



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**POSGRADO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y USO
INTEGRAL DEL AGUA**

**SEPARACIÓN DE PROTEÍNA DE SUERO DE QUESO
MEDIANTE EXTRACCIÓN ACUOSA EN DOS FASES**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y USO INTEGRAL DEL
AGUA**

PRESENTA

RICARDO DOMINGUEZ PUERTO

Bajo la supervisión de: **DR. SALVADOR VALLE GUADARRAMA**

Chapingo, Texcoco de Mora, México, diciembre de 2017



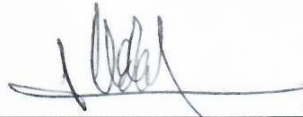
DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

SEPARACIÓN DE PROTEÍNA DE SUERO DE QUESO MEDIANTE
EXTRACCIÓN ACUOSA EN DOS FASES

Tesis realizada por Ricardo Domínguez Puerto bajo la dirección del comité asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito para obtener el grado
de:

DOCTOR EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y USO INTEGRAL DEL AGUA

DIRECTOR



DR. SALVADOR VALLE GUADARRAMA

ASESOR



DRA. DIANA GUERRA RAMÍREZ

ASESOR



DR. FEDERICO FÉLIX HAHN SCHLAM

LECTOR EXTERNO:



DR. IRÁN ALÍA TEJACAL

DATOS BIOGRÁFICOS

Ricardo Domínguez Puerto nació en Arriaga, Chiapas, el 15 de noviembre de 1986, inició sus estudios en la escuela primaria Federal “Venustiano Carranza”. Cursó secundaria en la escuela “Secundaria Técnica No.13”. Posteriormente estudió en la “Preparatoria Jorge H. Bedwell” en la ciudad de Arriaga, Chiapas. En el año 2005 ingresó al Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, donde realizó sus estudios de Licenciatura en Ingeniería en Bioquímica, mismos que concluyeron en el año 2010. El tema de tesis que desarrolló para concluir su licenciatura fue “Isotermas de adsorción y características del secado por microondas del nopal verdura (*Opuntia ficus indica*)”. Durante el periodo de 2011-2013 realizó sus estudios de Maestría en Bioprocesos en la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del IPN; en este periodo desarrolló el tema de investigación “Adaptación y aplicabilidad del ADM1 a la digestión anaeróbica termofílica de pollinaza”. En el año 2013 ingresó al programa de Posgrado en Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua para realizar sus estudios de Doctorado en la orientación de Biosistemas. La investigación que desarrolló para obtener el grado fue “Separación de la proteína de suero de queso mediante extracción acuosa en dos fases”.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento que me otorgaron a través de la beca de estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo y en particular al Posgrado en Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su programa de estudios.

Al laboratorio de atmósferas modificadas del Departamento de Ingeniería Agroindustrial por permitirme desarrollar parte de esta tesis.

A la Unidad Tecnológica Lechera (UTL) de la Universidad Autónoma Chapingo por proporcionarme el material de investigación.

Al laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Preparatoria Agrícola y a las personas que laboran ahí, por brindarme el apoyo y confianza para usar sus instalaciones.

Al Dr. Salvador Valle Guadarrama por su confianza, dirección, apoyo, revisión y acertados consejos para la realización de esta investigación.

A la Dra. Diana Guerra Ramírez por su apoyo, asesoría y entusiasmo durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Federico Félix Hahn Schlam por su participación, apoyo y revisión de este trabajo.

Al Dr. Irán Alia Tejacal por su importante contribución en la revisión y mejora del documento de tesis.

A las personas que de manera indirecta brindaron su apoyo para concluir exitosamente este trabajo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	III
SEPARACIÓN DE LA PROTEÍNA DE SUERO DE QUESO MEDIANTE LA EXTRACCIÓN ACUOSA EN DOS FASES	1
RESUMEN.....	1
¹ TESISTA, ² DIRECTOR DE TESIS	1
CAPÍTULO 1	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
OBJETIVOS.....	8
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
REFERENCIAS.....	9
CAPÍTULO 2	16
REVISIÓN DE LITERATURA	16
2.1. SUERO DE QUESO	16
2.2 PROCESOS PARA CONCENTRAR EL SUERO DE QUESO	19
2.3 SUERO DE QUESO COMO POTENCIAL CONTAMINANTE	21
2.4 FUNDAMENTOS DE LOS SISTEMAS DE EXTRACCIÓN ACUOSA EN DOS FASES (ATPE).	22
2.5 DIAGRAMA BINODAL	24
2.6 APLICACIÓN DE ATPE EN LA SEPARACIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS.....	27
2.7 LA APLICACIÓN DE LOS SISTEMAS ATPE EN EL FRACCIONAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DEL SUERO DE QUESO.	28
2.8 SULFATO DE AMONIO COMO COMPONENTE PARA SISTEMAS ATPE.....	48
2.10 REFERENCIAS.....	51
CAPÍTULO 3	61
PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUERO DE QUESO MEDIANTE EXTRACCIÓN ACUOSA EN DOS FASES	61
RESUMEN.....	61
ABSTRACT	62
3.1. INTRODUCCIÓN	62

3.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	64
3.2.1.	Suero de queso.....	64
3.2.2.	Diagrama binodal de fases.....	64
3.2.3.	Líneas de operación.....	65
3.2.4.	Análisis de partición de volúmenes	67
3.2.5.	Sistemas ATPE basados en AS-PEG4-suero	67
3.2.6.	Variables respuesta.....	68
3.2.7.	Análisis de datos	68
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
3.3.1.	Composición del suero de queso.....	69
3.3.2.	Diagrama binodal de fases.....	69
3.3.3.	Líneas de operación.....	71
3.3.4.	Partición de volúmenes	73
3.3.5.	Separación de proteína de suero.....	75
3.3.6.	Variación del pH	80
3.4.	CONCLUSIONES.....	81
3.5	REFERENCIAS.....	82
CAPÍTULO 4		88
PARTICIÓN DE PROTEÍNA DE SUERO DE QUESO EN UN SISTEMA DE EXTRACCIÓN ACUOSA EN DOS FASES		88
RESUMEN.....		88
ABSTRACT		89
4.1 INTRODUCCIÓN		90
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS		91
4.2.1 Suero de leche.....		91
4.2.2 Diagrama binodal de fases.....		91
4.2.3. Línea de operación.....		93
4.2.4 Parámetros de partición		93
4.2.5 Variables respuesta		94
4.2.6 Análisis de datos		94
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		95
4.3.1 Composición del suero de queso.....		95
4.3.2. Condiciones de equilibrio monofásico-bifásico		95
4.3.3. Relación de separación de volúmenes		100
4.3.4. Concentración de proteína y lactosa		101
4.4 CONCLUSIONES.....		109
4.5 REFERENCIAS		110
CONCLUSIONES GENERALES		115
RECOMENDACIONES		116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Métodos fisicoquímicos de procesamiento de suero. Adaptado de Yadav et al. (2015)	19
Figura 2 Ilustración del diagrama de fase. La fase inferior polímero/sal X (% w/w) es trazada sobre la abscisa y el polímero de la fase superior Y (% w/w) es trazada hacia la ordenada. X, Y y Z representan las composiciones totales de los tres sistemas sobre la misma línea de operación con diferente relación de volumen. La composición final de la fase superior e inferior es representada por los nodos T y B (verde) respectivamente. El punto crítico es representado por C. La línea binodal es representada por la línea discontinua (--). Tomado de (Kaul, 2000)	25
Figura 3 Clasificación de los aniones y cationes de acuerdo a sus propiedades caotrópicas/cosmotrópicas(Yang, Liu, Chen, & Halling, 2010).....	49
Figura 4 (a) Diagrama binodal de fases y ajuste de datos a la ecuación de Merchuk et al. (1998). Las repeticiones 1 a 3 corresponden a rutinas experimentales. (b) Comparación de la curva binodal obtenida en el presente trabajo con otros resultados para observar efecto de temperatura. GA son curvas construidas con datos de González-Amado et al. (2016).	70
Figura 5 (a) Diagrama de fases del sistema $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -PEG4000 a 25 °C. Los subíndices t y b corresponden a las fases superior e inferior, respectivamente. (b) Relación entre la partición de volúmenes (R) y la concentración de Peg4 para sistemas ATPE preparados con agua y suero como disolvente. MPm corresponde al punto medio de TL_{main}	73
Figura 6 Relación entre la longitud de la línea de operación y la concentración de sulfato de amonio (AS) y PEG 4000 (Peg4) para obtener partición de volúmenes $R = 1$	75
Figura 7 Efecto de la concentración de Peg4 sobre la variación de la concentración de proteína (a) y lactosa (b), sobre el rendimiento de separación (c) y sobre los coeficientes de partición (d) de estos productos en sistemas ATPE. Los números encerrados en círculos identifican los sistemas ATPE señalizados en la Figura 5..	78
Figura 8 Valores de pH en sistemas ATPE desarrollados con suero de queso, sulfato de amonio y polietilenglicol.....	80
Figura 9 Sistemas evaluados para encontrar la línea binodal. Concentraciones AS/proteína (%/%) : R1= 14-20 /0.91; R2= 15-21 /0.55; R3= 16-22 /0.36; R4= 18-24 /0.18; R5= 20-26 /0.09; R6= 14-20 /0.045; R7= 20-30 /0.018; R8= 14-20 /9.68x10 ⁻³	92
Figura 10 Diagrama binodal de fases y sistemas experimentales evaluados.....	96
Figura 11. Comparación de curvas binodales para sistemas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /PEG ₄₀₀₀ , proteína/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	98

Figura 12 Comparación de curvas de solubilidad para lisozima/diferentes sales de Shih, Prausnitz, y Blanch (1992), Hirata et al. (2017) y la curva binodal de este trabajo.	99
Figura 13 Volúmenes de separación de los sistemas experimentales proteína/sulfato de amonio.....	100
Figura 14 Concentración de lactosa en la fase superior e inferior de los sistemas evaluados.	102
Figura 15 Concentración de proteína en la fase superior e inferior de los sistemas evaluados.	104
Figura 16 Coeficiente de partición para los sistemas evaluados.	105
Figura 17 Rendimiento para la fase superior de los sistemas experimentales evaluados	107
Figura 18 Rendimiento para la fase inferior de los sistemas experimentales evaluados	108

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Principales componentes del suero de queso	17
Tabla 2 Características fisicoquímicas de las principales proteínas del suero de queso ..	17
Tabla 3 Funciones biológicas de las proteínas del suero de queso.....	18
Tabla 4 Sistemas ATPE aplicados a la extracción de las proteínas del suero de queso ..	39
Tabla 5 Diagramas binodales disponibles en la literatura	42
Tabla 6 Parámetros de la ecuación de Merchuk et al. (1998) y áreas bajo la curva (AUC, % ²) correspondientes a diagramas binodales de fase construidos a 25 °C con sulfato de amonio y PEG de diferente peso molecular.....	72

SEPARACIÓN DE LA PROTEÍNA DE SUERO DE QUESO MEDIANTE LA EXTRACCIÓN ACUOSA EN DOS FASES

Ricardo Domínguez Puerto¹, Salvador Valle Guadarrama², Diana Guerra Ramírez,
Federico Hahn Schlam

RESUMEN

El suero de queso es un subproducto abundante de la industria de procesamiento de queso. Recientemente, su estudio ha causado interés porque contiene compuestos importantes para la industria farmacéutica y alimentaria. Uno de los principales componentes del suero de leche son las proteínas; estas macromoléculas tienen un importante valor nutricional, biológico y terapéutico. Una de las principales limitaciones para su uso es que están diluidas, por lo que es necesario desarrollar un método para concentrarlas. El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la separación de proteínas de suero de leche y lactosa del suero de queso panela mediante extracción acuosa en dos fases. En la primera etapa de esta investigación, los componentes utilizados para la separación fueron PEG4000 (P4) y sulfato de amonio (AS); en el segundo, solo se utilizó AS. En el sistema AS/P4, el rendimiento de proteína aumentó a medida que se redujo la concentración de P4 o aumentó AS, el rendimiento máximo de proteína fue de alrededor del 90%. Cuando solo se utilizó AS, se formó un sistema acuoso bifásico y se lograron rendimientos de proteína de aproximadamente 80 %. De esta forma, se puede concluir que la separación acuosa en dos fases es un método potencial para la purificación y concentración de las proteínas de suero de leche.

Palabras clave: Extracción acuosa en dos fases, proteínas del suero de queso, diagramas de equilibrio, selección de alto impacto, ATPE proteína/sal.

