los fenómenos de "**polarización de la concentración**" y de "**ensuciamiento**" de la membrana son dobles. En primer lugar, disminuye el flujo del permeado, lo cual se traduce en un aumento del tiempo efectivo de operación. En segundo lugar, aumenta la selectividad de la membrana de MF favoreciéndose la retención del producto (SK), dando lugar a recuperaciones en el permeado muy bajas, indicativas de un proceso no eficiente.

3.4. Estudio de la concentración de proteínas por la membrana de MF.

El patrón de proteínas presente en el permeado y en el retenido a diferentes estados del proceso de MFTAV (FCV = 1,3; 2,7; 6,0 y 8,0) en comparación con las proteínas presentes en el caldo de fermentación original (FCV = 1,0), se ha seguido por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) (figura 26). Las bandas mayoritarias de proteína han sido numeradas según orden decreciente de pesos moleculares.

En la figura 26A se presenta la separación electroforética de las muestras de retenido. A medida que aumenta el FCV (carriles 3, 4 y 5) aumenta la intensidad de las

bandas sin que prácticamente se aprecien especies moleculares nuevas. El aumento de la intensidad de las bandas, que pone de manifiesto la concentración de las proteínas en el retenido a lo largo del proceso de MF, es general aunque diferente para todas las proteínas presentes en el caldo de fermentación original (carril 2). Este último muestra un número de bandas de proteína superior a 35, en un rango de peso molecular entre 10 y 120 kDa, de las cuales la banda número 18, una de las mayoritarias, ha sido identificada como la SK, proteína de una sola cadena polipeptídica de peso molecular 47 kDa (Taylor y Comp., 1978; Reddy, 1988).

Paralelamente, como puede verse en la figura 26B, la intensidad de las bandas en las muestras de permeado disminuye a medida que transcurre el proceso de MF. Para los FCV de 6 y 8 veces (carriles 5 y 6 respectivamente), las bandas de peso molecular más bajo (< 29 kDa) se detectan con mucha dificultad, probablemente debido a que tales proteínas pequeñas y péptidos hayan sido, en parte, eluidos del gel durante los procedimientos de tinción y lavados (Marshall y Williams, 1992), reduciéndose sus cantidades a niveles no detectables por la tinción utilizada (azul de Coomassie).

Observada la retención diferencial de proteínas por la membrana de MF, el siguiente objetivo de nuestro trabajo consistió en el estudio de los factores que pudieran estar condicionando el nivel de concentración específico para las distintas proteínas. Se evaluó inicialmente la influencia del tamaño molecular de la proteína, mediante la cuantificación por densitometría de la intensidad de la banda respectiva tras la separación por SDS-PAGE. Posteriormente, se determinó el efecto de la carga de la proteína, utilizando también para ello técnicas electroforéticas (isoelectroenfoque, IEF). El tamaño molecular y la carga neta de la proteína son dos características que pueden estar relacionadas con la retención por parte de la membrana. La primera, por la propia naturaleza del proceso de MF, el cual supone la separación de moléculas en función del tamaño— aunque las proteínas exocelulares del caldo de fermentación sean mucho más pequeñas que los poros de la membrana, la aproximación de nuestros resultados al modelo de bloqueo de los poros por deposición de proteínas en el interior de los mismos permite,

a priori, establecer una posible relación entre el tamaño molecular de las proteínas y la retención por la membrana de MF. La segunda, por las interacciones electrostáticas que puedan existir entre las proteínas y la superficie de la membrana impidiendo el paso libre de las moléculas a través de la membrana.

3.4.1. Influencia del tamaño molecular de la proteínas.

La figura 27 ilustra la cuantificación densitométrica de la intensidad de las bandas mayoritarias de proteína presentes en el retenido a diferentes FCV (1,0, 2,7, 6,0 y 8,0). El análisis cuantitativo implica el barrido y la determinación del ruido de fondo de las muestras, y la delimitación manual de las bandas de interés. Posteriormente, mediante soporte informático, se integra la densidad óptica para cada banda, se sustrae el valor de ruido de fondo y se obtiene el factor de concentración (FC) correspondiente (Parrado *y col.*, 1993). La distribución de los niveles de concentración es completamente irregular, apareciendo proteínas de casi similar peso molecular con valores de FC muy diferentes. Este efecto se mantiene a lo largo de todo el proceso de MFTAV siendo realmente evidente para los FCV altos, de 6 y 8 veces. A modo de ejemplos, podemos considerar las bandas 18 y 19 o las bandas 23 y 24 con valores de FC al final del proceso (FCV = 8,0) de $3,25 \pm 0,84$ y $6,08 \pm 0,13$ ó $4,18 \pm 0,39$ y $3,55 \pm 0,25$ respectivamente.

Respecto a la SK (banda número 18), el margen de error estimado entre el factor de concentración medido por densitometría (FC) y el determinado según la medida de actividad (ver tabla 6) es del orden de $\pm 20\%$ para todos los FCV analizados, probablemente debido a la diferencia de metodología. En el mejor de los casos y coincidiendo con el FCV de 8 veces, el valor de FC es $3,25 \pm 0,84$ frente al valor de concentración de actividad SK de $2,81 \pm 0,45$.

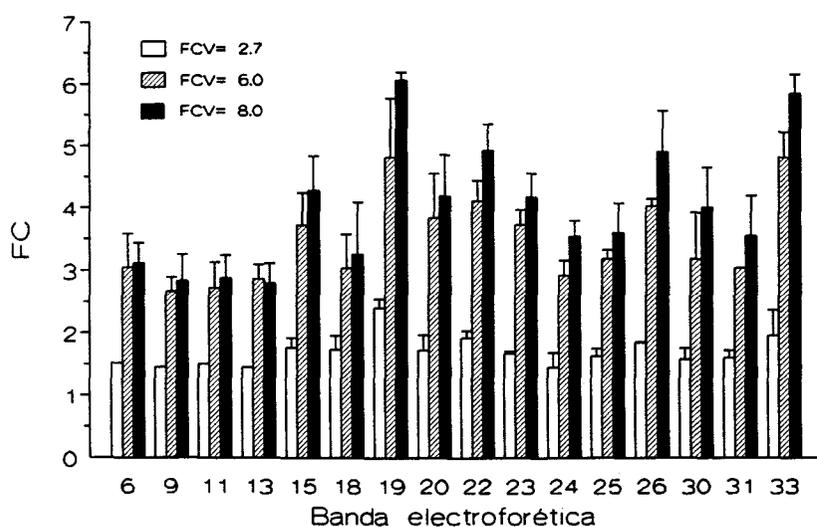


Figura 27. Cuantificación densitométrica de las bandas mayoritarias de proteína separadas por SDS-PAGE desde el retenido a diferentes FCV. Los resultados están expresados como factor de concentración (FC) con respecto a la intensidad de las bandas correspondientes en el caldo de fermentación.

Los resultados indican que la retención de proteínas por la membrana de MF no depende del tamaño molecular de las mismas. Por tanto, otros factores relacionados con las proteínas y/o con la superficie de la membrana estarán controlando el paso de las moléculas a través de los poros de la membrana.

3.4.2. Influencia de la carga neta de las proteínas.

Con el fin de conocer la contribución de la carga neta de las proteínas sobre el nivel de concentración observado en el retenido a lo largo de la MFTAV, se llevó a cabo una posterior separación electroforética sobre un gradiente de pH (IEF) (figura 28), a partir de la cual se determinó el punto isoelectrico (pI) de parejas de proteínas, electroeluidas desde bandas de diferente peso molecular pero con prácticamente el mismo valor de FC,

presentes en el retenido a un FCV de 8 veces. En la tabla 8 se resumen las bandas de proteína elegidas para este estudio, siguiendo la misma numeración indicada en la figura 26, y los datos de peso molecular y de FC para cada una de ellas medidos por SDS-PAGE y densitometría respectivamente. La variación en el valor de pI para las proteínas presentes en el caldo de fermentación (carril 2) y en el retenido a un FCV = 8,0 (carril 3) se incluye dentro de un rango estrecho de pH, entre 3,5 y 6,0, el cual está de acuerdo con el valor de pI (5,3) obtenido para el caldo de fermentación de estreptococos por Bautista y colaboradores (1986).

Dicho rango de variabilidad en el valor de pI indica dos cosas: por un lado, existe mucha proximidad en el valor de la carga neta entre las distintas proteínas presentes en el caldo de fermentación; por otro lado, al valor de pH en el cual estamos realizando nuestros experimentos (pH = 7,5), todas las proteínas estarán cargadas negativamente y, como consecuencia, todas estarán sujetas al mismo tipo de fuerza electrostática por parte de la membrana de MF, ya sea atractiva o repulsiva. En estas condiciones, las posibilidades de que la concentración diferencial de proteínas por la membrana de MF dependa de la carga neta de las proteínas, son mínimas.

Según puede observarse en la figura 28, parejas de proteínas con valores similares de FC, como por ejemplo las bandas 11 y 13 (carriles y), 18 y 25 (carriles y) ó 19 y 33 (carriles y), presentan distinto pI dentro del rango de variabilidad. Asimismo, proteínas con valores diferentes de FC , tales como las bandas 18 y 11 (carriles y) ó 20 y 33 (carriles y), presentan similar pI. Estos resultados demuestran que la concentración diferencial de proteínas por la membrana de MF tampoco depende directamente de la carga neta de las proteínas.

Tabla 8. Material proteico obtenido desde el retenido (FCV = 8,0) para la determinación de puntos isoeléctricos. Las bandas de proteína han sido elegidas a partir de geles de SDS-PAGE una vez cuantificadas por densitometría.

Banda	Peso molecular ^a	Factor de concentración ^b
n°	Da	FC
11	62.312	2,88 ± 0,36
13	55.060	2,80 ± 0,32
15	50.180	4,28 ± 0,56
20	34.699	4,20 ± 0,67
18	46.535	3,25 ± 0,84
25	<i>n. d.</i>	3,60 ± 0,48
19	36.841	6,08 ± 0,13
33	<i>n. d.</i>	5,86 ± 0,31
22	<i>n. d.</i>	4,94 ± 0,43
26	<i>n. d.</i>	4,91 ± 0,66

^aPeso molecular aproximado determinado por SDS-PAGE.

^bFactor de concentración determinado por densitometría.

Del trabajo descrito en este apartado se establece que, ni el tamaño molecular, ni la carga neta de las proteínas son factores claramente determinantes del modo con que la membrana de MF retiene a las proteínas en el transcurso del proceso de MFTAV. Esto nos ha llevado a considerar que, para unas condiciones operacionales dadas, la transmisión de proteínas a través de la membrana de MF pueda depender no sólo de las vías de interacción proteína-membrana, sino también del estado molecular (grado de agregación) en que se encuentran las proteínas en el caldo de fermentación, como ha sido sugerido por Bowen y Hall (1995).

Es importante destacar que tal como ha sido realizado este estudio electroforético, en condiciones desnaturalizantes por la presencia de SDS o de urea, no podemos detectar la aparición de agregados de proteínas, de mayor tamaño que las proteínas individuales, que estén siendo retenidos por los poros de la membrana de MF. De aquí la necesidad de realizar otros estudios adicionales sobre la agregación de proteínas, los cuales serán presentados y discutidos posteriormente a lo largo de esta tesis.

3.5. Estudio de la pérdida de actividad SK.

El balance del rendimiento global del proceso de MFTAV para la recuperación de SK mostraba una pérdida total de actividad SK del $12,77 \pm 5,08\%$ (ver tabla 7). Considerando la cantidad de proteína que interactúa sobre la superficie de la membrana y en la estructura interna de los poros, sólo podemos justificar del orden del 1% de la pérdida total de actividad SK observada, como un cálculo matemático simple demuestra, permaneciendo en consecuencia la pérdida de actividad restante sin explicar.

En procesos de UF, dado que las enzimas son retenidas por la membrana sin atravesar sus poros, las interacciones directas enzima-membrana no han representado un objeto de atención muy atractivo a la hora de explicar las pérdidas de actividad enzimática que, para mayor justificación, suelen ser reducidas (Bautista *y col.*, 1986; Bohdziewicz y Bodzek, 1994; Bohdziewicz, 1995). Sin embargo, para procesos de MF, ha sido sugerido que las interacciones con la estructura interna de los poros cuando las enzimas son transportadas a través de la membrana puedan tener implicaciones importantes en la efectividad del proceso de recuperación (Bowen y Gan, 1992; Bowen y Hall, 1995). Mediante dicroísmo circular y espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier, se han observado cambios en la estructura secundaria y terciaria de proteínas sometidas a estrés mecánico por agitación o por paso a través de los poros de una membrana de MF (Franken *y col.*, 1990). Estos cambios parecen ser la causa de la desnaturalización parcial de

proteínas (Truskey *y col.*, 1987; Jonsson *y col.*, 1991) la cual, a su vez, puede originar moléculas inactivas de enzimas (Bowen y Gan, 1992).

Para determinar si la pérdida total de actividad SK es debida a la desnaturalización de moléculas de SK, hemos procedido a inmunoprecipitar directamente la enzima, para una misma cantidad de actividad (100 unidades de actividad SK, USK), desde el caldo de fermentación y desde el retenido y el permeado al final del proceso de MFTAV (FCV = 8,0). Estos experimentos han sido llevados a cabo con un anticuerpo policlonal frente a la SK, anti-SK, obtenido y titulado previamente como se indica en el apartado 2.8 del Procedimiento Experimental. La técnica de inmunoprecipitación permite obtener una cuantificación razonable de las moléculas de SK sin necesidad de la purificación de la enzima.

En el análisis de la especificidad de anti-SK frente a las distintas proteínas presentes en las muestras (figura 29) se observa que, tanto en el caldo fermentación (carril 3) como en el retenido (carril 4) y en el permeado (carril 5), el anticuerpo reconoce mayoritariamente dos bandas de proteína: una banda de unos 47 kDa (banda 18 en la figura 26) correspondiente a la SK, y otra sobre los 37 kDa (banda 19 en la figura 26) resultante probable de la digestión de la SK por las proteasas presentes en el caldo de fermentación, dado que coincide con un fragmento C-terminal, parcialmente activo, generado en la proteólisis limitada de la SK por quimotripsina (Parrado *y col.*, 1996).