¹ Tesista, ² Director de tesis

SEPARATION OF CHEESE WHEY PROTEIN THROUGH AQUEOUS TWO-PHASES EXTRACTION

Ricardo Domínguez Puerto, Salvador Valle Guadarrama, Diana Guerra Ramírez,
Federico Hahn Schlam

ABSTRACT

Cheese whey is an abundant by-product from the cheese processing industry. Recently his study has caused interest because it contains important compounds for the pharmaceutical and food industry. One of the main components of whey are proteins; these macromolecules have important nutritional, biological and therapeutic value. One of the main limitations for its use is that they are diluted, so there is a need to develop a method to concentrate them. The main goal of this work was to study the separation of whey proteins and lactose from basket cheese whey through aqueous two phase extraction. In the first stage of this research, the components used for the separation were PEG4000 (P4) and ammonium sulfate (AS); in the second one, only AS was used. In system AS/P4 yield of protein increased as the concentration of P4 was reduced or AS increased, maximum yield of protein was around 90 %. When only AS was used, an aqueous two phase system was formed and protein yields of about 80% were achieved. In this way, it can be concluded that aqueous separation in two phases is a potential method for the purification and concentration of the whey proteins.

Key words: Aqueous two-phase extraction, whey proteins, equilibrium diagram, high throughput screening, ATPS protein / salt.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las industrias procesadoras de alimentos, como son las plantas procesadoras de lácteos y queso, generan grandes volúmenes de desechos líquidos incluyendo suero de queso (Yadav et al., 2015). Estos volúmenes generados representan un significativo impacto ambiental. La presencia de los nutrientes contenidos en el suero de queso es considerada como una fuente potencial para la producción de varios productos con valor agregado (Yadav et al., 2015). El suero de queso tiene una proporción baja de proteínas, pero éstas poseen una calidad nutritiva superior a la de las caseínas que conforman el queso (Dergal, 2006) y han sido reportadas por tener utilidad en diferentes aplicaciones como efectos en los huesos, músculos, sangre, cerebro, sistema inmune, cáncer, infecciones y sanación de heridas (Pihlanto, 2011). Por estas razones, el suero de queso es un material de desecho que puede ser aprovechado al recuperar las proteínas, reduciendo al mismo tiempo su impacto al ambiente.

La composición química y funcionalidad de las proteínas del suero y péptidos puede afectarse por el método usado en el proceso de concentración de las mismas (Tovar Jiménez, Arana Cuenca, Téllez Jurado, Abreu Corona, & Muro Urista, 2012). Por ello debe ser implementado un método adecuado para su aprovechamiento y recuperación.

Los sistemas de extracción acuosa en dos fases (ATPE, por sus siglas en inglés) constituyen una tecnología de separación que ha sido usada para desarrollar bioprocesos para la recuperación primaria y purificación parcial de una variedad de

productos biológicos, como proteínas, material genético, bionanopartículas, fitoquímicos, células y organelos celulares (Benavides, Rito-Palomares, & Asenjo, 2011). En un sistema ATPE ocurre una separación líquido-líquido mediante mezclas basadas principalmente en dos polímeros o un polímero y una sal, que en ciertas concentraciones producen una solución verdadera en una sola fase, pero en otras causan la formación de dos fases inmiscibles, entre las cuales se reparten las biomoléculas presentes en la mezcla (Raja, Murty, Thivaharan, Rajasekar & Ramesh, 2011).

La selección del tipo de sistema ATPE depende del tipo de biomolécula y consideraciones económicas. Debido al alto costo y alta viscosidad de los sistemas ATPE polímero/polímero, los sistemas ATPE preferidos son aquellos tipo sal/polímero (Raja, Murty, Thivaharan, Rajasekar, & Ramesh, 2011). Las principales ventajas de esta técnica incluyen potencial de escalamiento, capacidad para integrar el proceso, uso de componentes de baja toxicidad química y biocompatibilidad (Benavides et al., 2011). El agua es el principal componente del sistema, el cual genera un ambiente amigable para las biomoléculas, de forma que se puede estabilizar su estructura y actividad biológica (Iqbal et al., 2016).

Las proteínas del suero de queso con mayor concentración son α -lactalbúmina, β -lactoglobulina y albúmina de suero bovino (BSA) con 60, 30 y 6 % respectivamente (Capezio, Romanini, Picó, & Nerli, 2005). Se ha estudiado la partición de estas proteínas usando sistemas ATPE (Alcântara et al., 2014; Alcântara et al., 2011; Alves, Chumpitaz, da Silva, Franco, & Meirelles, 2000; Anandharamakrishnan, Raghavendra, Barhate, Hanumesh, & Raghavarao, 2005; Boaglio, Bassani, Picó, & Nerli, 2006; Capezio et al., 2005; Chen, 1989; da Silva & Meirelles, 2000; Farruggia, Nerli, & Picó, 2003; Jara & Pilosof, 2011; Jyh-Ping, 1992; Kalaivani & Regupathi, 2015; Lu, Yang, Zhao, & Xia, 2010; Marcos, Fonseca, Ramalho, & Cabral, 1998; Mokhtarani, Mortaheb, Mafi, & Amini, 2011; Nandini & Rastogi, 2011; Perumalsamy

& Batcha, 2011; Rodrigues, Venâncio, & Teixeira, 2001; Zhang, Jiang, Feng, Qu, & Li, 2016; Zuñiga, Coimbra, & Minim, 2001) con resultados potenciales. Los sistemas polímero/sal se han utilizado con mayor frecuencia para lograr este objetivo. El polímero y la sal de mayor uso son el polietilenglicol (PEG) y el fosfato de potasio (en mezcla KH_2PO_4 - K_2HPO_4) como componentes en sistemas ATPE para el estudio de partición de proteínas del suero de queso. Se han reportado ampliamente diagramas de equilibrio usando como componente salino sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (de Lemos et al., 2010; Fu, Yang, & Xiu, 2015; Gao, Peng, Li, & Li, 1991; González-Amado, Rodil, Arce, Soto, & Rodríguez, 2016; Huddleston, Willauer, & Rogers, 2003; Khayati & Shahriari, 2016; Murari et al., 2015; Snyder, Cole, & Sziag, 1992; Voros, Proust, & Fredenslund, 1993). Sin embargo, para la partición de las proteínas del suero de queso este tipo de sales ha tenido una aplicación muy limitada. De 22 trabajos de investigación revisados, sólo dos reportan el uso $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, los cuales se describen a continuación. Rodrigues et al. (2001) usó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una concentración fija de 14 % para todos los experimentos de partición, limitando el área de efecto de esta sal. Anandharamakrishnan et al. (2005) usó un sistema $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{PEG}_{4000}$ (14.26/17.88%) y cuatro sistemas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{PEG}_{6000}$ (9.44/10.04, 10.87/12.70, 12.46/15.30, 14.26/17.88 %) con un rango limitado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 9.44 a 14.26 %. Una observación importante es que ninguno de los trabajos mencionados reporta el estudio de la partición de la lactosa contenida en el suero de queso, que se encuentra en alta concentración (Kalaivani & Regupathi, 2015) y que puede ser un componente indeseable en el aprovechamiento de las proteínas del suero de queso, en virtud de que muchas personas alrededor del mundo padecen intolerancia a este disacárido (Jelen & Tossavainen, 2003). Con base en la revisión de los trabajos de investigación anteriores, se puede considerar al sistema ATPE polímero/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como una oportunidad que se ha usado muy limitadamente para explorar el comportamiento de la partición de las proteínas del suero de queso.

El sulfato de amonio es una sal que tiene muchas propiedades; es estabilizante para la estructura de las proteínas, muy soluble, relativamente barato, en estado puro está fácilmente disponible, y la densidad de una solución saturada (4.1 M) a 25 °C ($\rho=1.235 \text{ g mL}^{-1}$) no es tan alta como el fosfato de potasio (3M, $\rho=1.33 \text{ g mL}^{-1}$; Burgess, 2009).

De acuerdo con la revisión de literatura hecha, el presente trabajo de investigación usó un sistema ATPE como herramienta para la separación de las proteínas contenidas en el suero de queso, proponiendo un sistema polímero/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se atendieron dos fases principales.

La primera fase consideró un sistema ATPE polímero/sal, en el cual los componentes usados fueron PEG₄₀₀₀ y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Este sistema se eligió con base en las propiedades reportadas de cada uno. Como parte de la fase experimental, se construyó un diagrama de equilibrio con ambos componentes y usando agua desionizada como solvente. Se construyó una curva de equilibrio o curva binodal por el método punto de turbidez (Kaul, 2000). Se caracterizó el diagrama de equilibrio usando líneas de operación en puntos equidistantes y se determinó el punto crítico. Se eligieron seis sistemas sobre la línea binodal para estudiar la partición de la proteína en las fases.

La segunda fase de experimentación consistió en eliminar el uso del PEG como componente para formar un sistema ATPE, con el objetivo de evitar pasos de purificación del PEG de la proteína posteriores y resolver las desventajas de viscosidad que presenta el uso del polímero. Se logró sustituir el PEG por la misma proteína como componente polimérico del sistema. Para construir un diagrama de equilibrio proteína de suero/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se usó el método selección de alto rendimiento (Spyropoulos, Portschi, & Norton, 2010), que es más adecuado para soluciones biológicas, ya que se basa en la presencia o ausencia de bifase

(Spyropoulos, Portschi, & Norton, 2010), a diferencia del método punto de turbidez que se aplica especialmente cuando las soluciones iniciales tienen baja densidad óptica (Tolstoguzov, 1999). El diagrama de equilibrio permitió definir una línea de operación principal, en la cual se establecieron siete sistemas de estudio para la partición de la proteína del suero de queso.

Con esta investigación se pudo concluir que el sistema ATPE propuesto en la primera y en la segunda fases, constituye una alternativa potencial para la purificación y concentración de proteínas. Además, es posible usar a las proteínas del suero de queso como polímeros en el propio sistema ATPE, lo cual puede ayudar a reducir costos y pasos adicionales de purificación.

De acuerdo a los argumentos planteados, este trabajo de investigación planteó las siguientes hipótesis y objetivos:

Hipótesis:

- Es posible usar un sistema ATPE PEG₄₀₀₀/(NH₄)₂SO₄ para purificar de la lactosa y concentrar de las proteínas del suero de queso panela.
- Es posible sustituir al PEG₄₀₀₀ por las mismas proteínas del suero de queso como componente polimérico en un sistema ATPE proteína/(NH₄)₂SO₄ que permita concentrar y purificar de la lactosa a las proteínas del suero de queso panela.

Objetivos

Objetivo general

- Caracterizar la separación de la proteína y lactosa de suero de queso panela usando extracción acuosa en dos fases.

Objetivos específicos

- Estudiar la partición de la proteína de suero y lactosa de suero de queso panela usando un sistema PEG4000/sulfato de amonio.
- Estudiar la partición de la proteína y lactosa de suero de queso panela usando un sistema proteína/sulfato de amonio.

Referencias

- Alcântara, L. A. P., Amaral, I. V., Bonomo, R. C. F., da Silva, L. H. M., da Silva, M. d. C. H., Minim, V. P. R., & Minim, L. A. (2014). Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from cheese whey in aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and sodium polyacrylate. *Food and Bioproducts Processing*, 92(4), 409-415. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.09.006>
- Alcântara, L. A. P., Minim, L. A., Minim, V. P. R., Bonomo, R. C. F., da Silva, L. H. M., & da Silva, M. d. C. H. (2011). Application of the response surface methodology for optimization of whey protein partitioning in PEG/phosphate aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography B*, 879(21), 1881-1885. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.05.007>
- Alves, J. G. L. F., Chumpitaz, L. D. A., da Silva, L. H. M., Franco, T. T., & Meirelles, A. J. A. (2000). Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 743(1), 235-239. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00111-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00111-0)
- Anandharamakrishnan, C., Raghavendra, S. N., Barhate, R. S., Hanumesh, U., & Raghavarao, K. S. M. S. (2005). Aqueous Two-Phase Extraction For Recovery Of Proteins From Cheese Whey. *Food and Bioproducts Processing*, 83(3), 191-197. doi:<https://doi.org/10.1205/fbp.03403>
- Benavides, J., Rito-Palomares, M., & Asenjo, J. A. (2011). 2.49 - Aqueous Two-Phase Systems A2 - Moo-Young, Murray *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)* (pp. 697-713). Burlington: Academic Press.
- Boaglio, A., Bassani, G., Picó, G., & Nerli, B. (2006). Features of the milk whey protein partitioning in polyethyleneglycol-sodium citrate aqueous two-phase systems with the goal of isolating human alpha-1 antitrypsin expressed in

- bovine milk. *Journal of Chromatography B*, 837(1), 18-23.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.049>
- Burgess, R. R. (2009). Chapter 20 Protein Precipitation Techniques. In R. R. Burgess & M. P. Deutscher (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 463, pp. 331-342): Academic Press.
- Capezio, L., Romanini, D., Picó, G. A., & Nerli, B. (2005). Partition of whey milk proteins in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol–phosphate as a starting point to isolate proteins expressed in transgenic milk. *Journal of Chromatography B*, 819(1), 25-31.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.01.020>
- Chen, J.-P. (1989). Clarification of Cheese Whey by Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of Food Science*, 54(5), 1369-1370. doi:10.1111/j.1365-2621.1989.tb05997.x
- da Silva, L. M., & Meirelles, A. A. (2000). Bovine serum albumin, α -lactoalbumin and β -lactoglobulin partitioning in polyethylene glycol/maltodextrin aqueous-two-phase systems. *Carbohydrate Polymers*, 42(3), 279-282.
doi:[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00177-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00177-0)
- de Lemos, L. R., Santos, I. J. B., Rodrigues, G. D., Ferreira, G. M. D., da Silva, L. H. M., da Silva, M. d. C. H., & de Carvalho, R. M. M. (2010). Phase Compositions of Aqueous Two-Phase Systems Formed by L35 and Salts at Different Temperatures. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 55(3), 1193-1199.
doi:10.1021/jc900589h
- Dergal, S. B. (2006). *Química de los alimentos*: Pearson Educación.
- Farruggia, B., Nerli, B., & Picó, G. (2003). Study of the serum albumin-polyethyleneglycol interaction to predict the protein partitioning in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, 798(1), 25-33.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.08.044>

- Fu, H., Yang, S.-T., & Xiu, Z. (2015). Phase separation in a salting-out extraction system of ethanol–ammonium sulfate. *Separation and Purification Technology*, 148(Supplement C), 32-37. doi:<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.04.042>
- Gao, Y.-L., Peng, Q.-H., Li, Z.-C., & Li, Y.-G. (1991). Thermodynamics of ammonium sulfate—polyethylene glycol aqueous two-phase systems. Part1. Experiment and correlation using extended uniquac equation. *Fluid Phase Equilibria*, 63(1), 157-171. doi:[https://doi.org/10.1016/0378-3812\(91\)80028-T](https://doi.org/10.1016/0378-3812(91)80028-T)
- González-Amado, M., Rodil, E., Arce, A., Soto, A., & Rodríguez, O. (2016). The effect of temperature on polyethylene glycol (4000 or 8000)–(sodium or ammonium) sulfate Aqueous Two Phase Systems. *Fluid Phase Equilibria*, 428(Supplement C), 95-101. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fluid.2016.06.019>
- Huddleston, J. G., Willauer, H. D., & Rogers, R. D. (2003). Phase Diagram Data for Several PEG + Salt Aqueous Biphasic Systems at 25 °C. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 48(5), 1230-1236. doi:10.1021/je034042p
- Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., . . . Yuan, Z. (2016). Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biological Procedures Online*, 18, 18. doi:10.1186/s12575-016-0048-8
- Jara, F., & Pilosof, A. M. R. (2011). Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein concentrate/hydroxypropylmethylcellulose aqueous two-phase systems. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 374-380. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.07.003>
- Jelen, P., & Tossavainen, O. (2003). Low lactose and lactose-free milk and dairy products – prospects, technologies and applications. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 161-165.
- Jyh-Ping, C. (1992). Partitioning and separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in PEG/potassium phosphate aqueous two-phase systems. *Journal of*

- Fermentation and Bioengineering*, 73(2), 140-147.
doi:[https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90579-J](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90579-J)
- Kalaivani, S., & Regupathi, I. (2015). Synergistic extraction of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin from acid whey using aqueous biphasic system: Process evaluation and optimization. *Separation and Purification Technology*, 146(Supplement C), 301-310.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.03.057>
- Kaul, A. (2000). The Phase Diagram. In R. Hatti-Kaul (Ed.), *Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols: Methods and Protocols* (pp. 11-21). Totowa, NJ: Humana Press.
- Khayati, G., & Shahriari, M. (2016). Measurement and Correlation of Phase Diagram Data of Hydrophilic Alcohols (1-Propanol/2-Propanol)+ Salts ($\text{Na}_2\text{SO}_4/(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{NH}_4\text{NO}_3$)+ Water Systems. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 30(1), 73-80.
- Lu, Y.-M., Yang, Y.-Z., Zhao, X.-D., & Xia, C.-B. (2010). Bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol (PEG)/potassium citrate aqueous two-phase systems. *Food and Bioproducts Processing*, 88(1), 40-46.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.12.002>
- Marcos, J. C., Fonseca, L. P., Ramalho, M. T., & Cabral, J. M. S. (1998). Variation of penicillin acylase partition coefficient with phase volume ratio in poly(ethylene glycol)–sodium citrate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711(1), 295-299.
doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00633-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00633-6)
- Mokhtarani, B., Mortaheb, H. R., Mafi, M., & Amini, M. H. (2011). Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in aqueous two-phase systems of polyvinylpyrrolidone and potassium phosphate. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 879(11-12), 721-726. doi:10.1016/j.jchromb.2011.02.007

- Murari, G. F., Penido, J. A., Machado, P. A. L., Lemos, L. R. d., Lemes, N. H. T., Virtuoso, L. S., . . . Mageste, A. B. (2015). Phase diagrams of aqueous two-phase systems formed by polyethylene glycol+ammonium sulfate+water: equilibrium data and thermodynamic modeling. *Fluid Phase Equilibria*, 406(Supplement C), 61-69. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fluid.2015.07.024>
- Nandini, K. E., & Rastogi, N. K. (2011). Integrated Downstream Processing of Lactoperoxidase from Milk Whey Involving Aqueous Two-Phase Extraction and Ultrasound-Assisted Ultrafiltration. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(1), 173-185. doi:10.1007/s12010-010-9026-9
- Perumalsamy, M., & Batcha, M. I. (2011). Synergistic extraction of bovine serum albumin using polyethylene glycol based aqueous biphasic system. *Process Biochemistry*, 46(2), 494-497. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.023>
- Pihlanto, A. (2011). Whey proteins and peptides. *Nutrafoods*, 10(2), 29-42. doi:10.1007/bf03223386
- Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., & Ramesh, V. (2011). Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules—a review. *Science and Technology*, 1(1), 7-16.
- Rodrigues, L. R., Venâncio, A., & Teixeira, J. A. (2001). Partitioning and separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in polyethylene glycol/ammonium sulphate aqueous two-phase systems. *Biotechnology Letters*, 23(22), 1893-1897. doi:10.1023/a:1012710031589
- Snyder, S. M., Cole, K. D., & Sziag, D. C. (1992). Phase compositions, viscosities and densities for aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25 °C. *J. Chem. Eng. Data*, 37, 268.
- Spyropoulos, F., Portschi, A., & Norton, I. T. (2010). Effect of sucrose on the phase and flow behaviour of polysaccharide/protein aqueous two-phase systems.

- Food Hydrocolloids*, 24(2), 217-226.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.09.008>
- Tolstoguzov, V. (1999). Compositions and Phase Diagrams for Aqueous Systems Based on Proteins and Polysaccharides. In H. Walter, D. E. Brooks, & P. A. Sreere (Eds.), *International Review of Cytology* (Vol. 192, pp. 3-31): Academic Press.
- Tovar Jiménez, X., Arana Cuenca, A., Téllez Jurado, A., Abreu Corona, A., & Muro Urista, C. R. (2012). Traditional Methods for Whey Protein Isolation and Concentration: Effects on Nutritional Properties and Biological Activity. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56, 369-377.
- Voros, N., Proust, P., & Fredenslund, A. (1993). Liquid-liquid phase equilibria of aqueous two-phase systems containing salts and polyethylene glycol. *Fluid Phase Equilibria*, 90(2), 333-353. doi:[https://doi.org/10.1016/0378-3812\(93\)85071-S](https://doi.org/10.1016/0378-3812(93)85071-S)
- Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 33(6, Part 1), 756-774. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>
- Zhang, H., Jiang, B., Feng, Z.-B., Qu, Y.-X., & Li, X. (2016). Separation of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin in Whey Protein Isolate by Aqueous Two-phase System of Polymer/Phosphate. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 44(5), 754-759. doi:[https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(16\)60932-5](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(16)60932-5)
- Zuñiga, A. D. G., Coimbra, J. S. R., & Minim, L. A. (2001). Partitional coefficients of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin in aqueous two phase systems: influence of molecular mass. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, 3(3), 149-155. doi:10.1080/11358120109487722

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Suero de queso

El suero de queso puede ser definido como un líquido verde-amarillento resultante de la precipitación y remoción de las caseínas de la leche en el proceso de fabricación de queso (Prazeres, Carvalho, & Rivas, 2012). El suero de queso es el residuo que permanece después de la recuperación de la cuajada procedente de la coagulación de la leche con enzimas proteolíticas o ácidos (Yadav et al., 2015). El color de suero varía de predominantemente de amarillo/verde hasta raramente un tinte azulado, lo cual depende del tipo de leche usado (Yadav et al., 2015).

A partir de 10 litros de leche se producen de 1 a 2 kg de queso y de 8 a 9 kg de suero de leche (Dergal, 2006). Existen dos principales tipos de suero de queso: suero dulce y suero ácido. El suero dulce proviene de la fabricación de quesos usando renina, mientras que el segundo se debe al uso de ácidos para la precipitación de las caseínas (Dergal, 2006). El pH del suero de queso es alrededor de 6.2 y 4.6 para el dulce y el ácido respectivamente. El contenido de los principales componentes del suero de queso se lista en el Cuadro 1.

La mayor parte de la lactosa de la leche permanece en el suero de queso, constituyendo en éste alrededor de un 90 % (Dergal, 2006).

Cuadro 1 Principales componentes del suero de queso.

Componente	Concentración [%]
Humedad	93.0 – 94.0
Lactosa	4.5 - 6.0
Proteínas	0.6 - 1.1
Minerales	0.8 – 1.0
Ácido láctico	0.05 – 0.90
Grasas	0.06-0.50

Fuente: Prazeres et al. (2012).

El suero de leche contiene un 20 % de las proteínas totales de la leche. Las principales proteínas y sus características se representan en el Cuadro 2.

Cuadro 2 Características fisicoquímicas de las principales proteínas del suero de queso.

Proteína	Peso molecular [kDa]	Punto isoelectrico	Concentración [g L ⁻¹]	Porcentaje [%]
β-lactoglobulina (βLG)	18	5.2-5.4	3.0-4.0	60
α-lactalbúmina (α-LA)	14.2	4.7-5.1	1.2-1.5	30
Albúmina de suero bovino (BSA)	67	4.9-5.1	0.3-0.6	6

Fuente: Capezio, Romanini, Picó, and Nerli (2005).

Las proteínas del suero de queso han sido reportadas por tener utilidad en diferentes aplicaciones como efectos en los huesos, músculos, sangre, cerebro, sistema inmune, cáncer, infecciones y sanación de heridas (Pihlanto, 2011).

En el Cuadro 3 se describen las funciones biológicas reportadas por las proteínas del suero de queso.

Cuadro 3. Funciones biológicas de las proteínas del suero de queso.

Proteínas	Función biológica
Todas las del suero de queso	Prevención de cáncer • Cáncer de pecho e intestinal • Cáncer inducido químicamente Incremento de niveles de glutatión • Incremento de la vulnerabilidad de los tumores celulares • Tratamiento de pacientes con VIH Incremento a la respuesta de saciedad • Incrementa aminoácidos en plasma, colecistoquinina y glucagón como péptido
β -LG	Transportador • retinol, palmitato, vitamina D, colesterol, colesterol Mejorador de la actividad esterasea pregástrica Transferencia de inmunidad pasiva Regulador del metabolismo del fósforo en la glándula mamaria.
α -LA	Prevención de cáncer Síntesis de lactosa Tratamiento de enfermedad estrés crónico inducido
BSA	Unión a ácidos grasos Función antimutagénica Prevención de cáncer Inmunomodulación • Protección contra enfermedades por medio de inmunidad pasiva

Fuente: Madureira, Pereira, Gomes, Pintado, and Xavier Malcata (2007).

Hay un interés creciente en el suero como fuente potencial de compuestos bioactivos para reducir el riesgo y prevenir el desarrollo de enfermedades (Pihlanto, 2011). Las propiedades funcionales de las proteínas del suero de queso y usos en la alimentación humana dependen de los daños que pueda recibir durante el procesamiento (Dergal, 2006). Los métodos de precipitación son frecuentemente usados a escala de laboratorio para obtener concentrado de proteínas y producir

péptidos. Sin embargo, la composición química y funcionalidad de las proteínas del suero y péptidos son afectados por el método usado en el proceso de concentración de proteínas (Tovar Jiménez, Arana Cuenca, Téllez Jurado, Abreu Corona, & Muro Urista, 2012). El suero de queso tiene una proporción baja de proteínas, pero éstas poseen una calidad nutritiva superior a la de las caseínas que conforman el queso (Dergal, 2006).

2.2 Procesos para concentrar el suero de queso

Se han desarrollado muchas técnicas encaminadas al aprovechamiento del suero; una de las más sencillas, de tipo casero, es calentarlo para precipitar las proteínas y después eliminar el agua por prensado; en muchas poblaciones de México el precipitado se consume directamente después de salarlo y se conoce como requesón (Dergal, 2006).

Muchos métodos tales como ultrafiltración, diafiltración y cromatografía de intercambio iónico han sido usados para concentrar y separar las proteínas de otros componentes (Pihlanto, 2011). Algunos de ellos pueden ser representados en la Figura 1.