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos de inmunoprecipitación aparecen en la figura 30. La cantidad de antisuero que se necesita para inmunoprecipitar el 50% de la actividad SK desde el caldo de fermentación y desde el permeado es similar ($2,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$). Por el contrario, la cantidad de antisuero que inmunoprecipita el 50% de la actividad SK desde el retenido es ligera pero significativamente más alta, $8,9 \pm 2\%$, que desde el caldo de fermentación ($2,8 \pm 0,1 \mu\text{l}$ frente a $2,5 \pm 0,1 \mu\text{l}$, $n = 4$; ANOVA: $[F(1,7) = 6,23, P = 0,046]$; test de Tukey: $P < 0,05$). Tales resultados sugieren que en el retenido existe una población de moléculas de SK ($8,9 \pm 2\%$ respecto de las moléculas de SK del

caldo de fermentación), total o parcialmente inactivas, que son retenidas por la membrana de MF.

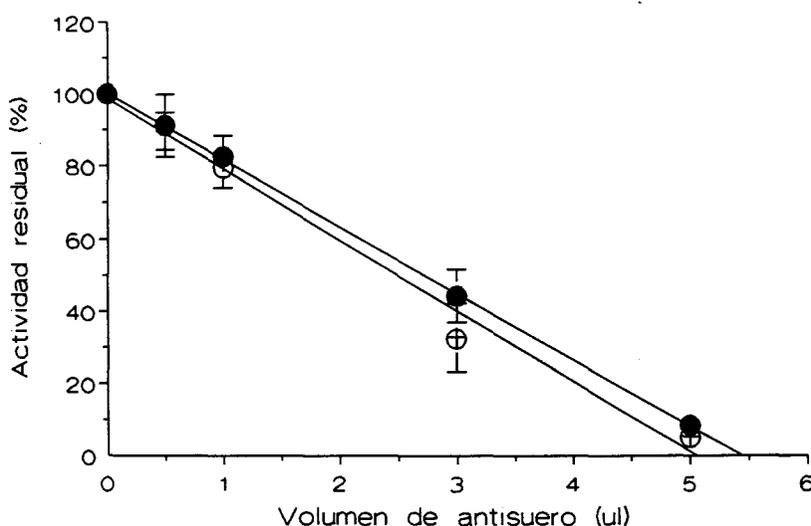


Figura 30. Actividad remanente en el sobrenadante frente al volumen de antisuero tras la inmunoprecipitación de la actividad SK desde el caldo de fermentación (+), y desde el permeado (○) y el retenido (●) al final del proceso de MFTAV. Los resultados están expresados como porcentaje de actividad residual.

Un posible mecanismo para explicar la aparición y concentración de moléculas inactivas de SK en el retenido sería la formación de agregados como consecuencia de la deformación permanente de las moléculas de enzima inducida, esta última, por el estrés mecánico de las fuerzas de cizalla presentes en el entorno de la bomba y en la superficie de la membrana (Kim y col., 1993).

Meireles y colaboradores (1991) han sugerido que, durante la UF de soluciones de proteínas en condiciones de temperatura y de velocidad de recirculación elevadas, el material depositado sobre la membrana está relacionado con la fracción desnaturizada de las proteínas asociada a mecanismos de agregación. Observaciones al microscopio

electrónico llevadas a cabo por Hlavacek y Bouchet (1993) han mostrado que el depósito de material formado sobre la superficie de la membrana durante la MF de seroalbúmina bovina en condiciones de estrés elevado por fuerzas de cizalla, está formado fundamentalmente por agregados de proteínas que son retenidos por la membrana de MF; la resistencia hidráulica del depósito depende del número de agregados y de sus propiedades físicas de compactación. En esta línea, la formación de agregados de proteínas durante el proceso de MFTAV podría explicar la pérdida de actividad SK debida a la desnaturalización de la enzima, y la retención de proteínas en general y de SK en particular por la membrana de MF dado que ni el tamaño molecular ni la carga neta de las proteínas individuales parecen ser los factores determinantes. Estos agregados estarían contribuyendo a los fenómenos de "polarización de la concentración" y de "ensuciamiento" de la membrana, responsables de la pérdida de permeabilidad del caldo de fermentación a través de la membrana de MF.

3.6. Caracterización de los daños inducidos en las proteínas durante el proceso de MFTAV.

En resumen, de los resultados presentados hasta el momento se establece que, durante la MFTAV a partir de caldos de fermentación de estreptococos, están ocurriendo tres sucesos importantes para el proceso de separación y recuperación de SK. En primer lugar, el flujo del permeado disminuye continuamente con el tiempo de filtración, aumentando, a su vez, la presión en el sistema. Este descenso en el flujo de filtración ha sido explicado en términos del **bloqueo de los poros** de la membrana de MF por deposición y adsorción de proteínas, tanto en la superficie inmediatamente por encima de ellos como en sus paredes internas. En segundo lugar, a pesar de que las proteínas del caldo de fermentación son mucho más pequeñas que los poros de membrana de MF, se observa una retención diferencial de proteínas a lo largo del proceso, la cual no depende ni del tamaño molecular ni de la carga neta de las proteínas. Por último, la actividad SK experimenta pérdidas durante el proceso que han podido ser atribuidas a la

desnaturalización de la enzima. Esta desnaturalización origina moléculas de SK total o parcialmente inactivas que son retenidas por la membrana de MF. Estos resultados podrían ser explicados considerando posibles daños o alteraciones conformacionales en las proteínas sometidas al estrés de las condiciones hidrodinámicas del proceso de MF, como ha sido sugerido por Jonsson y colaboradores (1991). La desnaturalización, que en el caso de las enzimas puede suponer importantes pérdidas por desactivación (Bowen y Gan, 1992), resultaría en el aumento de la tendencia a la adsorción y a la formación de agregados (Persson y Gekas, 1994).

Así pues, a continuación estudiamos:

- La agregación de proteínas durante el proceso de MFTAV a partir de caldos de fermentación de estreptococos.
- Los cambios conformacionales en la SK tras el proceso de MFTAV que permitan justificar la inactivación de la enzima.

3.6.1. Agregación de proteínas.

En la figura 31 se presentan los resultados obtenidos al analizar por cromatografía de exclusión molecular muestras de caldo de fermentación (A) y muestras, para un FCV = 8,0, de permeado (B) y retenido (C), en condiciones de una misma cantidad de proteína (2 mg en columna). El caldo de fermentación original muestra una distribución muy amplia de tamaños moleculares, apareciendo desde picos cuyos máximos de absorción se corresponden con pesos moleculares mayores de 300 kDa (por encima del límite superior de discriminación de la columna) hasta picos correspondientes a pesos moleculares menores de 1 kDa (por debajo del límite inferior de discriminación de la columna), que denotan la complejidad de la mezcla de proteínas. Después de que el volumen de partida se ha concentrado 8 veces (FCV = 8,0) a lo largo del proceso de MFTAV, tanto en el permeado como en el retenido, se mantienen todos los picos sin que se aprecie la aparición de picos nuevos. Sin embargo, y sobre todo en el retenido, las intensidades (concentraciones) de los picos varían de manera diferente, apoyando los resultados obtenidos a partir de las separaciones electroforéticas (ver figura 26).

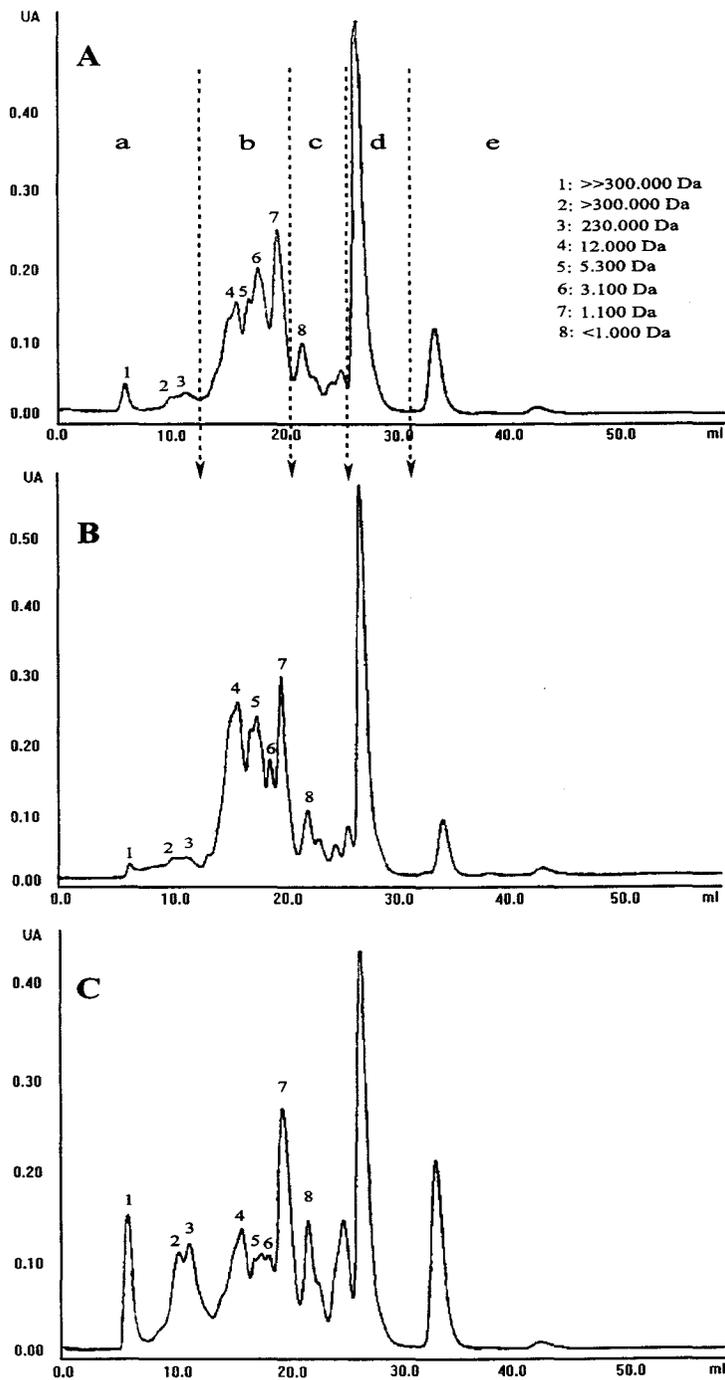


Figura 31. Análisis por cromatografía de exclusión molecular (FPLC), en columna Superose 12 (300-1 kDa), del caldo de fermentación (A), y del permeado (B) y retenido (C) al final del proceso de MFTAV.

Para cuantificar los niveles de concentración, los cromatogramas han sido divididos en cinco partes, (a)-(e), en función de las variaciones, por aumento o por disminución, observadas en grupos de picos consecutivos facilitándose así el procesamiento de los datos, los cuales han sido expresados como área (unidades de Absorbancia en un volumen de elución dado, UA·ml) total ocupada por la curva que delimita cada parte del cromatograma (tabla 9). Entre el caldo de fermentación y el permeado, los niveles de concentración de las diferentes partes ((a)-(e)) no varían significativamente. Por el contrario, el retenido respecto del caldo de fermentación muestra un aumento significativo en la concentración de las partes (a) ($3,72 \pm 0,84$ veces), (c) ($1,42 \pm 0,05$ veces) y (e) ($1,46 \pm 0,22$ veces) junto a la disminución significativa de las partes (b) ($1,40 \pm 0,02$ veces) y (d) ($1,47 \pm 0,03$ veces). A su vez, en el retenido, la fracción aumentada de la parte (a) ($12,95 \pm 1,13\%$), la cual incluye los picos correspondientes a los pesos moleculares mayores, entre $>> 300$ y 230 kDa, coincide con la fracción disminuída de la parte (b) ($13,56 \pm 1,41\%$), es decir con la disminución de los picos correspondientes a los pesos moleculares entre 12.000 y 1.100 Da. En los tres tipos de muestras la actividad SK se localiza y distribuye a lo largo de las fracciones de elución pertenecientes al pico que se corresponde con 230 kDa, siendo mayoritaria en la fracción más elejada del máximo de absorción.

Tabla 9. Niveles de concentración de las distintas partes en que han sido divididos los cromatogramas de exclusión molecular en columna Superose 12. Los valores han sido determinados cuantificando el área total ocupada por la curva que delimita cada parte del cromatograma.

Parte	Caldo de fermentación		Permeado (FCV = 8,0)		Retenido (FCV = 8,0)	
	UA·ml	%	UA·ml	%	UA·ml	%
(a)	$0,10 \pm 0,03$	$4,51 \pm 1,09$	$0,09 \pm 0,01^+$	$4,28 \pm 0,64$	$0,36 \pm 0,01$	$17,95 \pm 0,55$
(b)	$0,94 \pm 0,04$	$46,57 \pm 1,20$	$1,02 \pm 0,01^+$	$50,75 \pm 0,88$	$0,67 \pm 0,01$	$33,63 \pm 0,29$
(c)	$0,23 \pm 0,01$	$11,28 \pm 0,29$	$0,23 \pm 0,01^-$	$11,52 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$	$16,29 \pm 0,45$
(d)	$0,60 \pm 0,02$	$29,91 \pm 0,74$	$0,55 \pm 0,01^-$	$27,31 \pm 0,09$	$0,41 \pm 0,01$	$20,66 \pm 0,03$
(e)	$0,16 \pm 0,03$	$7,58 \pm 0,96$	$0,12 \pm 0,01^-$	$6,15 \pm 0,13$	$0,23 \pm 0,01$	$11,47 \pm 0,20$

UA unidades de Absorbancia.

⁺ Diferencias no significativas con respecto aal caldo de fermentación ($p > 0,05$).

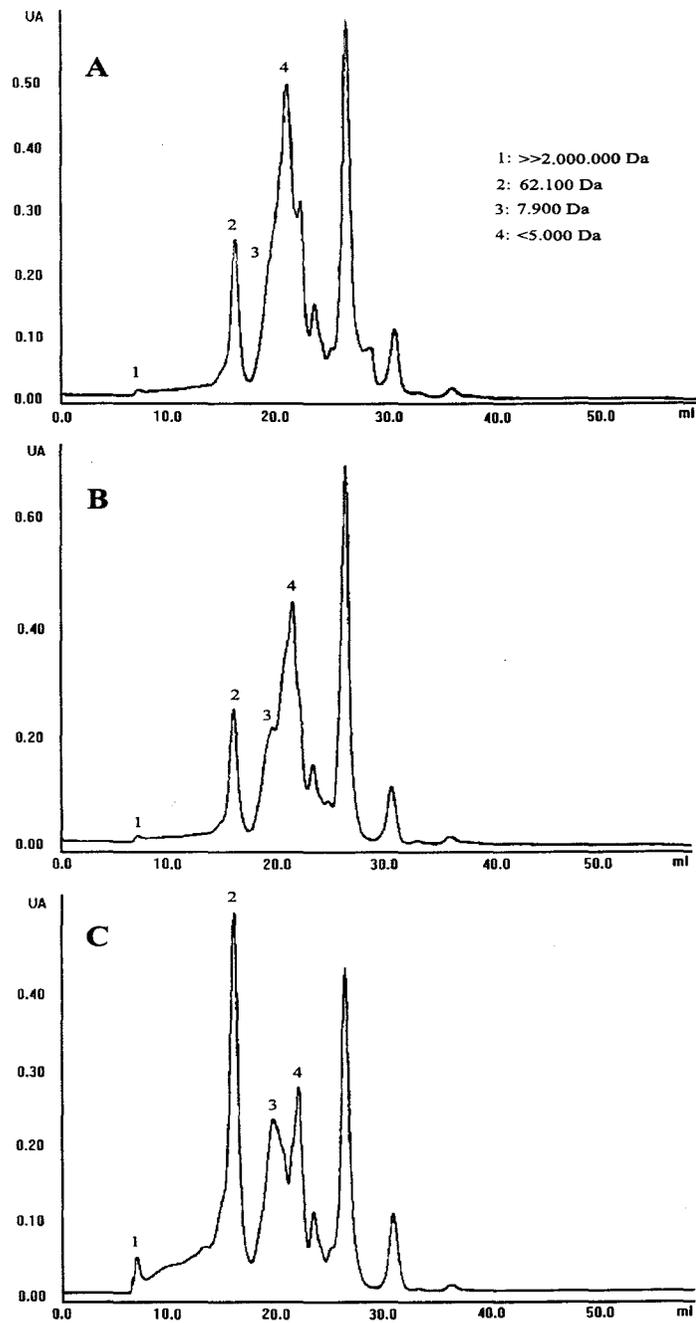


Figura 32. Análisis por cromatografía de exclusión molecular (FPLC), en columna Superose 6 (5.000-5 kDa), del caldo de fermentación (A), y del permeado (B) y retenido (C) al final del proceso de MFTAV.

Con el propósito de resolver mejor los picos iniciales de mayor tamaño que están fuera del rango de discriminación de la columna (300-1 kDa), las muestras fueron cromatografiadas utilizando una columna de rango superior (5.000-5 kDa), sin observarse mejorías en los resultados (ver figura 32).

La Absorbancia a 280 nm de una proteína depende de la cantidad de residuos aromáticos que posea; además, el coeficiente de extinción varía ampliamente entre las proteínas (Whitaker y Granum, 1980). Todo ello significa que la medida del área incluida por la curva de absorción dificulta la comparación cuantitativa entre partes distintas de los cromatogramas. Por esta razón, procedimos a cuantificar los residuos de aminoácidos en las fracciones de elución pertenecientes a las partes (a) y (b) del caldo de fermentación y del retenido donde hemos detectado las diferencias (tabla 10). Este análisis muestra que, en el retenido respecto del caldo de fermentación, los picos mayores correspondientes a pesos moleculares entre $>> 300$ y 230 kDa, es decir la parte (a), presentan un exceso de $2171,7 \pm 424,26$ nmoles totales de aminoácidos que pueden ser justificados con la pérdida de $3229,7 \pm 1580,38$ nmoles totales de aminoácidos de los picos correspondientes a pesos moleculares entre 12.000 y 1.100 Da, o sea de la parte (b).

Tabla 10. Composición aminoacídica de diferentes fracciones de elución pertenecientes al caldo de fermentación y al retenido (FCV = 8,0).

Aminoácido	Caldo de fermentación		Retenido	
	Parte (a)	Parte (b)	Parte (a)	Parte (b)
Aspártico	192,6 ± 13,6	1.158,2 ± 116,9	432,2 ± 38,5	1.042,8 ± 74,1
Glutámico	351,2 ± 59,9	2.704,3 ± 404,3	702,7 ± 50,0	2.725,8 ± 35,9
Serina	239,1 ± 21,5	1.000,5 ± 31,0	412,1 ± 6,5	907,4 ± 30,1
Histidina	5,96 ± 8,4	369,2 ± 68,9	16,8 ± 6,3	307,2 ± 36,6
Glicina	190,7 ± 14,9	7.074,5 ± 372,3	465,4 ± 1,2	6.013,6 ± 105,4
Treonina	113,9 ± 11,2	1.131,7 ± 43,8	325,5 ± 3,5	977,4 ± 12,0
Arginina	58,0 ± 10,5	260,1 ± 13,3	197,6 ± 7,1	203,7 ± 1,1
Alanina	135,7 ± 14,6	944,9 ± 256,4	454,9 ± 13,5	992,4 ± 83,4
Valina	140,8 ± 6,3	1.195,4 ± 92,0	375,8 ± 32,3	1.038,2 ± 18,4
Metionina	27,4 ± 18,6	188,2 ± 143,1	11,1 ± 15,7	143,2 ± 7,7
Isoleucina	140,3 ± 6,3	777,8 ± 73,2	319,2 ± 28,6	723,9 ± 8,8
Leucina	125,2 ± 9,4	1.171,9 ± 125,9	352,0 ± 29,6	1.075,5 ± 31,7
Fenilalanina	3,0 ± 4,3	356,8 ± 114,9	1,9 ± 2,6	170,9 ± 15,5
Lisina	109,1 ± 11,0	1.030,0 ± 214,3	321,1 ± 20,8	947,3 ± 56,6
Total	1.850,5 ± 191,6	19.418 ± 1573,6	4.027,9 ± 624,0	16.160 ± 38,7

Los resultados están expresados en nanomoles de aminoácidos.

Los resultados están indicando que una fracción considerable de las proteínas del caldo de fermentación original está presente en el retenido, al final del proceso de MFTAV (FCV = 8,0), como especies moleculares más grandes, probablemente agregados de proteínas, que no pasan a través de la membrana de MF. El análisis de las mismas fracciones anteriores por SDS-PAGE (figura 3.19) muestra, asimismo, que el fenómeno de agregación afecta, aunque de manera diferente, a todas las proteínas del caldo de fermentación original entre aproximadamente 12.000 y 1.100 Da de peso molecular, dado que todas están formando parte de moléculas de mayor tamaño, tamaño incluso superior a 300 kDa.

Al examinar por *Light Scattering* las muestras de retenido a diferentes valores de FCV (figura 34), se observa cómo a medida que transcurre el proceso de MFTAV aumenta en el retenido la concentración de moléculas de mayor tamaño, como consecuencia de la agregación de proteínas. El mecanismo de agregación es especialmente evidente entre los FCV de 1,3 y 6 veces, coincidiendo con la pérdida lenta y continua de permeabilidad del caldo de fermentación a través de la membrana de MF una vez que el flujo del permeado ha experimentado la caída rápida inicial (ver figura 3.5). Estos resultados sugieren que la resistencia de la membrana, debida a los fenómenos de "polarización de la concentración" y de "ensuciamiento" de la membrana, se vuelve progresivamente más severa cuanto más proteína desnaturada (agregada) está presente en la solución y que la fracción desnaturada de las proteínas puede estar contribuyendo al descenso continuo del flujo del permeado observado a lo largo del proceso de MFTAV, como ha sido demostrado por Meireles y colaboradores para procesos de UF.

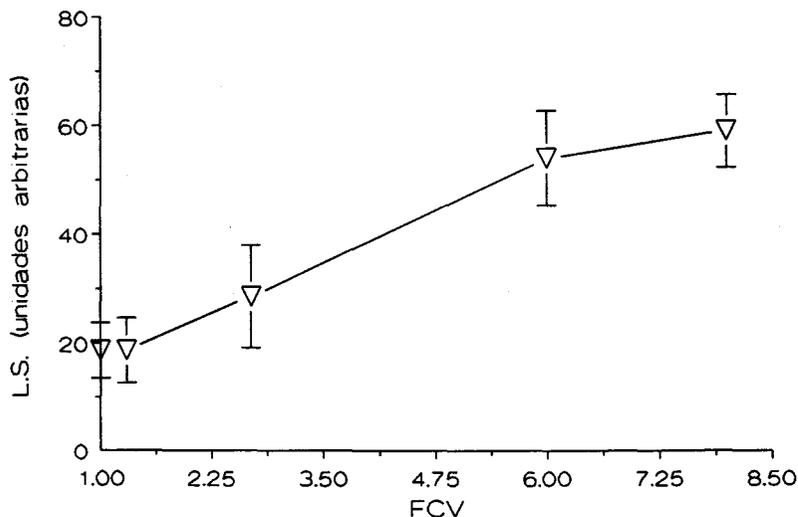


Figura 34. Análisis por *Light Scattering* del retenido a lo largo del proceso de MFTAV. Los resultados están expresados como unidades arbitrarias de dispersión de luz en función del FCV.

Hasta el momento se han descrito algunos trabajos que analizan el fenómeno de agregación de proteínas en los procesos de membrana, MF y UF. Chandavarkar (1990) ha establecido que los agregados de proteínas, generados durante la recirculación de la solución de proteínas a través de la bomba peristáltica, son la causa dominante de la pérdida de permeabilidad durante procesos de MFTAV; observó una correlación fuerte entre la agregación de proteínas y el número de pasos de la solución a través de la bomba. El efecto de la temperatura, la velocidad de recirculación y la presión transmembrana sobre la desnaturalización de seroalbúmina bovina en procesos de UF ha sido examinado por Meireles y colaboradores (1991); encontraron que la velocidad de desnaturalización de la proteína aumenta con la temperatura, la velocidad de recirculación y el tiempo de filtración. Kim y colaboradores (1993) han sugerido que la agregación de proteínas en procesos de UF puede ocurrir como resultado de la supersaturación rápida de la superficie de la membrana por moléculas de proteínas; las fuerzas de cizalla actuando sobre la superficie de la membrana probablemente están desnaturalizando las proteínas, promoviendo las colisiones entre moléculas. El efecto de las fuerzas de cizalla actuando sobre la superficie y el interior de los poros de la membrana ha sido examinado por Hlavacek y Bouchet (1993) para la MF de soluciones de seroalbúmina bovina; observando, por técnicas de microscopía, un depósito superficial formado por agregados de proteínas, responsable del "ensuciamiento" de la membrana. Recientemente, Bowen y Hall (1995) han estudiado los mecanismos responsables de la disminución del flujo del permeado durante la recuperación de alcohol deshidrogenasa por procesos de MF; deduciendo que la permeabilidad y la transmisión de la enzima depende del estado de agregación de las moléculas, el cual controla las vías de interacción proteína-membrana. La influencia de los agregados de proteínas sobre los parámetros de flujo del permeado, transmisión de proteínas a través de las membranas y desactivación de enzimas por desnaturalización nos permite, por tanto, justificar los sucesos observados al respecto durante el proceso de MFTAV a partir de caldos de fermentación de estreptococos.

3.6.2. Análisis conformacional de la SK.

Dado que la pérdida total de actividad SK observada en el proceso de MFTAV no es muy elevada ($12,77 \pm 5,08\%$), la detección a nivel molecular de los posibles cambios conformacionales que puedan explicar la desactivación de la enzima requiere del uso de técnicas altamente sensibles. Entre tales técnicas, la Calorimetría Diferencial de Barrido y el Dicroísmo Circular han sido las más asequibles a nuestro grupo de trabajo.

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) permite estudiar la estabilidad estructural de las proteínas (Sanchez-Ruiz *y col.*, 1988; Paredi *y col.*, 1995), posibilitando el reconocimiento de los dominios individuales que experimentan desnaturalización y el cálculo de las funciones termodinámicas del desplegamiento de las moléculas (Privalov, 1979). La figura 35 muestra el registro original para la desnaturalización térmica de la SK purificada, según se especifica en el apartado 2.10 del Procedimiento Experimental, desde el caldo de fermentación (A) y desde el retenido al final del proceso de MFTAV (FCV = 8,0) (B); en la misma figura aparece el segundo barrido realizado con las muestras para chequear la reversibilidad del proceso.

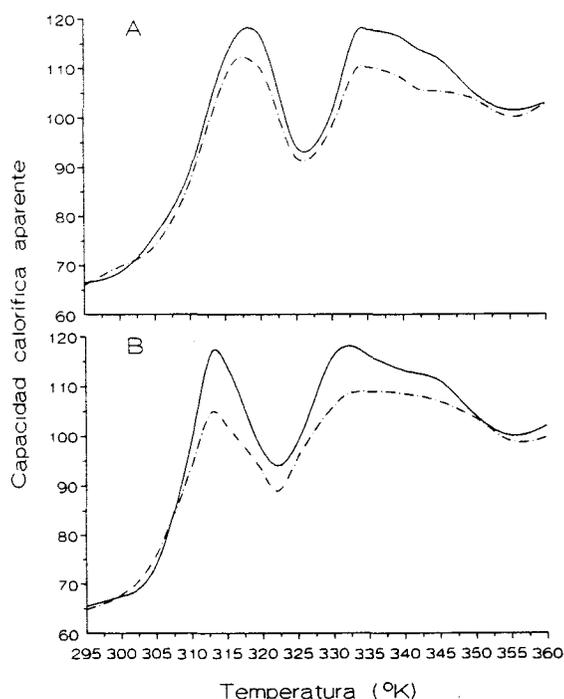


Figura 35. Registro calorimétrico original para la SK procedente del caldo de fermentación (A) y del retenido al final del proceso de MFTAV (B). Primer barrido (—); segundo barrido (- -).

Los datos calorimétricos han sido corregidos respecto al registro obtenido únicamente con el tampón de trabajo (línea base instrumental) y respecto a la capacidad calorífica intrínseca del macrosistema en el intervalo de la transición (línea base química). La capacidad calorífica intrínseca es la responsable de que en los termogramas de DSC exista una diferencia entre la capacidad calorífica del estado desnaturalizado y la del estado nativo (ΔC_p). Esta línea base química, en nuestro caso, ha sido determinada mediante una sigmoide que evoluciona de un nivel a otro proporcionalmente al área desarrollada por la transición (Takahashi y Sturtevant, 1981).

Los termogramas corregidos, es decir, la capacidad calorífica en exceso (C_p^{exc}) frente al intervalo de temperatura, aparecen en la figura 36 para la SK procedente del caldo de fermentación (A) y del retenido (B). En ambos casos se observan dos transiciones claras y una tercera que surge como un hombro a partir del segundo pico de transición.