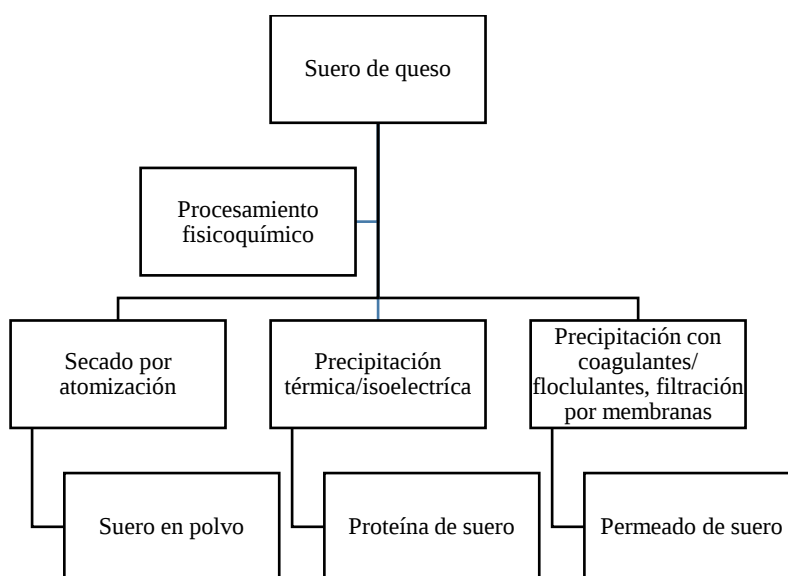


Figura 1. Métodos fisicoquímicos de procesamiento de suero (Yadav et al., 2015).

Los métodos comunes para concentrar proteínas incluyen evaporación, ósmosis inversa y filtración con membranas (microfiltración, ultrafiltración, pervaporación, nanofiltración y electrodialisis). La evaporación es realizada a temperaturas menores a 100 °C para proteger a las proteínas de la desnaturalización. La desventaja de los métodos convencionales de evaporación es el requerimiento alto de energía, altas concentraciones de ceniza y la presencia de lactosa en el producto final. Además las características de proteínas termolábiles pueden cambiar, lo cual provoca cambios en sus características funcionales y nutricionales (Yadav et al., 2015).

La concentración de suero vía osmosis inversa es realizada al pasar por membranas el suero usando presión con un tamaño de poro alrededor de 0.001 μm , así el producto puede ser concentrado hasta de 20-22 % de sólidos (Yadav et al., 2015).

Sin embargo, el método preferido para concentrar proteínas de suero en su estado nativo es la filtración con membranas (ultra y nanofiltración). La tecnología de membranas ha ganado un gran interés debido a la ventaja de ahorro de energía. La ultrafiltración y nanofiltración son definidas como separación con membranas para compuestos objetivo en el rango de 1 a 1000 kDa para ultrafiltración y de 100 a 500 Da para nanofiltración (Yadav et al., 2015). Generalmente los componentes del suero con altos pesos moleculares (proteínas y grasas) son concentrados del lado del retenido, los componentes de bajo peso molecular (lactosa, minerales y vitaminas) son particionados en ambos lados de la membrana (del lado del retenido y del permeado). La ultrafiltración permite obtener concentrado de proteína de suero (WPC) con una concentración de sólidos hasta del 65 %. Adicionalmente, una fracción de proteína más concentrada es obtenida por diafiltración (hasta 85 %), proceso en el cual se diluye el suero con agua (Yadav et al., 2015). Sin embargo, la diafiltración no puede remover el total de la lactosa del retenido. Adicionalmente, para mejorar la pureza de las proteínas, una combinación entre nano y ultrafiltración es usada, con lo cual se puede lograr WPC hasta 99 % de contenido de proteínas de suero. WPC puede ser producido en un líquido concentrado o como polvo seco después del secado por aspersión.

El aislado de proteína de suero (WPI) con un contenido de proteína arriba de 90 % es obtenido realizando adicionalmente microfiltración o cromatografía de intercambio iónico. Como otras proteínas, las proteínas de suero también son anfotéricas por naturaleza y pueden comportarse como un ácido o una base con respecto al pH del medio. Generalmente, cualquier proteína posee una carga neta positiva a valores de pH por debajo de su punto isoeléctrico, y una carga neta negativa por arriba de su punto isoeléctrico. De esta manera, el pH del medio puede ser ajustado para absorber proteínas dentro de un intercambiador iónico y así concentrarlas desde una solución diluida. Además las proteínas son eluidas del intercambiador iónico a pH ~9, para después ser concentradas por ultrafiltración (Yadav et al., 2015).

Generalmente, el secado por atomización es el método usado para secar suero en polvo y las proteínas de queso. El suero en polvo es obtenido de un secador por atomización con una humedad alrededor de 5-7 %. El suero se vuelve muy pegajoso durante el proceso de secado; sin embargo, se usa un equipo especializado para lograr altas concentraciones de sólidos (de 50 a 80 % de sólidos). Adicionalmente, un segundo conjunto de equipos es usado para cristalizar y enfriar el producto rápidamente. El producto frío es enviado a un tambor interno y secado a 95-96 % de sólidos a 54-60 °C. Después, el suero de queso producido es molido con un equipo de martillos para disminuir el tamaño de partícula (Yadav et al., 2015).

En general, para separar o fraccionar las proteínas individuales del suero de queso, son aplicados cuatro procesos de separación (Yadav et al., 2015):

- Precipitación/floculación por tratamiento térmico o usando polímeros.
- Tecnología de membranas (ultrafiltración y nanofiltración).
- Separación cromatográfica.
- Tecnologías combinadas o diversas.

2.3 Suero de queso como potencial contaminante

Las industrias procesadoras de alimentos, como son las plantas procesadoras de lácteos y queso, generan grandes volúmenes de desechos líquidos incluyendo

suero de queso (Yadav et al., 2015). Estos volúmenes generados representan un significativo impacto ambiental. Los efluentes del suero de queso exhiben valores en Demanda Química y Biológica de Oxígeno (COD y BOD) en el rango de 0.8 -102 g L⁻¹ y 0.6-60 g L⁻¹, respectivamente, provocando altos consumos de oxígeno disuelto en cuerpos de agua (Carvalho, Prazeres, & Rivas, 2013). El contenido de lactosa, grasa y proteínas son los principales responsables de esta contaminación orgánica (Prazeres et al., 2012). En tanto, la contaminación inorgánica es atribuida a la presencia de sal minerales (0.46-10 %), principalmente NaCl y KCl (> 50%) y sales de calcio (primariamente fosfatos) (Prazeres et al., 2012).

Por otro lado, la presencia de estos nutrientes (orgánicos e inorgánicos) es considerada como una fuente potencial para la producción de varios productos con valor agregado (Yadav et al., 2015). Por estas razones, el suero de queso es un material de desecho que puede ser aprovechado al recuperar las proteínas, reduciendo al mismo tiempo su impacto en el ambiente.

2.4 Fundamentos de los sistemas de extracción acuosa en dos fases (ATPE).

Los métodos usados principalmente en la industria de la biotecnología, para la recuperación, separación y purificación de biomoléculas, incluyen tecnología basada en membranas (microfiltración, ultrafiltración y nanofiltración), precipitación (precipitación salina, precipitación isoelectrica y de afinidad), cromatografía líquida (intercambio iónico, fase reversa, interacción hidrofóbica, exclusión por tamaño y afinidad, entre otras) (Benavides, Rito-Palomares, & Asenjo, 2011). Los sistemas ATPE son una tecnología de separación que ha sido usado para desarrollar bioprocesos para la recuperación primaria y purificación parcial de una variedad de productos biológicos, tales como proteínas, material genético, bionanopartículas y fitoquímicos, así también células y organelos celulares (Benavides et al., 2011). En un sistema ATPE ocurre una separación líquido-líquido mediante mezclas basadas principalmente en dos polímeros o un polímero y una sal, que en ciertas concentraciones producen una solución verdadera en una sola fase, pero en otras causan la formación de dos fases inmiscibles, entre las cuales se reparten las biomoléculas presentes en la mezcla (Raja, Murty, Thivaharan, Rajasekar &

Ramesh, 2011). La selección del tipo de sistema ATPE depende del tipo de biomolécula y consideraciones económicas. Debido al alto costo y alta viscosidad de los sistemas ATPE polímero/polímero, los sistemas ATPE preferidos con los sal/polímero (Raja et al., 2011). Las principales ventajas de esta técnica incluyen potencial de escalamiento, capacidad para integrar el proceso, uso de componentes de baja toxicidad química y biocompatibilidad (Benavides et al., 2011). Los sistemas ATPE han ganado interés de diferentes industrias para la recuperación y purificación de productos altamente valorados (Glyk, Scheper, & Beutel, 2015). Los sistemas ATPE se basan en un sistema que contiene dos componentes, que en solución acuosa y bajo concentraciones definidas puede equilibrarse en la formación de dos fases. El agua es el principal componente del sistema, el cual genera un ambiente amigable para las biomoléculas, de esta manera se puede estabilizar su estructura y actividad biológica (Iqbal et al., 2016).

El mecanismo relacionado para la separación de las dos fases acuosas así como el comportamiento de la partición de los solutos y partículas entre dichas fases está dominada por el equilibrio termodinámico del sistema (Benavides et al., 2011). Una proteína interactúa con las moléculas vecinas dentro de una fase por medio de varios enlaces, tales como de hidrógeno, iónico e interacciones hidrofóbicas, juntas o con otras fuerzas más débiles (Asenjo & Andrews, 2012).

Las siguientes propiedades de partición pueden ser explotadas individualmente o en conjunto para lograr una separación efectiva de una proteína en particular (Asenjo & Andrews, 2012):

- Hidrofobicidad; las propiedades hidrofóbicas de una fase del sistema son utilizadas para la separación de acuerdo a la hidrofobicidad de las proteínas.
- Electroquímica; el potencial eléctrico entre las fases es usado para separar moléculas o partículas de acuerdo a su carga.
- Partición dependiente del tamaño; el tamaño molecular de las proteínas o áreas superficiales de las moléculas (proteínas) o partículas es el factor dominante.

- Afinidad bioespecífica; la afinidad entre los sitios de la proteína y el ligando se unen a una de las fases, y ésta es explotada para la separación.
- Dependencia de la conformación; la conformación de las proteínas es el factor determinante.

La separación de las fases en un sistema ATPE es afectada por diferentes factores (Iqbal et al., 2016). Estos factores son (Asenjo & Andrews, 2012):

- i. Peso molecular y tamaño de los polímeros.
- ii. Concentración del polímero.
- iii. Fuerza iónica de la sal.
- iv. pH.
- v. Sales adicionales tales como NaCl, la cual incrementa la hidrofobicidad del sistema.

2.5 Diagrama binodal

Una herramienta útil que nos ayuda al entendimiento del proceso de partición de una molécula objetivo en un sistema de extracción acuosa en dos fases (ATPE) es el diagrama de equilibrio. El diagrama de equilibrio (Figura 2) delimita el área de trabajo potencial para un sistema acuoso en dos fases y es una “huella digital” para el sistema bajo condiciones de pH, temperatura, y concentración de sales etc. La información que puede ser generada de tal diagrama incluye: la concentración de los componentes formadores de fase necesarios para formar un sistema en dos fases en el que están en equilibrio, la subsecuente concentración de los componentes de fase en las fases superior e inferior y la relación de volúmenes de fase (Kaul, 2000).

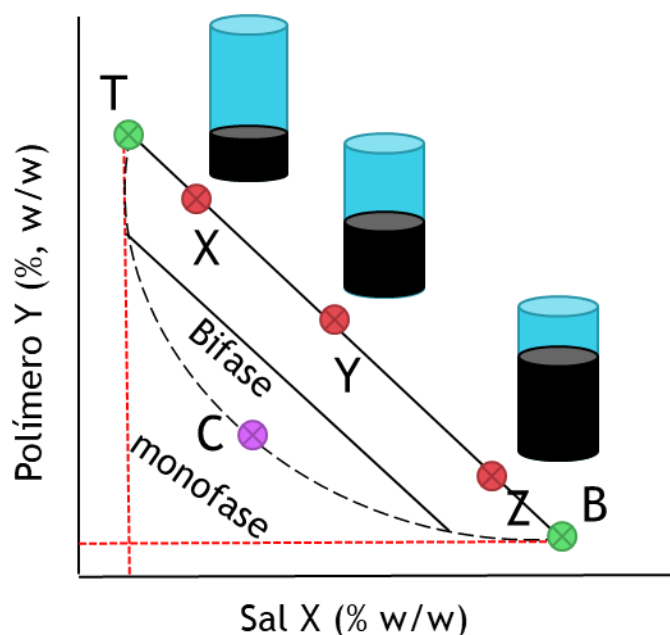


Figura 2. Ilustración del diagrama de fase. La fase inferior polímero/sal X (% w/w) es trazada sobre la abscisa y el polímero de la fase superior Y (% w/w) es trazada hacia la ordenada. X, Y y Z representan las composiciones totales de los tres sistemas sobre la misma línea de operación con diferente relación de volumen. La composición final de la fase superior e inferior es representada por los nodos T y B (verde) respectivamente. El punto crítico es representado por C. La línea binodal es representada por la línea discontinua (--).(Kaul, 2000)

Presentes sobre el diagrama de equilibrio se encuentran la curva binodal, la cual divide una región de la concentración de los componentes que formarán fases acuosas inmiscibles (arriba de la curva), de aquella que formará una sola fase (debajo de la curva). Las coordenadas para todos los sistemas potenciales se encuentran sobre una línea de operación (*tie line*); la línea de operación conecta dos nodos de la curva binodal, los cuales representan la concentración final de los componentes de fase en la fase superior e inferior. Moviéndose a lo largo de las coordenadas de la línea de operación se localizan sistemas con diferentes composiciones totales y la relación de volúmenes, y también con la misma concentración final de los componentes de fase en las fases superior e inferior. También presente sobre la línea binodal está el punto crítico; sólo arriba de este

punto la composición y volumen de ambas fases son casi semejantes (como es el material particionado) (Kaul, 2000).

La Ecuación 2.1 determina la longitud de la línea de operación (*tie line length*, TLL):

$$TLL = \sqrt{\Delta X^2 + \Delta Y^2} \quad (2.1)$$

Donde ΔX^2 y ΔY^2 representan la diferencia absoluta en concentración de los constituyentes (sal y polímero respectivamente) en las fases superior e inferior respectivamente. La TLL tiene las mismas unidades que la concentración de los componentes (% w/w) y es frecuentemente usada para expresar el efecto de la composición del sistema sobre el material particionado (Kaul, 2000).

La relación volumen (R) del sistema depende de la composición global del sistema (Benavides et al., 2011). Este parámetro puede ser calculado usando la Ecuación 2.2.

$$R = \frac{V_{top}}{V_{bot}} \quad (2.2)$$

Donde V_{top} y V_{bot} representan los volúmenes de la fase superior e inferior respectivamente. La mayoría de los mecanismos que tienen influencia sobre el comportamiento de partición de los solutos y bionanopartículas en los sistemas ATPE son directamente relacionados a TLL y al R (Benavides et al., 2011).

Uno de los procedimientos más simples de esta técnica es la extracción en lote en un simple paso. El sistema es preparado y la mezcla a ser separada es añadida. Después de mezclar, la separación de fases es lograda por asentamiento gravitatorio o centrifugación. Las fases son separadas y analizadas o usadas para recuperar los componentes de la mezcla inicial (Raja et al., 2011). La partición de las moléculas entre las fases principalmente depende de la relación de equilibrio en el sistema. El coeficiente de partición K se define de acuerdo a la Ecuación 2.3.

$$K = \frac{C_{top}}{C_{bot}} \quad (2.3)$$

Donde C_{top} y C_{bot} es la concentración de equilibrio de la biomolécula en la fase superior e inferior respectivamente. Si la partición de la biomolécula se favorece en la fase superior el valor de K será mayor a la unidad, mientras que valores menores a la unidad indican que la biomolécula particiona en su mayoría a la fase inferior.

De acuerdo con Zhang, Jiang, Feng, Qu, y Li (2016), la eficiencia de extracción en la fase superior puede ser calculada de acuerdo a la Ecuación 2.4.

$$Y = \frac{VC}{V_0C_0}100 \quad (2.4)$$

Donde Y es la eficiencia de extracción, C es la concentración de la biomolécula de interés en la fase superior o inferior, V es el volumen de la fase superior o inferior, C_0 y V_0 es la concentración y el volumen del compuesto añadido al sistema ATPE.

2.6 Aplicación de ATPE en la separación y fraccionamiento de proteínas

En la definición de un nuevo sistema ATPE, la construcción del diagrama de fase es de suma importancia, de modo que la elección sistemática de las composiciones puede ser hecha para los experimentos de partición (Chakraborty & Sen, 2016).

Las proteínas son las biomoléculas más versátiles en términos de funcionalidad y estructura. Estas macromoléculas son usadas en todas las aplicaciones relacionadas a la biotecnología (Benavides et al., 2011).

La aplicación de los sistemas ATPE ha sido ampliamente aplicada a la extracción y purificación de compuestos de interés. Estos compuestos incluyen una diversidad de proteínas de distintas fuentes como son proteína, enzimas, biofarmacos, plásmidos, anticuerpos, ADN, ácidos nucleicos, virus y partículas víricas, células y organelos, residuos de drogas, alcaloides, antibióticos entre otros. Una referencia más amplia puede encontrarse en Rito-Palomares (2004), Rosa, Ferreira, Azevedo, y Aires-Barros (2010), Benavides et al. (2011), Raja et al. (2011), Asenjo y Andrews (2012), Goja, Yang, Cui, y Li (2014), Glyk et al. (2015), Grilo, Aires-Barros y Azevedo (2016), Iqbal et al. (2016). La aplicación de los sistemas ATPE en la partición de las

proteínas está ampliamente reportado y ha sido usado exitosamente. Por ello es un método potencial para la purificación, concentración y separación de las mismas para sistemas biológicos, el cual debe ser considerado como opción para la separación de un compuesto de interés. En este trabajo de investigación se tiene particular interés en las proteínas del suero de queso.

2.7 La aplicación de los sistemas ATPE en el fraccionamiento de las proteínas del suero de queso

Se ha estudiado la partición de las proteínas de suero de queso usando sistemas ATPE con resultados potenciales. Un resumen de los trabajos puede verse en el Cuadro 4.

Las principales proteínas del suero de queso son α -LA, β -LG, BSA. Para la separación y concentración de estas proteínas los sistemas polímero/sal se han utilizado con mayor frecuencia. Como puede observarse en el Cuadro 4, el polímero de mayor uso es el PEG con un rango de pesos moleculares de 600 hasta 20,000 Da. El fosfato de potasio (en mezcla KH_2PO_4 - K_2HPO_4) es la sal que más se ha usado para sistemas ATPE para el estudio de partición de las proteínas del suero de queso. Sin embargo, con el paso del tiempo, se ha optado por elegir sales tales como citrato de sodio (Cuadro 4), esto debido a su biodegradabilidad y nula toxicidad (Raja et al., 2011). El PEG también se ha sustituido por otros polímeros orgánicos o de mejores características. Así también se puede observar el uso de alternativas al PEG tales como dextrano, goma xantana, goma guar, proteínas como componentes formadores de fase.

Se puede observar que en la mayoría de los sistemas, la α -LA tiene afinidad por la fase superior polimérica (PEG), mientras que β -LG y BSA particionan hacia la parte salina o inferior. Además, es notorio que existe una diversidad en la fuente biológica de las proteínas del suero de queso en los estudios reportados, ya que algunos autores han elegido suero de queso fresco, mientras que otros, suero de queso procesado o en su defecto las proteínas individuales de éste en grado reactivo. A continuación se describen las investigaciones del Cuadro 4 con más detalle.

Chen (1989), utilizó un sistema ATPE para clarificar el suero de queso chédar usando un sistema polímero/sal PEG_{3500, 8000}/ KH₂PO₄ con un rango de pH 3.3 a 5.6; 0 a 5; % de NaCl; de 7 a 40 °C y de 11.7 a 16 % de PEG. Se encontró que las condiciones optimizadas fueron un sistema ATPE PEG₈₀₀₀/ KH₂PO₄ (11.7/10.0 %), pH 3.8, 7°C, con una remoción de grasa del 98 % y una recuperación del 90 % de las proteínas en la fase salina (inferior). El valor de R y K fue de 6.9 y 1.2 respectivamente. El aumento en la temperatura, pH, peso molecular del PEG y concentración de la sal disminuyeron el valor de K , mientras que con el aumento de la concentración de NaCl aumentó el valor de K .

Jyh-Ping (1992), estudió la partición de α -LA, β -LG obtenidos de suero de queso chédar con un sistema ATPE PEG/ácido cítrico. Se estudió el efecto de peso molecular del PEG, concentración de los componentes de fase, pH y concentración de NaCl. Se logró particionar α -LA a la fase polimérica, mientras que β -LG particionó hacia la fase salina. Cuando se aumentó la concentración de los componentes (PEG, ácido cítrico), TLL aumentaron la partición de α -LA, β -LG a la fase polimérica y salina respectivamente. Sin embargo, cuando se aumentó el valor del pH, el valor de K para α -LA, β -LG aumentó ligeramente, pero lo contrario pasó cuando se aumentó la concentración de NaCl, donde el valor de K para ambas proteínas disminuyó. Se logró obtener la β -LG con una pureza alrededor del 90 % y Y superiores a 95 %; sin embargo, fue menor para α -LA con una pureza del 80 % y Y del 60 % aproximadamente.

Rito-Palomares y Hernandez (1998) estudiaron la partición de la proteína total del suero de queso con un sistema PEG₁₀₀₀/KH₂PO₄- K₂HPO₄. En este trabajo, se investigó principalmente el efecto de parámetros del sistema como son TLL (31.0-46.2 %), pH (5.5 - 9.5), R (0.18 - 6.3), orden de mezcla de los componentes, y el efecto de soluciones biológicas sobre la línea binodal. Se encontró que a una mayor TLL y pH el coeficiente de partición K aumentaba. Sin embargo con el aumento de R , el valor de K disminuyó. Se encontró que disolver la KH₂PO₄- K₂HPO₄ en el suero de queso y después agregarle el PEG disminuyó el valor de K . El mezclar el PEG y KH₂PO₄- K₂HPO₄ en suero de queso y mezclar el PEG al suero para posteriormente

agregarle KH_2PO_4 - K_2HPO_4 mostraron valores de K similares. Se encontraron rendimientos máximos de 65-80 % en la fase superior. Además, se observó que la línea binodal del diagrama de fase PEG₁₀₀₀ / KH_2PO_4 - K_2HPO_4 se movió hacia la derecha al agregar suero de queso disolvente, esto se explica de acuerdo a los autores debido a la grasa residual del suero.

Alves, Chumpitaz, da Silva, Franco y Meirelles (2000) estudiaron la partición de las proteínas del suero de queso (α -LA, β -LG, BSA) en un sistema ATPE PEG / KH_2PO_4 - K_2HPO_4 , Maltodextrina (MD)_{2000, 4000}. Se estudiaron el efecto del peso molecular (PM) del polímero y el efecto componente inferior del sistema (citrato o maltodextrina). Se encontró que en un sistema PEG₁₄₅₀ (14 %) / KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (18 %) se pudo particionar la α -LA a la fase superior y β -LG a la fase inferior. El sistema PEG₁₄₅₀/MD logró separar α -LA y BSA en la fase superior; mientras que BSA particionó en la parte inferior o rica en MD. Este trabajo no reportó rendimientos de la proteína.

da Silva y Meirelles (2000) estudiaron la partición de α -LA, β -LG, BSA usando un sistema PEG/MD con el objetivo de substituir al dextrano debido al alto costo de éste. En general, se encontró que en todos los sistemas un incremento en la partición de β -LG y BSA está relacionado con un incremento en el valor de R . Se logró particionar β -LG y BSA hacia la fase inferior usando PEG₈₀₀₀/MD₂₀₀₀ en composición 11.23/34.80 % respectivamente, pero con bajo valor de K para α -LA. Los valores de K para α -LA más altos (4.93) fueron encontrados en un sistema PEG₁₄₅₀ / MD₄₀₀₀ (10.96/33.82 %).

Gündüz y Korkmaz (2000) estudiaron el efecto del pH y la concentración de NaCl sobre el particionamiento de BSA usando un sistema PEG₃₃₅₀ / Dextrano₃₇₅₀₀ (8/6 %). En general, se observó que a mayor pH en un rango de 4.2 a 9.8, el valor de K disminuyó al aumentar la concentración de NaCl en un rango de 0.06 a 0.2. A una concentración mayor a 0.2 el valor de K aumentó ligeramente. Los autores concluyen que a concentraciones de NaCl mayores a 0.2 M, el PEG tiende a interactuar con las regiones no polares de la proteína BSA.

Rodrigues, Venâncio y Teixeira (2001) estudiaron la partición de α -LA, β -LG en sistema ATPE PEG / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se estudió el efecto del PM del PEG (600, 900, 1500) y concentración de éste (14, 16 y 18 %), pH (6, 7 y 8) a una concentración fija de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se observó que al aumentar el PM disminuyó el valor de K para ambas proteínas y, según los autores, es debido a que las proteínas se mueven hacia la fase salina por el aumento del PM del PEG. Se observó también que al aumentar la concentración del PEG el valor de K para α -LA, β -LG aumentó. Cuando se aumentó el valor del pH, en general el valor de K para ambas proteínas disminuyó; sin embargo, se apreció un efecto más grande para α -LA. El mismo fenómeno pudo observarse al aumentar la concentración de NaCl, K_2SO_4 y KSCN. Los autores concluyeron que el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ puede ser usado como opción frente a los fosfatos que son 50 % más costosos.