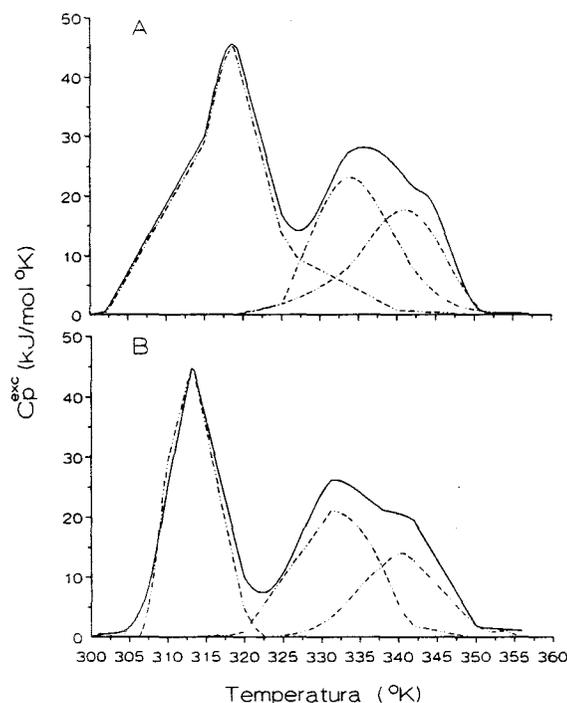


Figura 36. Capacidad calorífica en exceso para la SK procedente del caldo de fermentación (A) y del retenido al final del proceso de MFTAV (B), frente al intervalo de temperatura. Los datos han sido determinados corrigiendo los termogramas originales con respecto a la línea base química de acuerdo con Takahashi y Sturtevant (1981). Desnaturalización total (—); desnaturalizaciones parciales (---).

Los resultados sugieren que la desnaturalización térmica de la SK ocurre como un proceso reversible a través de la segregación de regiones dentro de la molécula. Este tipo de desplegamiento térmico es consistente con la existencia en la molécula de SK de al menos tres dominios de diferente estabilidad capaces de estar presentes en un estado estructural independiente de otras regiones de la proteína (Teuten y col., 1993). Por otro

lado, los estudios de fragmentación parcial llevados a cabo por Parrado y colaboradores (1996) han demostrado la organización en tres dominios, estructuralmente independientes aunque funcionalmente cooperativos, de la molécula de SK, conforme al modelo esquematizado en la figura 37. En dicho modelo, el fragmento de 36 kDa (SK36), el cual coincide con la banda de aproximadamente 37 kDa reconocida por anti-SK tanto en el caldo de fermentación, como en el permeado y en el retenido (ver figura 29), estaría constituido por los dominios C-terminal y central conteniendo una porción del dominio N-terminal, constitución ésta que le permite mantener del orden del 1% de la actividad SK nativa.

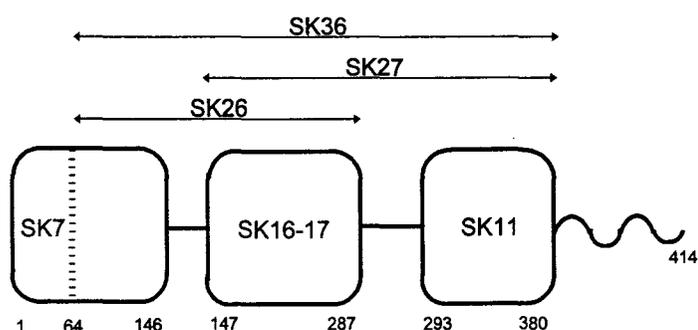


Figura 37. Modelo esquemático propuesto por Parrado y colaboradores para la organización en dominios de la SK. Las especificaciones del tipo SK7 representan los fragmentos que dichos autores han obtenido por proteólisis limitada de la enzima con quimotripsina, y los números indican los residuos aminoacídicos para los diferentes dominios y/o polipéptidos.

La tabla 11 contiene las entalpías de desnaturalización específicas (ΔH) y las temperaturas en el valor máximo de capacidad calorífica (T_{\max}) para las tres transiciones de las dos muestras analizadas. Una disminución muy ligera en los valores de T_{\max} para la

proteína procedente del retenido ocurre para los tres picos de transición, junto a la disminución más pronunciada de los valores de ΔH que supone un descenso en la entalpía de desnaturalización total para la SK presente en el retenido.

Tabla 11. *Parámetros de la desnaturalización térmica de la SK presente en el caldo de fermentación y en el retenido al final del proceso de MFTAV.*

Parámetro termodinámico	SK^a	SK^b
$T_{max} (1)$	318,8	313,1
$T_{max} (2)$	333,6	331,3
$T_{max} (3)$	342,9	340,9
$\Delta H (1)$	425	384
$\Delta H (2)$	309	292
$\Delta H (3)$	246	240

^a *Enzima procedente del caldo de fermentación.*

^b *Enzima procedente del retenido (FCV = 8,0).*

Los números entre paréntesis se corresponden con las diferentes transiciones.

Variaciones tan pequeñas en los valores de T_{max} para las distintas transiciones, entre la SK procedente del caldo de fermentación y la SK procedente del retenido, pueden deberse a que, a lo largo del proceso de MFTAV, la SK no haya experimentado cambios importantes en la estructura terciaria que denoten una desestabilización grande, si bien tal comportamiento no era de esperar de una proteína sin enlaces disulfuros en su estructura (Radek y Castellino, 1989).

La entalpía de la desnaturalización térmica de una proteína es el resultado de las contribuciones endotérmicas y exotérmicas. Las primeras son debidas a la rotura de enlaces

de hidrógeno y las segundas a los procesos de agregación y a la rotura de interacciones hidrofóbicas de la proteína (Myers, 1990). Dado que el mecanismo de agregación inducido térmicamente ha sido considerado un modelo de desnaturalización de proteínas irreversible (Privalov, 1982), el descenso en la entalpía de desnaturalización para la SK obtenida desde el retenido (FCV = 8,0) puede estar relacionado con la contribución exotérmica debida a la rotura de interacciones hidrofóbicas internas de la molécula, o con un descenso de la contribución endotérmica debida a la rotura de enlaces de hidrógeno, así como con la simultaneidad de los dos sucesos.

Las características de estructura secundaria para la SK purificada desde ambas fuentes (caldo de fermentación y retenido) han sido determinadas a partir de experimentos de Dicroísmo Circular (CD) (tabla 12). La SK procedente del caldo de fermentación original muestra un contenido en los distintos tipos de estructura secundaria similar al obtenido recientemente por Parrado y colaboradores (1996). Tras el proceso de MFTAV, la SK en el retenido posee un contenido en estructuras β ligeramente inferior al original en beneficio del porcentaje de regiones no estructuradas, correlacionando con las pequeñas variaciones observadas en los parámetros termodinámicos (ver tabla 11).

Tabla 12. Porcentajes de las distintas estructuras secundarias para la SK procedente del caldo de fermentación y del retenido (FCV = 8,0). Los valores han sido calculados desde espectros de DC usando el algoritmo propuesto por Yang y colaboradores (1986).

	<i>Hélice α</i>	<i>Hoja plegada β</i>	<i>Giro β</i>	<i>Sin estructura</i>
	%	%	%	%
<i>SK^a</i>	32,3	33,9	0,4	33,4
<i>SK^b</i>	32,3	29,7	0,2	37,8

^aEnzima procedente del caldo de fermentación.

^bEnzima procedente del retenido (FCV = 8,0).

Las estructuras β de las proteínas quedan estabilizadas por enlaces de hidrógeno entre grupos NH y CO de residuos distantes pertenecientes al mismo o diferentes filamentos polipeptídicos, y por fuerzas de van der Waals entre cadenas laterales hidrofóbicas (Richardson *y col.*, 1992). El cambio hacia un mayor contenido de zonas no estructuradas en la molécula de proteína conlleva, por tanto, la reducción del número de enlaces susceptibles de contribuir positivamente a la entalpía de desnaturalización. Esto explica la disminución en el valor de ΔH observada para las transiciones de la SK presente en el retenido después del proceso de MFTAV.

La deformación estructural inducida en la SK puede suponer la desactivación total o parcial de la enzima, así como el aumento de la flexibilidad e inestabilidad de la molécula haciendo más asequibles entornos moleculares, tales como regiones hidrofóbicas, que favorecen los mecanismos de agregación de proteínas (Persson y Gekas, 1994). Estos supuestos permiten justificar la pérdida de actividad SK durante la MFTAV a partir de caldos de fermentación de estreptococos y la retención de moléculas inactivas, agregadas, de la enzima por la membrana de MF.

3.7. Evaluación de la influencia de aditivos sobre el proceso de MFTAV.

Determinados aditivos como la urea y algunas sales pueden afectar la estructura y estabilidad de las proteínas en soluciones acuosas aumentando o disminuyendo la tendencia a la agregación (McGregor, 1986; Vainerman *y col.*, 1989). Para estudiar el efecto de la urea y del cloruro de sodio (NaCl) sobre la agregación de proteínas observada en el proceso de MFTAV, el caldo de fermentación fue tratado con estos aditivos en un rango de concentración entre 0,5 y 4 M, y posteriormente procesado en el módulo de MF en las condiciones normales de trabajo. Tales aditivos fueron seleccionados por la fácil disponibilidad comercial y económica (bajo costo) que representan. En todos los casos se determinó el balance global del proceso de MFTAV para la recuperación de actividad SK.

3.7.1. Tratamientos con urea.

Aunque no se conoce exactamente cómo la urea afecta a las proteínas, al parecer modifica el contenido de puentes de hidrógeno que estabilizan sus estructuras con la consiguiente desnaturalización (Ahmad y Bigelow, 1982). En la tabla 13 se presentan los resultados obtenidos para la evaluación preliminar de la susceptibilidad de la actividad SK al efecto desnaturalizante de la urea en el rango de concentración estudiado. Entre 0,5 y 2 M, la urea no interfiere en la actividad SK; a concentraciones superiores, la pérdida de actividad SK empieza a ser apreciable, alcanzándose un valor del $42,56 \pm 9,53\%$ para una concentración 4 M de urea. Tras 12 horas de diálisis a 4°C , la pérdida de actividad se intensifica a pesar de que la desnaturalización de proteínas inducida en presencia de urea es considerada un proceso reversible (Pace y col., 19..).

Tabla 13. Efecto de la urea a diferentes concentraciones sobre la actividad SK. La actividad también se ensayó después de dializar las muestras a 4°C durante 12 horas.

Concentración de urea		Actividad SK	
M	USK mt^{-1}	USK	%
0 ^a	2.318 ± 330	2.318 ± 330	100
0,5 ^a	2.381 ± 87	2.381 ± 87	103,76 ± 11,13
1 ^a	2.482 ± 2	2.482 ± 2	108,20 ± 15,49
2 ^a	2.374 ± 71	2.374 ± 71	103,27 ± 11,63
3 ^a	2.097 ± 583	2.097 ± 583	89,60 ± 12,37
4 ^a	1.331 ± 112	1.331 ± 112	57,44 ± 9,53
0 ^b	454 ± 200	1.021 ± 208	49,29 ± 7,47
0,5 ^b	709 ± 160	1.632 ± 533	71,43 ± 10,58
1 ^b	567 ± 239	1.389 ± 647	62,80 ± 26,03
2 ^b	653 ± 141	1.612 ± 284	72,18 ± 6,03
3 ^b	732 ± 177	1.747 ± 398	77,60 ± 5,88
4 ^b	400 ± 115	1.000 ± 120	43,13 ± 12,65

^a Muestras sin dializar.

^b Muestras dializadas.

La influencia negativa de la diálisis sobre la actividad SK puede deberse a la propia inestabilidad de la enzima aun en condiciones de baja temperatura (Brockway y Castellino, 1974), como pone de manifiesto la pérdida de actividad SK generalizada en todas las muestras (0-4 M de urea) después de la diálisis.

El balance del proceso de MFTAV para la recuperación de SK (tabla 14) muestra que, a medida que aumenta la concentración de urea en el caldo de fermentación de partida, disminuye la pérdida de actividad SK durante la MF, al mismo tiempo que aumenta la concentración de la actividad en el retenido. A partir de una concentración 2 M de urea, la recuperación parcial de actividad SK es superior al 100%, permaneciendo, para dicho valor de concentración, el $57,74 \pm 12,76\%$ de la actividad en el retenido. Considerando las pérdidas iniciales de actividad SK en el caldo de fermentación debidas a la presencia de urea, el mejor rendimiento se obtiene a una concentración 2 M de urea para la cual se recupera prácticamente el 100% ($95,03 \pm 13,80\%$) de la actividad enzimática original.

Los resultados demuestran que el tratamiento del caldo de fermentación con urea entre 1 y 2 M minimiza las pérdidas globales de actividad SK durante el proceso de MFTAV, aunque no permite la recuperación eficiente de la actividad enzimática en el permeado favoreciendo, incluso, su retención por la membrana de MF.

Tabla 14. Recuperación de actividad SK a partir de caldos de fermentación de estreptococos por MFTAV en presencia de diferentes concentraciones de urea.

Urea M	Caldo de fermentación	Permeado (FCV = 8,0)		Retenido (FCV = 8,0)		Recuperación	
	USK ml^{-1}	USK ml^{-1}	%	USK ml^{-1}	%	Parcial %	Total %
0	2.195 ± 220	1.164 ± 120	46,39 ± 5,48	6.468 ± 310	36,83 ± 14,13	83,22 ± 9,81	83,22 ± 9,81
0,5	2.250 ± 95	1.289 ± 210	50,12 ± 10,09	6.468 ± 223	38,83 ± 10,72	88,95 ± 10,41	88,95 ± 10,23
1	2.254 ± 115	1.315 ± 224	51,06 ± 9,92	7.190 ± 315	39,87 ± 13,97	90,93 ± 11,95	93,37 ± 11,00
2	2.082 ± 133	1.010 ± 258	42,46 ± 12,41	9.616 ± 266	57,74 ± 12,76	100,20 ± 12,59	95,03 ± 11,32
3	1.866 ± 211	890 ± 200	41,74 ± 9,59	9.329 ± 532	62,50 ± 25,52	104,24 ± 17,56	88,60 ± 13,80
4	1.195 ± 96	570 ± 95	41,74 ± 7,96	6.436 ± 410	67,33 ± 3,43	109,07 ± 9,68	61,49 ± 9,86

Con el fin de conocer la relación de estos hechos con la agregación de proteínas, muestras del caldo de fermentación y del retenido al final del proceso de MFTAV (FCV = 8,0) en presencia de las diferentes concentraciones de urea fueron analizadas por cromatografía de exclusión molecular. En las figuras 38, 39 y 40 aparecen, a título de ejemplos, los resultados obtenidos para las concentraciones 1, 2 y 3 M de urea respectivamente. La similitud entre los cromatogramas pertenecientes al caldo de fermentación (A) y al retenido (B), y los obtenidos para las muestras en ausencia de urea (ver figura 31) es casi completa excepto en la parte inicial de mayor tamaño molecular, parte (a), donde el pico correspondiente a > 300 kDa prácticamente desaparece intensificándose el pico correspondiente a 230 kDa.