Zuñiga, Coimbra y Minim (2001) estudiaron el efecto del peso molecular del PEG (1500, 4000, 6000 y 8000) en un sistema PEG/ KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 7, 25 °C) de partición sobre las proteínas α -LA, β -LG. Se variaron las concentraciones de los constituyentes con valores de 14, 16 y 18 % para cada uno. Se observó que un aumento en el PM del PEG disminuye el valor de K para la α -LA, lo que significa que la proteína migra hacia la fase inferior. Se encontró que usando PEG 1500 / KH_2PO_4 - K_2HPO_4 en una concentración (18 / 18 %) se obtienen los mejores resultados. Se logró un valor de K de 20.55 y 0.036 para α -LA y β -LG respectivamente.

Farruggia, Nerli y Picó (2003) estudiaron el efecto del PEG sobre la proteína BSA en un sistema PEG / fosfato de potasio. Se eligieron seis sistemas a evaluar usando PEG 600, 1000, 1450, 3350, 6000 y 8000 a pH 7.0 y 25 °C. La concentración de cada uno fue 14.00, 15.50; 13.00, 15.00; 12.40, 12.83; 10.10, 10.90; 8.26, 10.65; y 12.20, 9.70 para PEG y fosfato de amonio respectivamente. Los autores encontraron que con el aumento del PM del PEG, el coeficiente de partición de BSA disminuye, lo cual significa que la proteína es excluida de la fase polimérica por el mismo PEG.

Rodrigues, Venâncio y Teixeira (2003) estudiaron la partición de la proteína de suero proteasa peptona 3 (PP3) usando un sistema ATPE PEG/almidón

hidroxiprólico (Reppal PES 100®). El PM del PEG varió de 600 hasta 10000, mientras la concentración de Reppal PES 100 y el PEG varió en un rango de 12 a 16 %. Con el aumento del pH se observó que el valor de K aumentó en un sistema PEG₄₀₀₀/Reppal PES (12/12 %). Por otro lado, el aumento en la concentración de PEG a una concentración fija de 12 % del Reppal PES 100 provocó también un aumento en el valor de partición de K . El sistema de PEG₄₀₀₀/Reppal PES 100 (24/16 %) se obtuvo un valor de K mayor para PP3 con un valor de 28.7.

Capezio et al. (2005) estudió la partición de α -1 antitripsina de una mezcla artificial de proteínas de suero de leche usando un sistema ATPE PEG/ KH_2PO_4 . Se estudió el efecto del PM del PEG (1000, 1500 y 3350). La concentración fue de 17 y 8.8 % para PEG y fosfato, respectivamente. α -LA y BSA, particionaron hacia la fase superior o polimérica; el valor de K disminuyó con el aumento en el PM del PEG. Mientras que β -LG y α -1 antitripsina particionaron a la parte inferior. Al aumentar la concentración de NaCl el valor de K disminuyó para las cuatro proteínas. Se realizó un proceso de extracción en dos pasos, usando la fase salina para purificar la α -1 antitripsina de β -LG. Se encontró que el mejor sistema PEG₁₅₀₀/ KH_2PO_4 a pH 6.3 mostró una recuperación del 88 % y 80 % de recuperación de 1 antitripsina en el primer y segundo paso de recuperación con una pureza de 41 y 51 % respectivamente.

Anandharamakrishnan, Raghavendra, Barhate, Hanumesh y Raghavarao (2005) estudiaron la partición de la grasa y proteína del suero de queso acidificado usando un sistema ATPE PEG₆₀₀₀, 4000/ KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MD. Se encontró que los sistemas PEG₄₀₀₀/MD (14/32 %) y PEG₆₀₀₀/MD (10/40 %) a pH 6.0 y 4.2 respectivamente, no hubo partición de la grasa. En tanto, un sistema PEG₆₀₀₀/ KH_2PO_4 , K_2HPO_4 (11.7/10.0 %) mostró una recuperación del 83 % en la fase superior de las proteínas. La grasa en este sistema fue particionada hacia la fase salina o inferior. Se reportó que el porcentaje (%) de recuperación de la proteína en la fase superior incrementa con el valor de TLL para el sistema PEG₆₀₀₀/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (6.6 a 24.6 %); contrario a lo que pasa para el sistema PEG₆₀₀₀/ KH_2PO_4 , K_2HPO_4 (83.4 a 18.8 %) y aproximadamente. Sin embargo, aunque la recuperación es alta para el sistema PEG₆₀₀₀/ KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , la relación volumen fue alta (71/12 mL),

esto indica que la concentración de proteína es baja. Los autores reportan un valor de K máximo de 0.9 lo que indica que la diferencia en la fase superior e inferior es baja y el % de recuperación depende de R .

Boaglio, Bassani, Picó y Nerli (2006), estudió la partición de α -LA, β -LG, BSA, α -1 antitripsina (α -1AT) con el objetivo de purificar la α -1AT de las demás proteínas del suero de queso por medio de un sistema PEG/citrato de sodio. Se estudió el efecto del PM del PEG (1000, 1450, 3350), pH (5.2, 6.2, 8.2), y TLL (con concentraciones del PEG de 9.7 a 15.92 % y el citrato de 8.82 a 13.97). Se encontró que con aumentos de TLL , pH, concentración y PM del PEG se incrementa el valor de K para todas las proteínas disminuye. Los autores atribuyeron esto al volumen libre disponible en la fase superior, lo cual obliga a la proteína a migrar hacia la fase salina o inferior. Se encontraron dos sistemas ATPE potenciales para separar α -1AT del principal contaminante (β -LG), PEG₁₀₀₀/ (pH 8.2) con una recuperación y pureza 88.9 y 57.4 %; y PEG₁₄₅₀/ (pH 5.2) 96.3 y 56.4 %. Usando estos sistemas, se determinó que el valor de K no varió cuando se usó α -1AT en disolución mezclada con las otras proteínas o sola. Se usaron estos sistemas para separar la α -1AT en leche y se estudió el efecto de R (valores 1, 2 y 3), el porcentaje de rendimiento mostró un valor alrededor de 91 % y no varió significativamente al aumentar R . Sin embargo, el valor de K de α -1AT disminuyó de 0.71 a 0.034, mientras que el % de pureza aumentó de 77 a 98 %. Los autores atribuyeron la disminución del valor de K a la interacción que existe entre las proteínas y las biomoléculas contenidas en la leche.

Alcântara et al. (2011), reportó la partición de proteínas de suero de queso α -LA, β -LG y Glicomapeptido (Gmp) usando un sistema ATPE PEG 2000/ KH_2PO_4 , K_2HPO_4 con el objetivo de aislar β -LG de las demás proteínas. Se usó el método superficie de respuestas usando un diseño de compuesto central rotativo con 2 variables y 3 niveles. Las variables fueron pH (5.29, 5.5, 6.0, 6.5, 6.71), concentración de NaCl (0.159, 0.200, 0.300, 0.400, 0.441 M), la concentración de PEG y fosfato se fijaron a 13 %. En general, los resultados mostraron que el coeficiente de partición (K) para α -LA y Gmp fueron altos (partición hacia la fase polimérica), y bajos para β -LG (partición hacia la fase salina). Conforme el pH del sistema incrementó, K de α -LA

y Gmp incrementaron; por otro lado K de β -LG disminuyó. Se encontró que las condiciones óptimas de partición fueron pH 6.7 y concentración de NaCl de 0.35 M a 25 °C, con un rendimiento de extracción de 97.3 ± 0.03 para β -LG en la fase inferior y 811 ± 0.15 , 97.8 ± 0.04 para α -LA y Gmp respectivamente.

Lu, Yang, Zhao y Xia (2010) estudiaron la partición de BSA usando un sistema ATPE PEG/citrato de potasio, ácido cítrico. Se estudió el efecto del PM (1000, 2000, 4000 y 6000) y concentración del PEG (12 a 21 %) a una concentración fija de citrato (20 %) sobre la partición de BSA. Se encontró que al aumentar tanto el PM del PEG el valor de K disminuyó, debido al efecto de exclusión del PEG. El aumento de la concentración del PEG en cada PM aumentó el valor de K . El BSA mostró alta afinidad por la fase superior. El mejor resultado se obtuvo con PEG 1000. Posteriormente, se evaluó el efecto de la concentración de BSA sobre la partición. Se observó que el valor de K aumenta cuando se incrementa la concentración de BSA y 0.75 mg g^{-1} fue interpretado como la concentración de saturación en la fase superior. El resultado de la optimización de tres variables independientes que fueron concentración del PEG 1000 (17 a 21 %), citrato (18-20 %) y pH (6-8) en un diseño de componente central fue PEG/citrato (19/21 %) a pH 7.0 y 30 ° C. En estas condiciones se logró una recuperación del 99 %.

Jara y Pilosof (2011), estudiaron la partición de α -LA y β -LG usando un sistema ATPE proteína concentrada de suero (WPC) / hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Se estudió la concentración de WPC de 8 hasta 20 % y para HPMC (0.5 y 2.0 %). El sistema particionó con una fase inferior rica en proteínas y una fase superior rica en HPMC. Se observó que el valor de K aumentó para α -LA y β -LG al aumentar el contenido de WPC y de HPMC. El valor de K para α -LA y β -LG usando un 0.5 % de HPMC fue menor a la unidad, lo que significa que las proteínas particionaron en su mayoría en la parte inferior. Mientras que a concentraciones altas de WPC y 2 % de HPMC el coeficiente K tuvo valores ligeramente mayores a la unidad. Se logró un rendimiento de alrededor de 80 % para α -LA y β -LG en la fase superior en un sistema WPC/HPMC (20/0.5 %) con altos valores de R (2.52-6.41).

Mokhtarani, Mortaheb, Mafi y Amini (2011) estudiaron la partición de α -LA y β -LG de suero de queso dulce en un sistema ATPE polivinilpirrolidona (PVP) ₃₃₅₀ / KH_2PO_4 , K_2HPO_4 usando un diseño de compuesto central ortogonal. Las variables independientes fueron concentración de fosfato (9., 9.9, 12, 14.1, 15), de PVP (15.0, 16.5, 20.5, 24.4, 26), temperatura (10.0, 14.4, 25, 35.6, 40) y pH (6.5, 6.8, 7.5, 8.2, 8.5). Se eligió a la concentración de PVP, fosfato y concentración de proteína en la fase superior e inferior como variables dependientes. Los resultados indicaron que en la mayoría de los casos α -LA particionó a la fase rica en PVP, mientras que β -LG particionó a la fase salina o inferior. Se observó además que al incrementar la concentración de fosfato, el valor de K para α -LA aumentó y para β -LG disminuyó. Al aumentar el % de PVP en el sistema, el valor de K incrementó también para ambas proteínas, afectando más a la α -LA. Al igual que la temperatura que mostró un mayor efecto para α -LA que para β -LG con valores de menos de la unidad hasta alrededor de 4, mientras que la β -LG mostró valores menores a la unidad. Los autores atribuyen este resultado a la viscosidad del PVP. Mediante este experimento se lograron rendimientos alrededor de 94 % con valores de K de 0.04 para β -LG.

Nandini y Rastogi (2011) estudió la partición de la lactoperoxidasa (LPO) de suero de queso acidificado. Se usó un sistema PEG/ sal (14/14 %) donde se estudió el efecto del PM del PEG (1500, 4000, 6000 y 20000), tipo de sal (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, citrato de sodio dihidratado, Na_2SO_4) y pH (4.3, 5.0, 7.0, 8.0 y 12.0), TLL y R . Se mantuvo un valor de R cercano a 1.0 para todos los sistemas. Se encontró que la LPO particionó preferentemente hacía la fase salina y el sistema con mayor valor de K (aproximadamente 0.8) en la fase superior fue $\text{PEG}_{1500}/ \text{KH}_2\text{PO}_4$, K_2HPO_4 . Con el incremento del PM del PEG, el valor de K incrementó de 0.8 a 4.4. Además se observó que al aumentar el valor del pH y TLL del sistema el valor de K aumentó. Finalmente el valor de K para proteína total y LPO disminuye al aumentar el valor de R . Los autores reportaron como condiciones óptimas pH 8.0, TLL 25 %, 0.35 R para un sistema $\text{PEG}_{6000}/ \text{KH}_2\text{PO}_4$, K_2HPO_4 .

Perumalsamy y Batcha (2011), estudiaron la partición de BSA usando un sistema PEG/citrato. Se estudió el efecto sobre el PM del PEG (4000, 6000, 8000) y concentración de éste (5, 10, 15, 20 %) a un pH de 8.5 y 30 °C. Se observó que el coeficiente de partición K disminuyó al aumentar el PM y concentración del PEG y esto se atribuyó al efecto de exclusión del PEG hacia la proteína. La proteína BSA mostró mayor afinidad por la fase salina con valores menores a la unidad. Además, al aumentar el pH de 7 a 8.5 pudo apreciarse una disminución del coeficiente de partición. Al aumentar la concentración del citrato de sodio de 11 a 19 %, pudo observarse que el valor de K aumentó y esto se le atribuyó al efecto precipitación salina de la sal con la proteína. Finalmente, al aumentar la temperatura de 15 a 45 °C, se observó una disminución en el valor de K , y esto se debió probablemente a la variación de la estructura en el PEG provocada por el aumento en la temperatura, al exponer las partes hidrofóbicas, de esta manera provocando una migración del BSA hacia la parte salina.

Alcântara et al. (2014), estudió la partición de α -LA y β -LG de suero de queso usando un sistema PEG₆₀₀₀/poliacrilato de sodio (NaPA) 8000 a 25° C y una concentración de NaCl de 1%. Se utilizó un diseño de componente central rotatorio considerando tres variables independientes: concentración de PEG (6.64, 8, 10, 12 y 13.36 %), de NaPA (6.64, 8, 10, 12 y 13.36 %) y pH (5.7, 6, 6.5, 7, 7.3) con el objetivo de maximizar el K para α -LA y minimizarlo para β -LG. En general, pudo observarse que la α -LA mostró valores mayores a 1 de K , lo que significa su afinidad por la fase polimérica, mientras que los valores fueron bajos (<1) para β -LG que particionó en la fase salina. El sistema con valores óptimos fue PEG₆₀₀/NaPA (12/12 %) a pH 7.2, con valores de K de 7.8 y 0.02 para α -LA y β -LG, respectivamente. Al usar estos parámetros con suero fresco, se obtuvo un coeficiente de partición de 6.8 y 0.2; y rendimientos de 87.2 y 83.3 % para α -LA y β -LG, respectivamente, lo que muestra que el sistema tiene potencial para separar ambas proteínas.

Kalaivani y Regupathi (2015) estudiaron la partición de α -LA y β -LG usando un sistema PEG₁₀₀₀/citrato de trisodio. Se evaluó el efecto de TLL (43.33, 47.33, 53.19, 59.05, 63.05 %), pH (6.7, 7.0, 7.5, 8.0, 8.3), y concentración de suero de queso

ácido (1.32, 2.0, 3.0, 4.0, 4.69 g). Los sistemas se ajustaron a 10 g y las variables a optimizar fueron cuatro: % recuperación y pureza de α -LA en la fase superior y % recuperación y pureza β -LG en la fase inferior. Se encontró que a pH 8 el valor de K para α -LA fue mayor que a pH 7.5, sin embargo, la pureza disminuyó. Este comportamiento fue atribuido a la partición de β -LG en la fase superior debido a que los aniones citrato son más prevalentes a ese pH, lo cual repele la carga neta negativa de las proteínas. Se observó también que lactosa, grasa y residuos de proteínas precipitaron en la interfase del sistema con el incremento del pH. A pH 7.5 se observó que un mejor % de recuperación y pureza en la fase superior para α -LA, β -LG para la fase inferior. Se observó que la concentración del suero mayor a 30 % en el sistema afectó la partición de α -LA, precipitándola en la interfase. Se observó que con el incremento de TLL disminuyó el valor de recuperación de ambas proteínas, lo cual se le atribuyó a que las proteínas precipitaron en la interfase debido a las condiciones desfavorables. Se encontró que una TLL de 53.19 % fue la adecuada para llevar a cabo la partición de α -LA y β -LG. El incremento de R de 0.6 a 2.9 resultó en la menor disminución en recuperación de la proteína en la fase inferior (α -LA, β -LG y proteína total). Además, el incremento de R de 2.8 a 5.8 resultó en un ligero incremento en la recuperación de β -LG y proteína total en la fase superior. Los autores concluyeron que la interacción hidrofóbica entre el PEG y las proteínas se incrementa con valores de R superiores a 1. Finalmente, se encontró que las condiciones optimizadas fueron 54.13 % para TLL , pH de 7.23 y 3.06 g de suero para maximizar la pureza y recuperación (%) de α -LA, β -LG en la fase superior e inferior respectivamente, con % de recuperación alrededor de 90 %.

Zhang et al (2016), estudiaron la partición de α -LA, β -LG de aislado de proteína de suero (WPI) en un sistema poli(etilenglicol-ran-propilenglicol)monobutíler/ KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 - K_2HPO_4 con el objetivo de separar ambas proteínas. Se estudiaron los efectos del pH, concentración de WPI, concentración de NaCl y relación volumen (R). El método de ensamble del sistema fue el siguiente: se adicionó un volumen de una solución de polímero al 40 % y 15.5 % de la solución salina, posteriormente se agregó 2 mL de solución de WPI; el sistema fue de 10 mL en total. Se reportó que entre las sales usadas, KH_2PO_4 posee mayor potencial

densidad de carga eléctrica que K_2HPO_4 , también tiene capacidad para hidratarse mejor, por tanto se observó una curva binodal a concentraciones más altas de los componentes. Se observó que cuando se varió el pH de 4.0 a 8.0 en relación 5:3 (v/v) de los componentes del sistema, el rendimiento para α -LA disminuyó, alcanzando un valor de 92.16 % en la fase superior. Mientras que en la fase inferior, se logró un rendimiento de 92 % a un pH de 5.96. Se reportó también que al variar la concentración de WPI de 1, 2 y 3 mg mL⁻¹ en relación 5:3 (v/v) de los componentes del sistema, el rendimiento de extracción disminuyó de 114.67 a 78.88 % en la fase superior para α -LA, y aumentó de 58.52 a 69.95 % para β -LG. Al variar la concentración de sal en el sistema de 0.030 a 0.040 g (usando la relación 3:5, v/v), se observó un incremento en el rendimiento de extracción de ambas proteínas, de 75.88 a 92.16 % para α -LA y de 42.31 a 52.63 para β -LG en la fase superior e inferior respectivamente. Finalmente, al aumentar la relación volumen (5:3, 4:4, 3, 5) se encontró que el rendimiento máximo para α -LA y β -LG se encontraron a una relación volumen de 1, con rendimientos de 98.23 y 96.56 % para cada proteína en la fase superior e inferior, respectivamente. Se encontró que las condiciones óptimas para la separación de las proteínas fueron $R=1$ (solución de polímero de 40 % / solución de sal 15.15 %), concentración de la disolución de WPI de 1 mg mL⁻¹ y una concentración de NaCl de 0.4 g por 10 mL.

Cuadro 4. Sistemas ATPE aplicados a la extracción de las proteínas del suero de queso.

Origen biológico	Tipo de sistema ATPE	Compuesto objetivo	Fase de recuperación	Uso DF	Referencia
SQ cheddar	PEG 3500, 8000 / KH_2PO_4	Proteína total	Fase salina	No	Chen (1989)
SQ cheddar	PEG 1000, 1500, 4000, 6000, 10000 / citrato de potasio-ácido cítrico	α -LA, β -LG	α -LA fase polimérica / β -LG fase salina	No	Jyh-Ping (1992)
SQ	PEG 1000 / KH_2PO_4 - K_2HPO_4	Proteína total	Ambas fases	Si	Rito-Palomares y Hernandez (1998)
Proteína aislada de suero	PEG 600, 1450, 3350, 8000, 10000 / KH_2PO_4 - K_2HPO_4 , maltodextrina 2000, 4000	α -LA, β -LG, BSA	α -LA fase PEG / β -LG fase fosfato, fase maltodextrina / BSA fase maltodextrina	No	Alves et al. (2000)
α -LA, β -LG, BSA GR	PEG 1450, 8000, 10000 / maltodextrina 2000, 4000	α -LA, β -LG, BSA	α -LA fase PEG / β -LG ambas / BSA fase dextrano	No	da Silva y Meirelles (2000)
BSA GR	PEG 3500 / dextrano Rango de pH 4.2-9.8 Rango de NaCl 0.06-0.34 M	BSA	Fase salina	No	Gündüz y Korkmaz (2000)
PSC	PEG 600, 900 1500 / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	α -LA, β -LG	α -LA fase polimérica / β -LG fase salina	No	Rodrigues et al. (2001)
α -LA, β -LG GR	PEG 1500, 4000, 6000, 8000 / KH_2PO_4 - K_2HPO_4	α -LA, β -LG	α -LA fase PEG / β -LG fase salina	No	Zuñiga et al. (2001)
BSA GR	PEG 600-8000 / Fosfato de potasio	BSA	Ambas fases	Si	Farruggia et al. (2003)
PSC	PEG 1500, 4000, 6000, 10000 / Reppal PES 100 (almidón hidroxipropílico)	Proteasa peptona 3	Fase polimérica (PEG)	No	Rodrigues et al. (2003)

DF: Diagrama de fase SQ=Suero de queso PSC=Proteína de suero concentrada GR=Grado Reactivo

Cuadro 4. Sistemas ATPE aplicados a la extracción de las proteínas del suero de queso (continuación).

Origen biológico	Tipo de sistema ATPE	Compuesto objetivo	Fase de recuperación	Uso DF	Referencia
Mezcla artificial de , α -LA, β -LG y α -1 antitripsina (α -1AT)	PEG 1000, 1500, 3350 / KH_2PO_4	α -1 antitripsina	Fase salina	No	Capezio et al. (2005)
SQ ácido fermentado	PEG 6000, 4000/ KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MD	Proteína total	Fase polimérica	Sí	Anandharamakrishnan et al. (2005)
Mezcla artificial α -LA, β -LG, BSA, α -1AT	PEG/citrato de sodio	α -1-antitripsina	Fase salina	Sí	Boaglio et al. (2006)
Disolución de BSA	PEG 1000, 2000, 4000, 6000 / citrato de potasio-ácido cítrico	BSA	Fase polimérica	Sí	Lu et al. (2010)
SQ, α -LA, β -LG, glicomapéptido (Gmp) GR	PEG 2000/ KH_2PO_4 , K_2HPO_4	α -LA, β -LG, (Gmp)	α -LA, Gmp fase polimérica/ β -LG fase salina	No	Alcântara et al. (2011)
PSC	Concentrado de proteína de suero /hidroxipropilmetilcelulosa	α -LA, β -LG	Salina/ polimérica	Si	Jara y Pilosof (2011)
SQ	Polivinilpirrolidona / KH_2PO_4 - K_2HPO_4	α -LA, β -LG	Ambas fases	No	Mokhtarani et al. (2011)
SQ acidificado	PEG 1500, 4000, 6000, 20000 / KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , citrato de sodio dihidratado, Na_2SO_4	Lactoperoxidasa	Fase salina	Sí	Nandini y Rastogi (2011)
BSA GR	PEG 4000, 6000, 8000/ ácido cítrico	BSA	Fase salina	No	Perumalsamy y Batcha (2011)

DF: Diagrama de fase SQ=Suero de queso PSC=Proteína de suero concentrada GR=Grado Reactivo

Cuadro 4. Sistemas ATPE aplicados a la extracción de las proteínas del suero de queso (continuación).

Origen biológico	Tipo de sistema ATPE	Compuesto objetivo	Fase de recuperación	Uso DF	Referencia
SQ	PEG ₆₀₀ / poliacrilato de sodio	α -LA, β -LG	α -LA fase PEG / β -LG fase salina	No	Alcântara et al. (2014)
SQ ácido	PEG 1000 / citrato de trisodio	α -LA, β -LG	α -LA fase PEG / β -LG fase salina	No	Kalaivani y Regupathi (2015)
Proteína aislada de suero	Poli(PEG-ranpropilenglicol) monobutil éter/ KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 - K_2HPO_4	α -LA, β -LG	α -LA fase PEG / β -LG fase fosfato	Si	Zhang et al. (2016)

DF: Diagrama de fase SQ=Suero de queso PSC=Proteína de suero concentrada GR=Grado Reactivo

Cuadro 5. Diagramas binodales disponibles en la literatura.