La magnitud de la agregación, tomando como referencia el área relativa (%) de la parte (a) respecto del área total del cromatograma, es afectada de forma apreciable por la concentración de urea (tabla 15). En el caldo de fermentación, las concentraciones 0,5 y 1 M de urea disminuyen la agregación de proteínas de partida un $3,36 \pm 0,58\%$ y un $3,92 \pm 0,13\%$ respectivamente quedando la fracción de mayor tamaño (parte (a)) bastante reducida; a concentraciones mayores la influencia de la urea resulta ser mínima. Por otro lado, las concentraciones crecientes de urea parecen favorecer la agregación de proteínas en el proceso de MFTAV, dado el incremento progresivo de la parte (a) en las muestras de retenido; respecto al proceso llevado a cabo en ausencia de urea, las concentraciones de 0,5 y 1 M de urea disminuyen la agregación de proteínas un $10,63 \pm 0,56\%$ y un $9,93 \pm 0,13\%$ respectivamente, mientras que las concentraciones de 2 y 3 M la aumentan un $8,81 \pm 0,06\%$ y un $15,51 \pm 0,34\%$ respectivamente. Para los dos primeros casos, los niveles de agregación alcanzados en el retenido tras el proceso de MFTAV son inferiores a los registrados en ausencia de urea y para los dos últimos, en cambio, son considerablemente mayores.

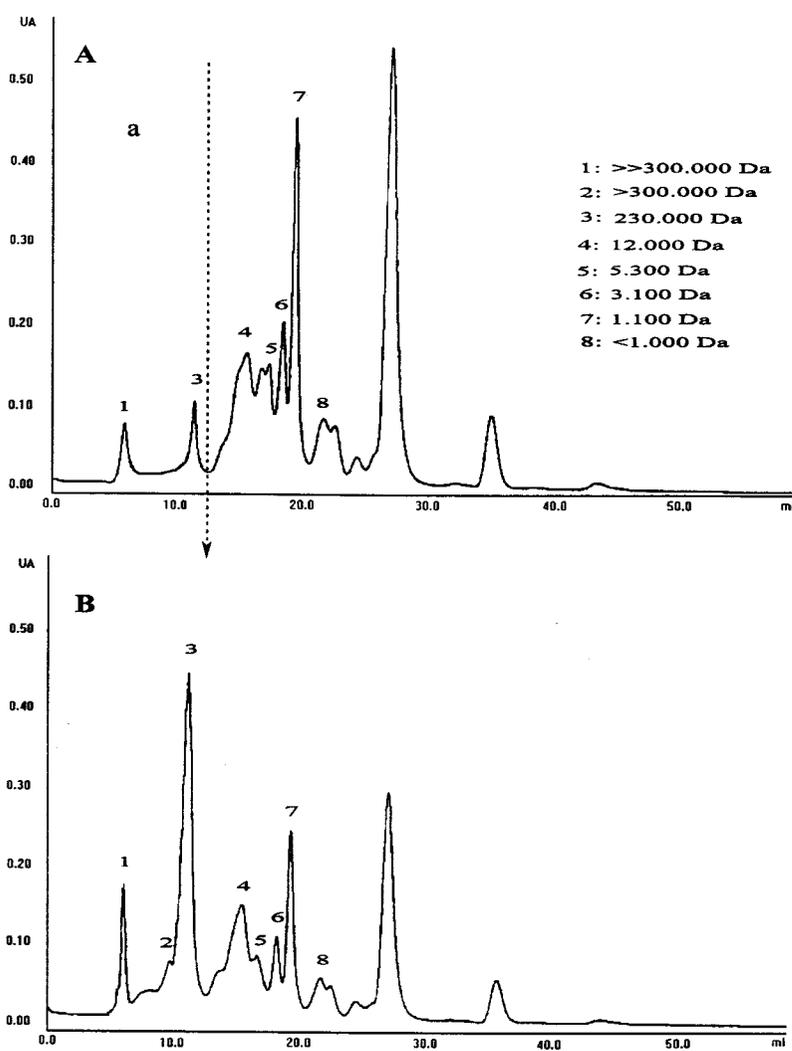


Figura 39. Análisis por cromatografía de exclusión molecular (FPLC) del caldo de fermentación (A) y del retenido tras el proceso de MFTAV (B), en presencia de urea 2 M. Las separaciones han sido llevadas a cabo en columna Superose 12 (300-1 kDa).

Tabla 15. Efecto de la urea a diferentes concentraciones sobre la agregación de proteínas en el proceso de MFTAV. Los valores han sido determinados cuantificando el área ocupada por la parte (a) de los cromatogramas obtenidos por exclusión molecular.

Concentración de urea	Caldo de fermentación		Retenido (FCV = 8,0)	
	UA · ml	%	UA · ml	%
0	0,096 ± 0,028	4,51 ± 1,09	0,358 ± 0,005	17,95 ± 0,55
0,5	0,023 ± 0,019	1,15 ± 0,94	0,148 ± 0,023	7,32 ± 1,11
1	0,012 ± 0,005	0,59 ± 0,23	0,162 ± 0,014	8,02 ± 0,68
2	0,105 ± 0,022	5,21 ± 1,10	0,541 ± 0,012	26,76 ± 0,61
3	0,104 ± 0,019	5,15 ± 0,94	0,676 ± 0,020	33,46 ± 0,89

UA unidades de Absorbancia.

La disminución de la agregación de proteínas en el caldo de fermentación tratado con concentraciones bajas de urea (0,5-1 M), puede ser atribuída al efecto desnaturizante de este agente (Cleland *y col.*, 1993), dependiente de la concentración (Pace *y col.*, 19..), sobre una fracción minoritaria de proteínas de alto peso molecular que se encuentran en el caldo de fermentación original presumiblemente en estado agregado (Kiefhaber *y col.*, 1991). A concentraciones mayores de urea (2-3 M), la extensión de la desnaturización puede haber desplegado las suficientes moléculas de proteínas para favorecer las interacciones intermoleculares que posibilitan de nuevo la agregación.

Asímismo, la agregación de proteínas favorecida durante el proceso de MFTAV a medida que aumenta la cantidad de urea en el caldo de fermentación de partida puede entenderse como un bloqueo progresivamente mayor de los poros de la membrana de MF por partículas finas en suspensión (Tanaka *y col.*, 1993), como consecuencia de la adición de urea a concentraciones crecientes; es decir, por una incidencia progresivamente mayor de los fenómenos de "polarización de la concentración" y de "ensuciamiento" de la membrana. Esta posibilidad es consistente con el aumento de la retención del producto (SK) por la membrana de MF al aumentar la concentración de urea en el caldo de

fermentación de partida (ver tabla 13), así como, con las pérdidas mayores de permeabilidad observadas durante los procesos. EL aumento de la resistencia de la membrana por el bloqueo de los poros, superficial y/o interno, estaría induciendo un mayor estrés sobre las proteínas y sobre las células de estreptococos debido a las fuerzas de cizalla. Este efecto podría potenciar la tendencia a la agregación de las proteínas (Kim y *col.*, 1993), y la rotura de las células (Shimizu y *col.*, 1994) con la consiguiente liberación de moléculas de SK, que no habían sido transportadas al medio exocelular, lo cual permitiría explicar la recuperación parcial de actividad SK superior al 100% al final del proceso de MFTAV en presencia de las concentraciones ≥ 2 M de urea.

Por otro lado, dado que el tratamiento del caldo de fermentación con urea 1 M reduce considerablemente la agregación de proteínas durante la MFTAV, permitiendo, no obstante, restituir sólo parte de la pérdida total de actividad SK observada durante el proceso, sin mejorar de manera apreciable la recuperación de la actividad enzimática en el permeado, los agregados grandes de proteínas no deben ser los únicos causantes de la "polarización de la concentración" y del "ensuciamiento" de la membrana, fenómenos responsables de la retención y desactivación de la SK según habíamos sugerido. Más claramente: otros elementos presentes en el caldo de fermentación, tales como agregados de proteínas de menor tamaño, proteínas individuales y componentes intracelulares y del medio, estarán formando parte del material depositado en la membrana.

A partir de los resultados se deduce que la utilización de urea como aditivo en el proceso de MFTAV para la recuperación de SK a partir de caldos de fermentación de estreptococos, presenta ventajas respecto a la ausencia del aditivo, si consideramos que en concentraciones entre 1 y 2 M permite optimizar los rendimientos globales de recuperación de la actividad enzimática, ya sea protegiendo a las proteínas de la agregación (1 M) y como consecuencia disminuyendo los fenómenos de "polarización de la concentración" y de "ensuciamiento" de la membrana, o bien solubilizando más actividad SK al medio (1 y 2 M); sin embargo, su aplicación en el sistema no implica la recuperación eficiente de la actividad SK en el permeado.

3.7.2. Tratamientos con cloruro de sodio (NaCl).

EL aumento de la fuerza iónica puede conducir a la disociación de agregados en mezclas complejas de proteínas (McGregor, 1986). Este efecto ha sido interpretado en términos de cambios del potencial ϵ (potencial dieléctrico) en el entorno inmediato de las moléculas de proteínas (Petenate y Glatz, 1989); el aumento en el valor del potencial ϵ por la adición de NaCl resulta en una disminución de la agregación y precipitación de las proteínas debido al aumento de la repulsión intermolecular.

Otro factor que puede estar contribuyendo al comportamiento de las proteínas en presencia de sales es el resultante de las uniones específicas e inespecíficas entre los iones cargados y los grupos polares de las proteínas (Shih *y col.*, 1992); el aumento de la carga neta de las proteínas debido a la unión de los iones aumenta la repulsión electrostática entre las moléculas, evitando la agregación de proteínas y aumentando la solubilidad. En este último caso, las uniones sal-proteína han sido relacionadas con la desnaturalización de las proteínas (Arakawa y Timasheff, 1982); el aumento de la energía de Gibbs de una proteína, consecuencia del aumento de su carga neta por la unión de iones, resulta en una fuerza repulsiva intramolecular que causa la inestabilidad conformacional de la proteína.

La influencia del NaCl sobre la estabilidad de la SK y sobre la agregación de proteínas en el proceso de MFTAV ha sido evaluada siguiendo el mismo esquema experimental descrito anteriormente para la urea. Se realizaron ensayos con las concentraciones crecientes de NaCl (0,5-4 M) para determinar inicialmente el efecto de la sal en la actividad SK del caldo de fermentación (tabla 16). A medida que se incrementa la concentración de NaCl en el caldo de fermentación disminuye la actividad SK, originándose pérdidas muy altas incluso para la concentración de 0,5 M de NaCl ($24,48 \pm 14,03\%$). La diálisis restituye parte de las pérdidas de actividad SK pero los rendimientos siguen siendo muy bajos. Por esta razón el NaCl no parece ser, *a priori*, un buen candidato como aditivo en el proceso de MFTAV para la recuperación de actividad SK a partir de caldos de fermentación de estreptococos.

Tabla 16. Efecto del NaCl a diferentes concentraciones sobre la actividad SK. La actividad también se ensayó después de dializar las muestras a 4°C durante 12 horas.

Concentración de NaCl		Actividad SK	
M	USK ml ⁻¹	USK	%
0 ^a	2.318 ± 330	2.318 ± 330	100
0,5 ^a	1.711 ± 302	7.711 ± 302	75,52 ± 14,03
1 ^a	1.005 ± 59	1.005 ± 59	43,98 ± 8,80
2 ^a	571 ± 118	571 ± 118	24,51 ± 1,59
3 ^a	334 ± 56	334 ± 56	7,51 ± 10,06
4 ^a	72 ± 58	72 ± 58	2,91 ± 2,18
0 ^b	454 ± 200	1.021 ± 208	49,29 ± 7,47
0,5 ^b	720 ± 213	1.632 ± 355	73,01 ± 9,55
1 ^b	537 ± 354	1.228 ± 956	50,21 ± 34,52
2 ^b	312 ± 186	764 ± 562	31,94 ± 19,63
3 ^b	307 ± 224	839 ± 690	49,86 ± 45,88
4 ^b	177 ± 93	533 ± 250	22,27 ± 7,70

^a Muestras sin dializar.

^b Muestras dializadas.

No obstante, hemos seguido el balance global del proceso de MFTAV en presencia de las distintas concentraciones de NaCl, obviando la concentración 4 M para la cual la inestabilidad de la SK resulta ser excesivamente patente. Los resultados obtenidos para la recuperación de actividad SK se presentan en la tabla 17. Teniendo en cuenta los efectos inherentes al propio proceso de MFTAV, a lo largo del mismo se observa un comportamiento muy similar al descrito para la urea: la recuperación de actividad SK aumenta al aumentar la cantidad de NaCl en el caldo de fermentación de partida. Para una concentración 2 M de NaCl se alcanza un máximo en la recuperación parcial de actividad, marcadamente superior al 100% (150,91 ± 24,71%), que disminuye para la concentración

superior, 3 M. En estos últimos casos, la actividad SK se concentra mayoritariamente en el retenido. El balance global del proceso de MFTAV supone, para todas las concentraciones de NaCl ensayadas, pérdidas totales de actividad SK superiores a las obtenidas en ausencia del aditivo representando hasta el $41,95 \pm 13,14\%$ para la concentración 3 M de NaCl.

Tabla 17. Recuperación de actividad SK a partir de caldos de fermentación de estreptococos por MFTAV en presencia de diferentes concentraciones de NaCl.

M	Caldos de fermentación		Permeado (FCV = 8,0)		Retenido (FCV = 8,0)		Recuperación	
	NaCl	USK ml^{-1}	USK ml^{-1}	%	USK ml^{-1}	%	Parcial %	Total %
0		2.195 ± 220	1.164 ± 120	46,39 ± 5,48	6.468 ± 310	36,83 ± 14,13	83,22 ± 9,81	83,22 ± 9,81
0,5		1.777 ± 210	967 ± 210	47,64 ± 11,83	6.299 ± 310	44,32 ± 17,46	91,96 ± 14,65	74,43 ± 12,35
1		1.476 ± 125	762 ± 148	45,18 ± 10,04	6.819 ± 195	57,73 ± 13,21	102,91 ± 11,63	69,22 ± 10,84
2		1.075 ± 232	585 ± 320	47,63 ± 29,80	8.883 ± 211	103,28 ± 19,61	150,91 ± 24,71	73,91 ± 17,38
3		942 ± 210	373 ± 211	34,68 ± 22,35	7.580 ± 95	100,59 ± 10,10	135,27 ± 16,23	58,05 ± 13,14

El análisis por cromatografía de exclusión molecular de las muestras de caldo de fermentación (A) y de retenido al final del proceso de MFTAV (FCV = 8,0) (B) en presencia de las concentraciones 1, 2 y 3 M de NaCl, aparece en las figuras 41, 42 y 43, respectivamente. La agregación de proteínas, según la cuantificación del área relativa (%) de la parte (a) respecto del área total del cromatograma (tabla 18), no presenta cambios importantes en el caldo de fermentación cuando se trata con NaCl, mientras que, en el retenido tras el proceso de MFTAV, a medida que aumenta la concentración de NaCl de partida, se incrementa la intensidad (concentración) de los picos de mayor tamaño molecular (parte (a)) alcanzándose, en todos los casos, niveles superiores a los alcanzados en ausencia de NaCl.

Tabla 18. Efecto del NaCl a diferentes concentraciones sobre la agregación de proteínas en el proceso de MFTAV. Los valores han sido determinados cuantificando el área ocupada por la parte (a) de los cromatogramas obtenidos por exclusión molecular.

Concentración de NaCl			Retenido (FCV = 8,0)	
<i>M</i>	Caldo de fermentación UA · ml	%	UA · ml	%
0	0,096 ± 0,028	4,51 ± 1,09	0,358 ± 0,005	17,95 ± 0,55
0,5	0,098 ± 0,019	4,87 ± 0,93	0,391 ± 0,014	19,35 ± 0,54
1	0,097 ± 0,017	4,78 ± 0,83	0,448 ± 0,006	22,15 ± 0,32
2	0,087 ± 0,019	4,31 ± 0,96	0,546 ± 0,011	27,02 ± 0,55
3	0,087 ± 0,018	4,32 ± 0,87	0,576 ± 0,009	28,53 ± 0,43

UA unidades de Absorbancia.

Los resultados sugieren que la presencia de NaCl en el caldo de fermentación de estreptococos favorece la agregación de proteínas durante el proceso de MFTAV, originando paralelamente rendimientos muy desventajosos para la recuperación de actividad SK.

La pérdida de actividad SK por la adición de NaCl puede provenir de un efecto desestabilizante de la sal sobre la estructura de la enzima. Normalmente, este tipo de efecto en las proteínas conlleva mecanismos electrostáticos y mecanismos caotrópicos (von Hippel y col., 1973; Shih y col., 1992). Los primeros, dependientes del signo y la magnitud de la carga iónica, resultan en interacciones electrostáticas sal-proteína que pueden desestabilizar la conformación de las proteínas al aumentar la repulsión intramolecular. Por el contrario, el efecto caotrópico, dependiente de la naturaleza de los iones, está relacionado con la desorganización de la estructura del agua que tiende a disminuir la hidratación de los grupos no polares de las proteínas desfavoreciéndose, de esta forma, las interacciones hidrofóbicas que estabilizan a las proteínas.

La mayor incidencia de los fenómenos de "polarización de la concentración" y de "ensuciamiento" de la membrana en presencia de NaCl podría ser, al igual que indicábamos para el caso de la urea, el factor responsable del aumento de la agregación de proteínas durante el proceso de MFTAV. EL bloqueo de los poros de la membrana de MF, superficial y/o interno, favorecido por la adición de la sal, puede incrementar el efecto de las fuerzas de cizalla sobre las proteínas, aumentando la tendencia a la agregación; y sobre las células de estreptococos, causando la rotura de las mismas. Esto último permitiría solubilizar moléculas de SK al medio que explicarían las recuperaciones parciales superiores al 100% en el proceso de MFTAV a partir del caldo de fermentación tratado con NaCl a concentraciones ≥ 1 M.

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos establecer que ni la urea ni el NaCl, utilizados como aditivos en el proceso de MFTAV a partir de caldos de fermentación de estreptococos, resultan eficientes, sino por el contrario más bien desventajosos, en el tratamiento de los problemas de colmatación y ensuciamiento que están limitando el funcionamiento de la membrana de MF en cuanto a su capacidad de transmitir proteínas, y que repercuten en la recuperación del producto SK. En relación a la urea, utilizada en concentraciones entre 1 y 2 M, permite recuperar el máximo de actividad SK, pero tal recuperación sigue implicando, entre otras posibilidades, la centrifugación del retenido. No ocurre lo mismo con el NaCl, cuya utilización supone pérdidas de actividad SK muy considerables.

El análisis presentado supone la necesidad de chequear otros aditivos que mejoren la estabilidad y la solubilidad de las proteínas durante la MFTAV, sin que contribuyan excesivamente a la colmatación y al ensuciamiento de la membrana de MF. Una posibilidad es el uso de surfactantes, como por ejemplo polietilenglicol (PEG) ($< 1\%$ w/v), que reducen la tensión superficial de la solución disminuyendo la energía de Gibbs del sistema y con ello las interacciones proteína-proteína, al mismo tiempo que se unen a las

superficies hidrofóbicas de las proteínas, las cuales son sitios potenciales de desnaturalización (Cleland *y col.*, 1993).

Otra opción sería abordar el problema desde la base de los fenómenos de "polarización de la concentración" y de "ensuciamiento" de la membrana, que están determinando la efectividad del proceso de separación a través de la membrana de MF y la estabilidad del producto a recuperar (SK). En este sentido, Rodgers y Miller (1993) han demostrado la efectividad de los pulsos de presión para reducir el bloqueo de los poros de la membrana en procesos de filtración tangencial de soluciones de proteínas. Este procedimiento supone la aplicación periódica de una presión positiva en la línea del permeado del módulo de membrana. El resultado es una presión transmembrana negativa que opera en periodos muy cortos del proceso de filtración removiendo el material acumulado en los poros sin causar daños en la membrana. Por otro lado, Mercille y colaboradores (1994) han conseguido reducir sustancialmente el ensuciamiento de membranas de MF, utilizadas para cosechar células de mamíferos por procesos de MFTAV, suplementando los cultivos celulares con desoxirribonucleasa I (ADNasa I). Esta enzima digiere los fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) procedentes de la rotura de células y que pueden estar contribuyendo al bloqueo de los poros de las membranas (Esclade *y col.*, 1991).

Conclusiones

Los procesos de membrana, microfiltración (MF) y ultrafiltración (UF), en la modalidad tangencial representan una alternativa a considerar para la recuperación de enzimas exocelulares obtenidas vía fermentativa, dado que proporcionan rendimientos comparativamente ventajosos frente a los procedimientos convencionales de centrifugación y precipitación, sobre todo con miras a sus aplicaciones industriales.

A pesar de suponer una metodología viable, tales procesos no dejan de presentar limitaciones, consecuencias de la colmatación superficial y el ensuciamiento interno de las membranas.

Las limitaciones referidas, en el caso concreto de la microfiltración tangencial a alta velocidad (MFTAV) para la clarificación de caldos de fermentación de estreptococos y la recuperación de estreptoquinasa (SK), radican en la disminución de la productividad del proceso (actividad SK recuperada por tiempo de filtración), debido a la caída del flujo del permeado durante el mismo; la necesidad de incorporar un paso adicional, como por ejemplo la centrifugación, para recuperar la totalidad del producto (SK) desde el retenido, dada la recuperación ineficiente en el permeado; y la obtención de rendimientos globales de recuperación inferiores al 100%, ya que se producen pérdidas de actividad SK por daños moleculares a lo largo del proceso.

La pérdida de permeabilidad del caldo de fermentación a través de la membrana de MF parece confirmarse mayormente como un mecanismo de bloqueo de los poros de la membrana que disminuye el espacio libre de los mismos para el paso de la solución. En este bloqueo deben estar contribuyendo tanto las proteínas, depositándose y/o adsorbiéndose sobre todo en las paredes internas de los poros, como los componentes del medio de cultivo junto a las células enteras y los elementos intracelulares procedentes de la rotura de estas últimas, bloqueando la entrada y el interior de los poros.

A lo largo del proceso de MFTAV, las proteínas son retenidas de manera diferente por la membrana de MF. En particular para la SK, tal retención conlleva la concentración significativa de la actividad en el retenido, lo que impide su recuperación eficiente en el permeado.

La retención de proteínas por la membrana no parece obedecer exclusivamente al tamaño y a la carga neta de las proteínas individuales, según se ha demostrado mediante estudios electroforéticos; apuntando, más bien, hacia la implicación de otros mecanismos más complejos tales como la formación de agregados.

El balance de recuperación de SK para el proceso de MFTAV supone una pérdida de actividad medible (alrededor del 13%), debida básicamente a la desnaturalización de la enzima por el estrés de las fuerzas de cizalla presentes en la superficie de la membrana y/o en el entorno de la bomba, la cual origina moléculas de SK total o parcialmente inactivas, como se puede concluir de experimentos de inmunoprecipitación y análisis estructurales, ambos en relación a la SK.

La desnaturalización en general de las proteínas puede ser el factor desencadenante de la agregación de proteínas que está teniendo lugar en el lado externo de la membrana durante el proceso de MFTAV, según se ha corroborado desde medidas de *Light Scattering*.

Los agregados de proteínas formados no pasan a través de la membrana de MF, como se ha demostrado mediante análisis cromatográficos y experimentos de inmunoprecipitación específicos para la SK, pudiendo contribuir a la colmatación de la superficie de la membrana y al bloqueo de los poros de la misma, y, por tanto, a la concentración del producto (SK) en el retenido.

Con el propósito de solucionar o, al menos, mejorar las limitaciones asociadas a la MFTAV para la recuperación de actividad SK a partir de caldos de fermentación de

estreptococos, el proceso se llevó a cabo en presencia de urea y cloruro de sodio (NaCl), dos agentes conocidamente relacionados con la estabilidad y la solubilidad de las proteínas. La urea ejerce un efecto favorable sobre el balance global de recuperación de SK a concentraciones entre 1 y 2 M, mientras que el NaCl resulta claramente desfavorable al respecto.

Dichos aditivos no plantean soluciones adecuadas en relación a los problemas de colmatación y ensuciamiento de la membrana que están limitando el proceso de MFTAV, y que se traducen en perjuicio de los tiempos y costos de operación.

En resumen, la especial susceptibilidad de las proteínas y las enzimas a las condiciones estresantes desencadenadas por el proceso de MFTAV pueden poner en juego la efectividad del mismo, en especial, considerado a niveles industriales.

Bibliografía

Alaiz, M., Navarro, J. L., Girón, J. y Vioque, E. (1992). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *J. Chromatogr.*, **591**: 181-186.

Alouf, J. E. (1980). Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S, erythrogenic toxin). *Pharmacol. Ther.*, **11**: 661-717.

Andrade, J. D., Hlady, V, Wei, A-P., Ho, C-H., Lea, A. S., Jeon, S. I., Lin, Y. S. y Stroup, E. (1992). Protein at interfaces: Principles, multivariate aspects, protein resistant surfaces and direct imaging and manipulation of adsorbed proteins. *Clin. Mater.*, **11**: 67-

Arakawa, T. y Timasheff, S. N. (1982). Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry*, **21**: 6536-

Atha, D. H. y Ingham, K. C. (1981). Mechanism of precipitation of protein by polyethylene glycols. *J. Biol. Chem.*, **256**(23): 12108-12117.

Aunins, J. G. y Wang, D. I. C. (1989). Induced flocculation of animal cells in suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **34**: 629-638.

Bautista, J. (1985). Aportaciones al desarrollo de procesos de alta productividad y bajo consumo energético para la fabricación industrial de enzimas exocelulares purificadas: Aplicaciones al caso de la Hialuronato liasa de *Streptococcus equisimilis*. Tesis doctoral, Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Univ. Autónoma de Madrid.

Bautista, J. y Blanco, J. (1983). Streptokinase recovery by flocculation/sedimentation. Technical Bulletin nº 23, Cyanamic Ibérica S.A., Madrid.

- Bautista, J., Chico, E. y Machado, A.** (1986). Effects of discharged fraction in repeated batch culture for hyaluronate lyase production. *J. Ferment. Technol.*, **64**: 419-424.
- Bautista, J., Chico, E. y Machado, A.** (1986). Cell removal from fermentation broth by flocculation/sedimentation. *Biotechnology Letters*, **8**(5): 315-318.
- Belfort, G.** (1987). Membrane separation technology: An overview. En: *Advanced Biochemical Engineering* (Bungay, H. R. y Belfort, G., eds.), 239-297. Wiley, New York.
- Berg, R. W., Sandine, W. E. y Anderson, A.** (1981). Identification of a growth stimulant for *Lactobacillus sanfrancisco*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**(5): 786-788.
- Bernard, N., Jolival, C. y Schwartzentruber, J.** (1996). Protein precipitation by caprylic acid: Equilibrium composition data. *Biotechnol. Bioeng.*, **49**: 405-411.
- Blanco, J., Del Fresno, B., Suárez, J. y Bautista, J.** (1983). Producción de estreptodornasa por *S. equisimilis* CY-477. Informe 12/83, Cyanamic Ibérica, S. A., Madrid.
- Blank, M.** (1989). Surface forces in the aggregation of membrane proteins. *Coll. Surf.*, **42**: 355-364.
- Blanpain, P., Hermia, J. y Lendel, M.** (1993). Mechanisms governing permeate flux and protein rejection in the microfiltration of beer with cyclopore membrane. *J. Membrane Sci.*, **84**: 37-51.
- Bohdziewicz, J.** (1995). Mass transfer in cross-flow ultrafiltration for technical preparation of proteopol BP-S enzymes. *Process Biochem.*, **30**(4): 361-366.

Bohdziewicz, J. y Bodzek, M. (1994). Ultrafiltration preparation of pectinolytic enzymes from citric acid fermentation broth. *Process Biochem.*, **29**: 99-107.

Bowen, R. (1993). Understanding flux patterns in membrane processing of protein solutions and suspensions. *Trends in Biotechnol.*, **11**(11): 423-428.

Bowen, W. R. y Gan, Q. (1991). Properties of microfiltration membranes: Flux loss during constant pressure permeation of bovine serum albumin. *Biotechnol. Bioeng.*, **38**: 688-696.

Bowen, W. R. y Gan, Q. (1992). Properties of microfiltration membranes: The effects of adsorption and shear on the recovery of an enzyme. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**: 491-497.

Bowen, W. R. y Hall, N. (1995). Properties of microfiltration membranes: Mechanisms of flux loss in the recovery of an enzyme. *Biotechnol. Bioeng.*, **76**: 28-35.

Boyaval, P., Lavenant, C., Gesan, G. y Daufin, G. (1996). Transient and stationary operating conditions on performance of lactic acid bacteria crossflow microfiltration. *Biotechnol. Bioeng.*, **49**: 78-86.

Bradford, M. N. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.

Brockway, W. J. y Castellino, F. J. (1974). A characterization of native streptokinase and altered streptokinase isolated from a human plasminogen activator complex. *Biochemistry*, **13**: 2063-2070.

Campos, M. Ortega, M., Padrón, G., Estrada, M. P., De la Fuente, J. y Herrera, L. (1991). Cloning of coliphage-T4 gene *pse T* and high level synthesis of polynucleotide kinase in *Escherichia coli*. *Gene*, **101**: 127-131.

Castellino, F. J. (1979). A unique enzyme-protein substrate modifier reaction : Plasmin streptokinase interaction. *Trends Biochem. Sci.*, **4**: 1-5.

Castellino, F. J. (1983). *Bioscience*, **33**: 647-650.

Castellino, F. J., Sodetz, J. M., Brockway, W. J. y Siefring, G. E. (1976). Streptokinase. *Method Enzymol.*, **45**: 244-257.

Chandavarkar, A. S. (1990). Dynamics of fouling of microporous membranes by proteins. Ph. D Thesis Massachusetts Institute of Technology.

Chen, V., Kim, K. J. y Fane, A. G. (1995). Effect of membrane morphology and operation on protein deposition in ultrafiltration membranes. *Biotechnol. Bioeng.*, **47**: 174-180.

Cheryan, M. (1986a). Definition and classification of membrane separation processes. En: Ultrafiltration Handbook, 1-26. Technomic: Lancaster, PA, USA.

Cheryan, M. (1986b). Membrane chemistry, structure and function. En: Ultrafiltration Handbook, 27-51. Technomic: Lancaster, PA, USA.

Cheryan, M. (1986c). Ultrafiltration equipment. En: Ultrafiltration Handbook, 127-169. Technomic: Lancaster, PA, USA.

Cheryan, M. (1986d). Ultrafiltration application. En: Ultrafiltration Handbook, 231-350. Technomic: Lancaster, PA, USA.

Cheryan, M. y Mehaia, M. A. (1985). En: *Membrane Separations in Biotechnology* (McGregor, W. C., ed.). Marcel-Dekker, New York.

Chibber, B. A. K., Morris, J. P. y Castellino, F. S. (1985). Effects of human fibrinogen and its cleavage products on activation of human plasminogen by streptokinase. *Biochemistry*, **24**: 3429-3434.

Chibber, B. A. K., Radek, J. T., Morris, J. P. y Castellino, F. J. (1986). Rapid formation of an anion-sensitive active site in stoichiometric complexes of streptokinase and human [Glu¹] plasminogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**: 1237-1241.

Chun, P. W., Fried, M. y Ellis, E.F. (1967). *Anal. Biochem.*, **19**: 481-497.

Cleland, J. L., Powell, M. F. y Shire, S. J. (1993). The development of stable protein formulations: A close look at protein aggregation, deamination and oxidation. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **10**(4): 307-377.

Creighton, T. E. (1985). The problem of how and why proteins adopt folded conformations. *J. Phys. Chem.*, **89**: 2452-

Cullen, D. ... (1987). Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnology*, **5**: 369-375.

Cuperus, F. P. y Nijhuis, H. H. (1993). Applications of membrane technology to food processing. *Trends Food Sci. Technol.*, **4**: 277-282

Curling, J. M. (1980). En: *Methods of plasma protein fractionation*. Academic Press, London.

Datat, R....(1993). Process economics of animal cell and bacterial fermentations: A case study analysis of tissue plasminogen activator. *Biotechnology*, **11**: 340-357.

Da Costa, A. R., Fane, A. G. y Wiley, D. E. (1993). Ultrafiltration of whey protein solutions in spacer-filled flat channels. *J. Membrane Sci.*, **76**: 245-254.

Davis, R. H. (1992). Modeling of fouling of cross-flow microfiltration membranes. *Separation and Purification Methods*, **21**(2): 75-126.

Davis, R. H. y Leighton, D. T. (1987). *Chem. Eng. Sci.*, **42**(2): 275-

Ding, L.H. Jaffrin, M. Y. y Defossez, M. (1993). Concentration polarization formation in ultrafiltration of blood and plasma. *J. Membrane Sci.*, **84**: 293-301.

Drioli, E. (1993). Membranology: An interdisciplinary science. *Russian Chemical Bulletin*, **42**(5): 777-790.

Dumon, S. y Barnier, H. (1992). Ultrafiltration of protein solutions on ZrO₂ membranes. The influence of surface chemistry and solution chemistry on adsorption. *J. Membrane Sci.*, **74**: 289-302.

Esclade, L. R. J., Carrel, S. y Peringer, P. (1991). Influence of the screen material on the fouling of spin filters. *Biotechnol. Bioeng.*, **38**: 159-168.

Estrada, M. P., Hernández, L., Pérez, A., Rodríguez, P., Serrano, R., Rubiera, R., Pedraza, A., Padrón, G. Antuch, W, De la Fuente, J. y Herrera, L. (1992). High level expression of streptokinase in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, **10**: 1138-1142.

Fabian, H., Naumann, D., Misselwitz, R., Ristau, O., Gerlach, D. y Welfle, H. (1992). Secondary structure of streptokinase in aqueous solution: A Fourier transform infrared spectroscopic study. *Biochemistry*, **31**: 6532-6538.

Forman, S. M., De Bernardez, E. R., Fedberg, R. S. y Swartz, R. W. (1990). Crossflow filtration for the separation of inclusion bodies from soluble proteins in recombinant *Escherichia coli* cell lysate. *J. Membrane Sci.*, **48**: 263-279.

Franken, A. C. M., Sluys, J. T. M., Chen, V., Fane, A. G. y Fell, C. J. D. (1990). Role of protein conformation on membrane characteristic. En: Proceedings of Fifth World Filtration Congress, Nice, vol. 1, 207-213. Société Française de Filtration, Cahan, France.

Gabriel, B. y Habib, M. D. (1995). Current status of thrombolysis in acute myocardial infarction. I. Optimal selection and delivery of a thrombolytic drug. *CHEST*, **107**: 225-232.

Green, G. y Belfort, G. (1980). Fouling of ultrafiltration membranes: Lateral migration and the particle trajectory model. *Desalination*, **35**: 129-147.

Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardio (1986). GISSI-1: Efectiveness of intravenous thrombolytic treatment in acute myocardial infarction. *Lancet*, **1**: 397-401.

Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardio (1990). GISSI-2: A factorial randomised trial of alteplase versus streptokinase and heparin versus no heparin among 12490 patients with acute myocardial infarction. *Lancet*, **339**: 65-71.

Hao, Y. L., Ingham, K. C. y Wickerhauser, M. (1980). En: Methods of protein fractionation (Curling J.M., ed.), 57-70. Academic Press, New York.

Heinemann, P., Howell, J. A. y Bryan, R. A. (1988). Microfiltration of protein solution: Effect of fouling on rejection. *Desalination*, **68**: 243-250.

Henry, J. D. y Allred, R. C. (1972). Concentration of bacterial cells by crossflow filtration. *Dev. Ind. Microbiol.*, **13**: 177-

Hermans, P. H. y Bredée, H. L. (1935). Zur kenntniss der filtrationsgesetze. *Rec. Trav. Chim.*, **54**: 680-700.

Hermia, J. (1982). Constant pressure blocking filtration laws. Application to power-law non-newtonian fluids. *Trans. Inst. Chem. E.*, **60**: 183-187.

Hernández-Pinzón, I. y Bautista, J. (1992). Product concentration during tangential-flow microfiltration. *Biotechnology Techniques*, **6**(6): 511-516.

Hernández, L., Rodríguez, P., Castro, A. Serrano, R., Rodríguez, M. N., Rubiera, R., Estrada, M. P., Pérez, A., De la Fuente, J. y Herrera, L. (1990). Determinación de actividad estreptoquinasa utilizando un ensayo cuantitativo. *Biotecnología Aplicada*, **7**(2): 153-160.

Hlavacek, M. y Bouchet, F. (1993). Constant flowrate blocking laws and an example of their application to dead-end microfiltration of protein solutions. *J. Membrane Sci.*, **82**: 285-295.

Hu, W. S. y Peshua, M. V. (1993). Mammalian cells for pharmaceutical manufacturing. *Am. Sc. Microbiol. News*, **59**: 65-68.

Huang, T. T., Malke, H. y Ferretti, J. J. (1989). The streptokinase gene of group A streptococci: Cloning expression in *Escherichia coli*, and sequence analysis. *Mol. Biol.*, **2**(3): 197-205.

Iritani, E., Mukai, Y., Tanaka, Y. y Murase, T. (1995). Flux decline in deand-end microfiltration of protein solutions. *J. Membrane Sci.*, **103**: 181-191.

ISIS-2 Collaborative Group (1988). ISIS-2: Randomized trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both or neither among 17187 cases of suspected acute myocardial infarction. *Lancet*, **2**: 349-360.

ISIS-3 Collaborative Group (1992). ISIS-3: A randomised comparison of streptokinase vs tissue plasminogen activator vs anistreplase and of aspirin plus heparin vs aspirin alone among 41299 cases suspected acute myocardial infarction. *Lancet*, **339**: 753-770.

Jackson, K. W. y Tang, J. (1982). Complete amino acid sequence of streptokinase and its homology with serine proteases. *Biochemistry*, **13**: 2063-2070.

Lee, S. S., Burt, A., Russotti, G. y Buckland, B. (1995). Microfiltration of recombinant yeast cells using a rotating disk dynamic filtration system. *Biotechnol. Bioeng.*, **48**: 386-400.

Kelly, S. T., Opong, W. S. y Zydney, A. L. (1993). The influence of protein aggregates on the fouling of microfiltration membranes during stirred cell filtration. *J. Membrane Sci.*, **80**: 175-187.

Kim, M., Kojima, J., Saito, K. y Furusaki, S. (1994). Reduction of nonselective adsorption of proteins by hydrophilization of microfiltration membranes by radiation-induced grafting. *Biotechnol. Prog.*, **10**: 114-120.

Kristjansson, M. M. y Kinsella, J. E. (1991). Protein and enzyme stability: Structural, thermodynamic and experimental aspects. *Adv. in Food and Nutrition Research*, **35**: 236-316.

Jonsson, G., Li, W. y Johansen, P. L. (1991). Fouling of UF/MF membranes by BSA: Comparison between adsorption type and pore blocking type mechanisms. Proc. NAMS Conference, San Diego, CA, paper 6C, 29-31.

Kaiser, J. M. y Glatz, C. E. (1988). Use of precipitation to alter flux and fouling performance in cheese whey ultrafiltration. *Biotechnology Progress*, **4**(4): 242-247.

Kawakatsu, T., Nakao, S. y Kimura, S. (1993). Effects of size and compressibility of suspended particles and surface pore size of membrane on flux in cross-flow filtration. *J. Membrane Sci.*, **81**: 173-190.

Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H. H. y Buchner, J. (1991). Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology*, **9**: 825-

Kim, K. J., Chen, V. y Fane, A. G. (1993). Some factors determining protein aggregation during ultrafiltration. *Biotechnol. Bioeng.*, **42**: 260-265.

Klein, E., Eichholz, E. y Yeager, D. H. (1994). Affinity membranes prepared from hydrophilic coating on microporous polysulfone hollow fibers. *J. Membrane Sci.*, **90**: 69-80.

Klessen, C. y Malke, H. (1986). Expression of the streptokinase gene from *Streptococcus equisimilis* in *Bacillus subtilis*. *J. Basic Microbiol.*, **26**: 75-81.

Ko, M. K., Pellegrino, J. J., Nassimbene, R. y Marko, P. (1993). Characterization of the adsorption-fouling layer using globular proteins on ultrafiltration membranes. *J. Membrane Sci.*, **76**, 101-120.

- Kondo, A., Oku, S. y Higashitani, K.** (1991). Structural changes in protein molecules adsorbed on ultrafine silica particles. *J. Coll. Interface Sci.*, **143**: 214-
- Kroner, K. H., Schütte, H., Hustedt, H. y Kula, M. R.** (1984). Cross-flow filtration the downstream processing of enzymes. *Process Biochem.*, **4**: 67-74.
- Kula, M. R., Kroner, K. H. y Hustedt, H.** (1982). Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. En: *Advances in Biochemical Engineering* (Fletcher, A., ed.), 73-118. Springer-Verlag, New York.
- Laemli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- LaVallie, E....(1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology*, **11**: 187-193.
- Le, M. S., Spark, L. B., Ward, P. S., Ladwa, N.** (1984). Microbial asparaginase recovery by membrane processes. *J. Membrane Sci.*, **21**: 307-319.
- Leh, B. y Marvin, C.** (1989). The effect of casein hydrolyzates on the lactic acid fermentation. *J. Ind. Microbiol.*, **4**: 71-75.
- Leonhartsberger, S., Lafferty, R. M. y Korneti, L.** (1993). Use of collagen hydrolyzate as a complex nitrogen source for the synthesis of penicillin by *Penicillium Chrysogenum*. *J. Biotech.*, **30**: 299-311.
- Liu, T. Y. y Elliott, S. D.** (1971). Streptococcal proteinase. En: *The enzymes*, vol. 3 (Boyer, P. D., ed.), 609-639. Academic Press. Inc., New York.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Lund, B., Norddahl, B. y Ahring, B.** (1992). Production of lactic acid from whey using hydrolysed whey protein as nitrogen source. *Biotech. Lett.*, **14**(9): 851-856.
- Malke, H., Roe, B. y Ferretti, J. J.** (1985). Nucleotide sequence of the streptokinase gene from *Streptococcus equisimilis* H46A. *Gene*, **34**: 357-362.
- Maron, S. H. y Filisko, F. E.** (1972). *J. Macromol. Sci.*, **6**(1): 79-90.
- Marshall, T. y Williams, K. M.** (1992). Recovery of protein by Coomassie brilliant blue precipitation prior to electrophoresis. *Electrophoresis*, **13**: 887-888.
- Martín, M.** (1982). Streptokinase in chronic arterial diseases. Boca Ratón, Florida: CRC Press, Inc.
- Matsumoto, K., Katsuyama, S. y Ohya, H.** (1987). Separation of yeast by cross-flow filtration with backwashing. *J. Ferment. Technol.*, **65**: 77-83.
- McGregor, W. C.** (1986). Selection and use of ultrafiltration membranes. En: Membrane separation in biotechnology (McGregor, W. C., ed.), 1-36. Marcel Dekker Inc., New York.
- Mehaia, M. A. y Cheryan, M.** (1990). Membrane bioreactors: Enzyme processes. En: Biotechnology and food process engineering (Schwartzberg, H. G. y Rao, M. A., eds.). Marcel Dekker, Inc., New York.
- Meireles, M., Aimar, P. y Sánchez, V.** (1991). Albumin denaturation during ultrafiltration: Effects of operating conditions and consequences on membrane fouling. *Biotechnol. Bioeng.*, **38**: 528-534.

Mercille, S., Johnson, M, Lemieux, R. y Massie, B. (1994). Filtration-based perfusion of hybridoma cultures in protein-free medium: Reduction of membrane fouling by medium supplementation

with DNase I. *Biotechnol. Bioeng.*, **43**: 833-846.

Miekka, S. I. e Ingham, K. C. (1978). *Arch. Biochem. Biophys.*, **203**: 630-641.

Mietton-Peuchot, M. (1984). Interface phenomena in cross-flow microfiltration. En: Research and Developments in Filtration (Hermia, J., ed.), 189-201, Société Belge de Filtration. Louvain-La-Neuve, Belgium.

Miller, K. D., Weitzel, S. y Rodgers, V. G. J. (1993). Reduction of membrane fouling in the presence of high polarization resistance. *J. Membrane Sci.*, **76**: 77-83.

Milligan, T. W., Doran, T.I., Straus, D. C. y Mattingl, S. L. (1978). *J. Clin. Microbiol.*, **7**(1): 28-33.

Myers, C. D. (1990). Study of thermal analysis. En: . Thermal Analysis of Food (Harwalkar, V. R. y Ma, C. Y., eds.), 2, 16-30. Elsevier Science Publishers, London.

Nagata, N., Herouvis, K. J., Dziewulski, D. H. y Belfort, G. (1989). Cross-flow membrane microfiltration of a bacterial fermentation broth. *Biotechnol. Bioeng.*, **34**: 447-466.

Norde, W. (1986) Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Adv. Coll. Interface Sci.*, **25**: 267-

Opong, W. S. y Zydney, A. L. (1991). Hydraulic permeability of protein in layers deposited during microfiltration. *J. Coll. Interf. Sci.*, **142**: 41-60.

Ozegowski, J. H., Gerlach, D. y Koeler, W. (1981). *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.*, **249**: 310-322.

Pace, C. N., Shirley, B. A. y Thomson, J. A. En:... Measuring the conformation stability of a protein, 13, 311-330.

Paques, E. P. (1986). Streptokinase or urokinase: The choice between them. *Haemostasis*, **16**(3): 21-24.

Paredi, M. E., Tomas, M. C., De Vido de Mattio, N., Crupkin, M. y Añón, M. C. (1995). Postmortem changes in adductor muscles from *Aulacomya ater ater* (Molina) stored at 2-4°C. A differential scanning calorimetric study. *J. Agric. Food Chem.*, **43**: 1758-1761.

Parrado, J., Conejero-Lara, F., Smith, R. A. G., Marshall, J. M., Ponting, C. P. y Dobson, C. M. (1996). The domain organization of streptokinase: Nuclear magnetic resonance, circular dichroism and functional characterization of proteolytic fragments. *Protein Science*, **5**: 693-704.

Parrado, J., Millán, F., Hernández-Pinzón, I., Bautista, J. y machado, A. (1993). Sunflower peptones: Use as nitrogen source for the formulation of fermentation media. *Process Biochem.*, **28**: 109-113.

Perczel, A., Park, K. y Fasman, G. D. (1992). Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: A practical guide. *Anal. Biochem.*, **203**: 83-93.

Perea, A., Ugalde, U., Rodriguez, I. y Serra, J. L. (1993). Preparation and characterization of whey protein hydrolyzates: Applications in industrial whey bioconversion processes. *Enzyme Microb. Technol.*, **15**: 418-423.

Persson, K. M., Campanelli, G., Bottino, A. y Trägårdh, G. (1993a). Porosity and protein adsorption of four polymeric microfiltration membranes. *J. Membrane Sci.*, **76**: 61-71.

Persson, K. M. y Gekas, V. (1994). Factors influencing aggregation of macromolecules in solution. *Process Biochem.*, **29**: 89-98.

Persson, K. M., Trägårdh, G. y Desmek, P. (1993b). Fouling behaviour of silica on four different microfiltration membranes. *J. Membrane Sci.*, **76**: 51-60.

Petenate, A. M. y Glatz, C. E. (1983). Isoelectric precipitation of soy proteins. I. Factors affecting particle size distribution. *Biotechnol. Bioeng.*, **25**: 3049-3058.

Privalov, P. L. (1979). Stability of proteins. Small globular proteins. *Adv. Prot. Chem.*, **33**: 167-241.

Privalov, P. L. (1980). Scanning microcalorimeters for studying macromolecules. *Pure Appl. Chem.*, **52**: 479-497.

Privalov, P. L. (1982). Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system. *Adv. Prot. Chem.*, **35**: 1-104.

Quirk, A. V. y Woodrow, J. R. (1983). Investigation of the parameters affecting the separation of bacterial enzyme from cell debris by tangential flow filtration. *Enz. Microb. Tech.*, **6**: 201-206.

Radek, J. T. y Castellino, F. J. (1989). Conformational properties of streptokinase. *J. Biol. Chem.*, **264**: 9915-9922.

Reddy, K. N. N. (1988). Streptokinase biochemistry and clinical application. *Enzyme*, **40**: 79-89.

Redkar, S. G., Davis, R. H. (1993). Crossflow microfiltration of yeast suspensions in tubular filters. *Biotechnol. Prog.*, **9**: 625-634.

Redpath, N. T. (1992). High-resolution one-dimensional polyacrylamide gel isoelectric focusing of various forms of elongation factor-2. *Anal. Biochem.*, **202**: 340-342.

Richardson, J. S., Richardson, D. C., Tweedy, N. B., Gernert, K. M., McClain, R. D., Donlan, M. E. y Suries, M. C. (1992). Looking at proteins: Representations, folding, packing and desing. *Biophys. J.*, **63**: 1186-1220.

Rodgers, V. G. J. y Miller, K. D. (1993). Analysis of steric hindrance reduction in pulsed protein ultrafiltration. *J. Memb. Sci.*, **85**: 39-58.

Romero, C. A. y Davis, R. H. (1988). *J. Membrane Sci.*, **39**: 157-185.

Rosen, C. G. (1984). Cell harvest: Advances in centrifugal separation. En: *Biotech'84*, 317-330. Online Publications, Pinner, UK.

Sadana, A. (1992). Protein adsorption and inactivation on surface. Influence of heterogeneities. *Chem. Rev.*, **92**: 1799-1818.

Sánchez, V. y Gekas, V. (1992). Influencia de la estructura de la membrana sobre las propiedades de transporte en la ultrafiltración. *Ingeniería Química*, Junio: 243-248.

Sánchez-Ruiz, J. M., López-Lacomba, J. L., Cortijo, M. y Mateo, P. L. (1988). Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. *Biochemistry*, **27**: 1648-1652.

Shmitz, P. y Houi, D. (1991). Modelling particle accumulation on a filter surface. En: *Particles on Surfaces*, vol. 3 (Mittal, K. L., ed.), 29-34. Plenum Press, New York.

Schmitz, P., Wandelt, B., Houi, D. y Hildenbrand, M. (1993). Particle aggregation at the membrane surface in crossflow microfiltration. *J. Membrane Sci.*, **84**: 171-183.

Scott, J. A. (1988). Application of cross-flow filtration to cider fermentations. *Process Biochem.*, October: 146-148.

Shih, Y. C., Prausnitz, J. M. y Blanch, H. W. (1992). Some characteristics of protein precipitation by salts. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**: 1155-1164.

Shimizu, Y., Rokudai, M., Tohya, K., Kayawake, E., Yazawa, T., Tanaka, H. y Eguchi, K. (1990). Effect of membrane resistance on filtration characteristics for methagenic waste. *Kagakukogaku Ronbunshu*, **16**: 145-151.

Shimizu, Y., Shimodera, K. y Watanabe, A. (1993). Cross-flow microfiltration of bacterial cells. *J. Ferment. Bioeng.*, **6**(6): 493-500.

Shimizu, Y. Shimodera, K. y Watanabe, A. (1994). Influence of shear breakage of microbial cells on cross-flow microfiltration flux. *J. Ferment. Bioeng.*, **78**(2): 170-174.

Sims, K. A. y Cheryan, M. (1992). Continuous production of glucose syrup in an ultrafiltration reactor. *J. Food Sci.*, **57**(1): 163-166.

Shortle, D., Chan, H. S. y Dill, K. A. (1992). Modeling effects of mutations on the denatured states of proteins. *Protein Sci.*, **1**: 201-215.

Sprecher, E. (1984). Die produktion von Arzneisffen durch mikroorganismen-Voraussetzungen, Möglichkeiten und grenzen. En: *Biogene Arzneistoffe. Ent micklungen*

auf dem Gebiet der Pharmazeutischen Biologie, Phytochemie und Phytotherapie (Czygan, F. C., ed.), 117-142. Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig, Wiesbaden.

Steadman, B. L., Thompson, K. C., Middaugh, C. R., Matsuno, K., Vrona, S., Lawson, E. Q. y Lewis, R. V. (1992) The effects of surface adsorption on the thermal stability of proteins. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**: 8-15.

Takahashi, K y Sturtevant, J. M. (1981). Thermal denaturation of *Streptomyces* subtilisin inhibitor, subtilisin BPN' and the inhibitor-subtilisin complex. *Biochemistry*, **20**: 6185-6190.

Tanaka, T., Kamimura, R., Itoh, K. y Nakanishi, K. (1993). Factors affecting the performance of cross-flow filtration of yeast cell suspension. *Biotechnol. Bioeng.*, **41**: 617-624.

Tanny, G. B., Havk, D. y Merin, V. (1982). Biotechnological applications of a pleated crossflow microfiltration module. *Desalination*, **41**: 299-312.

Taylor, F. B. y Comp, P. C. (1978). Biochemistry of streptokinase. En: Fibrinolytics and antifibrinolytics (Mark Wardt, F., ed.), 137-?. Springer-Verlag, New York.

Tchorvanov, B. y Lazarova, G. (1988). Evaluation of protein hydrolyzates using the fermentation activity of immobilized yeast cells. *Biotech. Appl. Biochem.*, **10**: 301-304.

Teuten, J. A., Broadhurst, R. W., Smith, R. A. G. y Dobson, C. M. (1993). Characterization of structural and folding properties of streptokinase by NMR spectroscopy. *Biochem. J.*, **290**: 313-319.

Towbin, J., Staehelin, T. y Gordon, J. (1981). Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody radioiodinated protein. *A. Anal. Biochem.*, **112**: 195-203.

Truskey, G. A., Gabler, R., Dileo, A. y Manter, T. (1987). The effect of membrane filtration upon protein conformation. *J. Parenteral Sci.*, **41**: 180-193.

Vainerman, E. S., Kurskaya, E. A. y Rogozhin, S. V. (1989). The effect of self-association of proteins on their electrostatic complexation. *Abh. Akad. Wiss. DDR, Abt. Math. Naturwissen-Tech.*, **1N**: 85-91.

van Reis, R., Leonard, L. C., Hsu, C. C. y Builder, S. E. (1991). Industrial scale harvest from mammalian cell culture by tangential flow filtration. *Biotechnol. Bioeng.*, **38**: 413-422.

Viehweg, H. y Shuegerl, K. (1983). Cell recovery by continuous flotation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**: 96-102.

von Hippel, P. H., Peticolas, V., Schack, L., Karlson, L., Hamabata, A. y Chang, S. (1973). Model studies on the effects of neutral salts on the conformational stability of biological macromolecules. Parts I, II, III. *Biochemistry*, **12**: 1256-1282.

Wahlgren, M. y Arnebrant, T. (1991). Protein adsorption to solid surfaces. *Tibtech*, **9**: 201-

Walsh, G. y Headon, D. R. (1994). En: Protein Biotechnology. Wiley, J. & Sons. England.

Wandelt, B., Houi, D. y Schmitz, P. (1992). Micro and ultrafiltration of dilute suspensions: NMR microimaging of deposit formation in hollow fibers. *Proc.*

Euromembrane, Récent Progrès en Génie des Procédés, Aimar, P. y Aptel, P. (eds.), **6**: 251-256.

Wang, H. Y. (1983). Down-stream processes in biotechnology. *Annals New York Academic Science*, **413**: 313-321.

Welfle, H., Misselwitz, R., Fabian, H. y Damerau, W. (1992a). Conformational properties of streptokinase-secondary structure and localization of aromatic amino acids. *Int. J. Biol. Macromol.*, **14**: 9-18.

Welfle, K., Pfeil, W., Misselwitz, R. y Welfle, H. (1992b). Conformational properties of streptokinase-differential scanning calorimetric investigations. *Int. J. Biol. Macromol.*, **14**: 19-22.

Whitaker, J. R. y Granum, P. E. (1980). An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal. Biochem.*, **109**: 156-159.

Wijmans, J. G., Nakao, S. y Smolders, C. A. (1984). Flux limitation in ultrafiltration: Osmotic pressure model and gel layer model. *J. Membrane Sci.*, **20**: 115-124.

Wiseman, A. (1987). *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2ª edn. John Wiley, Chichester.

Wong, S-L, Ye, R. y Nathoo, S. (1994). Engineering and production of streptokinase in a *Bacillus subtilis* expression-secretion system. *Appl. Env. Microbiol.*, February: 517-523.

UNIVERSIDAD DE GUATEMALA

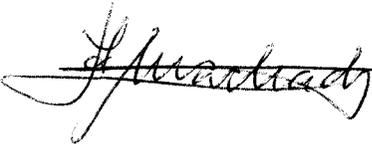
Reunido el Tribunal de Examen de Tesis de Grado firmantes
en el día de la fecha, para la defensa de Tesis Doctoral de
Dña. Inmaculada Hernández-Pineda TOSCANO
tema: DESACTIVACION ENZIMATICA Y PERDIDA DE
ACTIVIDAD EN LOS PROCESOS DE MICROFILTRACION
TANGENCIAL A ALTA VELOCIDAD.
asumió el grado de Doctor en Ciencias APTO "CUM LAUDE"

Guatemala, 21 de FEBRERO 1997

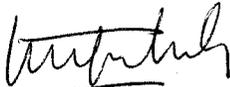
El Vocal,



El Presidente,



El Vocal,



El Secretario,



El Vocal,



El Doctor,