Componentes		Parámetros Merchuk				Referencia
x_1	x_2	Temp	a	b	C	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₁₀₀₀	25	NR	NR	NR	Gao, Peng, Li y Li (1991)
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₁₅₄₀	25	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₂₀₀₀	25	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₄₀₀₀	25	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₂₀₀₀	25	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₂₀₀₀	25	NR	NR	NR	
KH ₂ PO ₄ - K ₂ HPO ₄	PEG ₁₀₀₀	NR	NR	NR	NR	Huddleston, Wang, Flanagan, O'Brien y Lyddiatt (1994)
KH ₂ PO ₄ - K ₂ HPO ₄	PEG ₁₄₅₀	NR	NR	NR	NR	
PEG 1000	KH ₂ PO ₄ - K ₂ HPO ₄	25	NR	NR	NR	Rito-Palomares y Hernandez (1998)
K ₃ PO ₄	PEG ₁₀₀₀	25	63.40	-0.3242	4.285 x10 ⁻⁴	Huddleston, Willauer y Rogers (2003)
K ₃ PO ₄	PEG ₂₀₀₀	25	115.88	-0.6685	5.727 x10 ⁻⁴	
K ₃ PO ₄	PEG ₃₄₀₀	25	77.35	-0.5213	1.141 x10 ⁻⁴	
K ₂ CO ₃	PEG ₂₀₀₀	25	124.20	-0.5589	9.392x10 ⁻⁴	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₂₀₀₀	25	87.41	-0.4360	4.303x10 ⁻⁴	
Li ₂ SO ₄	PEG ₂₀₀₀	25	73.98	-0.3444	6.590x10 ⁻⁴	
MnSO ₄	PEG ₂₀₀₀	25	65.65	-0.4293	2.671x10 ⁻⁴	
ZnSO ₄	PEG ₂₀₀₀	25	70.69	-0.4542	2.970x10 ⁻⁴	Pérez, Wargon y Pilosof (2006)
NaOH	PEG ₂₀₀₀	25	105.79	-0.5572	2.346x10 ⁻⁴	
Concentrado de proteína	Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)	27	NR	NR	NR	
Caseinato de sodio	Goma guar	20	NR	NR	NR	Spyropoulos, Portschi y Norton (2010)
Caseinato de sodio	Goma de algarrobo	20	NR	NR	NR	
Poli(PEG-ranpropilenglicol) monobutil éter	KH ₂ PO ₄	23	680.62	-1.67	3.293x10 ⁻³	Zhang et al. (2016)
Poli(PEG-ranpropilenglicol) monobutil éter	K ₂ HPO ₄	23	146.35	-0.96	6.672 x10 ⁻³	
Poli(PEG-ranpropilenglicol) monobutil éter	KH ₂ PO ₄ - K ₂ HPO ₄	23	8.26	-0.57	8.853 x10 ⁻³	

Cuadro 5. Diagramas binodales disponibles en la literatura (continuación).

Componentes				Parámetros Merchuk			Referencia
x_1		x_2	temp	a	b	c	
Citrato de trisodio-ácido cítrico		PEG ₁₀₀₀	20	NR	NR	NR	Marcos, Fonseca, Ramalho y Cabral (1998)
KH ₂ PO ₄ - K ₂ HPO ₄ +6% urea Na ₂ CO ₃		PEG ₁₄₅₀	25	NR	NR	NR	Meller da Silva y Meirelles (2001) de Lemos et al. (2010)
		L35	10	NR	NR	NR	
			25	NR	NR	NR	
			40	NR	NR	NR	
Acetato de sodio		L35	10	NR	NR	NR	
			25	NR	NR	NR	
			40	NR	NR	NR	
Citrato de amonio		L35	10	NR	NR	NR	
			25	NR	NR	NR	
			40	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ SO ₄		L35	10	NR	NR	NR	
			25	NR	NR	NR	
			40	NR	NR	NR	
Succinato de sodio		L35	10	NR	NR	NR	
			25	NR	NR	NR	
Citrato hidrógeno diamonio		PEG ₂₀₀₀	25	NR	NR	NR	
			30	NR	NR	NR	
			35	NR	NR	NR	
			40	NR	NR	NR	
			45	NR	NR	NR	
Citrato hidrógeno diamonio		PEG ₄₀₀₀	25	NR	NR	NR	
			30	NR	NR	NR	
			35	NR	NR	NR	
			40	NR	NR	NR	
			45	NR	NR	NR	
KH ₂ PO ₄ - K ₂ HPO ₄ +6% urea		PEG ₃₃₅₀	25	NR	NR	NR	
KH ₂ PO ₄ - K ₂ HPO ₄ +6% urea		PEG ₈₀₀₀	25	NR	NR	NR	
Citrato de trisodio-ácido cítrico		PEG ₃₃₅₀	20	NR	NR	NR	
Na ₂ SO ₄		PEG ₂₀₀₀	25	NR	NR	NR	Nagaraja y Iyyaswami (2015)

Cuadro 5. Diagramas binodales disponibles en la literatura (continuación).

Componentes		Parámetros Merchuk				Referencia
X ₁	X ₂	temp	a	b	c	
MnSO ₄	PEG ₁₀₀₀	NR	NR	NR	NR	Snyder, Cole y Szlag (1992)
MnSO ₄	PEG ₃₃₅₀	25	NR	NR	NR	
MnSO ₄	PEG ₈₀₀₀	25	NR	NR	NR	
Na ₂ SO ₄	PEG ₁₀₀₀	25	NR	NR	NR	
Na ₂ SO ₄	PEG ₃₃₅₀	25	NR	NR	NR	
Na ₂ SO ₄	PEG ₈₀₀₀	25	NR	NR	NR	
Na ₂ CO ₃	PEG ₁₀₀₀	25	NR	NR	NR	
Na ₂ CO ₃	PEG ₃₃₅₀	25	NR	NR	NR	
Na ₂ CO ₃	PEG ₈₀₀₀	25	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₁₀₀₀	25	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₃₃₅₀	25	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₈₀₀₀	25	NR	NR	NR	
KH ₂ PO ₄	PEG ₁₀₀₀	25	NR	NR	NR	Merchuk, Andrews y Asenjo (1998)
KH ₂ PO ₄	PEG ₃₃₅₀	25	NR	NR	NR	
KH ₂ PO ₄	PEG ₈₀₀₀	25	NR	NR	NR	
KH ₂ PO ₄ - K ₂ HPO ₄ 0 % NaCl	PEG ₄₀₀₀	20	71.7	-0.62	-1.23x10 ⁻³	
KH ₂ PO ₄ - K ₂ HPO ₄ 2 % NaCl	PEG ₄₀₀₀	20	63.69	-20.64	-2.68x10 ⁻³	
KH ₂ PO ₄ - K ₂ HPO ₄ 10 % NaCl	PEG ₄₀₀₀	20	57.43	-20.64	-3.50x10 ⁻³	Fu, Yang y Xiu (2015)
(NH ₄) ₂ SO ₄	etanol	18	NR	NR	NR	
Citrato de sodio-ácido cítrico	PEG ₁₀₀₀	30	NR	NR	NR	
Citrato de sodio-ácido cítrico	PEG ₂₀₀₀	30	NR	NR	NR	Lu et al. (2010)
Citrato de sodio-ácido cítrico	PEG ₄₀₀₀	30	NR	NR	NR	
Citrato de sodio-ácido cítrico	PEG ₆₀₀₀	30	NR	NR	NR	Liu, Liu, Du, Zhao y Du (2016)
Na ₂ SO ₄	Triton X-100	20	NR	NR	NR	
		25	NR	NR	NR	
		30	NR	NR	NR	
		35	NR	NR	NR	
Na ₂ SO ₄	Triton X-100+ SDS 6%	25	NR	NR	NR	

Cuadro 5. Diagramas binodales disponibles en la literatura (continuación).

Componentes		Parámetros Merchuk				Referencia
x_1	x_2	temp	a	b	c	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₁₀₀₀	15	NR	NR	NR	Voros, Proust y Fredenslund (1993)
		25	NR	NR	NR	
		35	NR	NR	NR	
		45	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₂₀₀₀	15	NR	NR	NR	
		25	NR	NR	NR	
		35	NR	NR	NR	
		45	NR	NR	NR	
Na ₂ CO ₃	PEG ₁₀₀₀	15	NR	NR	NR	
		25	NR	NR	NR	
		35	NR	NR	NR	
		45	NR	NR	NR	
Na ₂ CO ₃	PEG ₂₀₀₀	15	NR	NR	NR	
		25	NR	NR	NR	
		35	NR	NR	NR	
		45	NR	NR	NR	
Na ₂ SO ₄	PEG ₄₀₀₀	20	0.6277	-4.749	1731	González-Amado, Rodil, Arce, Soto y Rodríguez (2016)
Na ₂ SO ₄	PEG ₄₀₀₀	35	0.7700	-5.592	2692	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₄₀₀₀	5	0.6318	-3.036	684.5	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₄₀₀₀	20	0.6902	-3.388	858.9	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₄₀₀₀	35	0.8188	-4.486	1118	
Na ₂ SO ₄	PEG ₈₀₀₀	20	0.6401	-5.701	2139	
Na ₂ SO ₄	PEG ₈₀₀₀	35	0.5459	-4.033	12550	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₈₀₀₀	5	1.170	-6.220	645.1	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₈₀₀₀	20	1.020	-5.744	612.4	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₈₀₀₀	35	0.9599	-5.282	830.7	
FeSO ₄	PEG ₄₀₀₀	15	0.791	-5.313	411.06	Muruchi, Galleguillos y Jimenez (2016)
		25	0.743	-5.353	520.66	
		35	0.772	-5.759	629.77	

Cuadro 5. Diagramas binodales disponibles en la literatura (continuación).

Componentes		Parámetros Merchuk				Referencia
x_1	x_2	temp	a	b	c	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	PEG ₁₀₀₀	25	NR	NR	NR	Zhang et al. (2013)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	PEG ₂₀₀₀	25	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	PEG ₆₀₀₀	25	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ CO ₃	PEG ₁₀₀₀	25	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ CO ₃	PEG ₂₀₀₀	25	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ CO ₃	PEG ₆₀₀₀	25	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆	PEG ₁₀₀₀	25	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆	PEG ₂₀₀₀	25	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆	PEG ₆₀₀₀	25	NR	NR	NR	
Na ₂ SO ₄	PEG ₄₀₀	20	82.45	-0.43	1.55x10 ⁻⁴	de Araujo Sampaio et al. (2016)
		30	102.01	-0.49	1.38x10 ⁻⁴	
		50	100.00	-0.48	1.56x10 ⁻⁴	
Na ₂ SO ₄	PEG ₄₀₀₀	20	NR	NR	NR	
		30	NR	NR	NR	
		50	NR	NR	NR	
Na ₂ SO ₄	PEG ₆₀₀₀	20	NR	NR	NR	
Na ₂ SO ₄	1-propanol	30	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ NO ₃	1-propanol	50	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₄₀₀	10	NR	NR	NR	Murari et al. (2015)
		25	NR	NR	NR	
		40	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₁₀₀₀₀	10	NR	NR	NR	
		25	NR	NR	NR	
		40	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ SO ₄	PEG ₃₅₀₀₀	10	NR	NR	NR	
		25	NR	NR	NR	
		40	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1-propanol	25	NR	NR	NR	Khayati y Shahriari (2016)
Na ₂ SO ₄	2-propanol	25	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ NO ₃	2-propanol	25	NR	NR	NR	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2-propanol	25	NR	NR	NR	

El uso de los diagramas de equilibrio es poco reportado en los trabajos de partición de proteínas de suero de queso. De acuerdo a Rito-Palomares (2004), los diagramas de fase son necesarios para la evaluación de los parámetros del sistema como son *TLL*, pH, relación volumen (*R*) entre otros. Los diagramas de equilibrio nos aportan información que es muy valiosa al momento de elegir los sistemas para la partición de la biomolécula objetivo. Ellos nos aportan los límites de la zona de trabajo en la cual los sistemas pueden desarrollarse. De otra manera, el no usar diagramas de equilibrio nos limita a sólo una zona que podría no ser la mejor.

En los trabajos de investigación revisados, se observa que recientemente el uso de metodologías como superficie de respuestas para la optimización de la partición de una biomolécula objetivo han sido reportadas con altos valores de recuperación, pero con valores de *R* altos. En el Cuadro 5 se muestran algunos diagramas de equilibrio disponibles en la literatura. Puede apreciarse que se utiliza mayormente el PEG, por su amplio rango de PM. Los fosfatos y sulfatos son las sales más comúnmente usadas (Raja et al., 2011). La mayoría de los diagramas de flujo están reportados a temperatura ambiente (25 °C) y van desde 5 hasta 50 °C. En la mayoría de los diagramas de equilibrio del Cuadro 5 se usa agua como solvente. Sin embargo, para ciertos casos, el equilibrio de los sistemas ATPE debería realizarse con el líquido biológico en cuestión. Se ha reportado que al usar soluciones biológicas, el diagrama de equilibrio se ve afectado al cambiar la relación volumen (*R*) (Rito-Palomares & Cueto, 2000) y la posición de la línea binodal (Rito-Palomares & Hernandez, 1998) y esto no es tomado en cuenta al momento de elegir un sistema que se sitúa sobre un diagrama de equilibrio basado en agua. Existen escasos diagramas de flujo contruidos sobre soluciones biológicas. Esto puede ser debido a que las técnicas típicas para la construcción de diagramas de fase no son adecuadas, tal como lo es el punto de turbidez. Se ha reportado la dificultad de la construcción de un diagrama de equilibrio usando soluciones biológicas (Rito-Palomares & Hernandez, 1998) y el efecto que éstas causan sobre el equilibrio del sistema (Rito-Palomares & Cueto, 2000), por tanto éste es un hecho que debe ser tomado en cuenta.

Adicionalmente, puede apreciarse en el Cuadro 5, que recientemente se han reportado ampliamente diagramas de equilibrio con sales que contiene amonio (NH_4). Sin embargo para la partición de las proteínas del suero de queso este tipo de sales (Cuadro 4) han tenido una aplicación muy limitada. De 22 trabajos de investigación contenidos en el Cuadro 4, sólo dos reportan el uso $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, los cuales se describen a continuación. Rodrigues et al. (2001) usaron $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una concentración fija de 14 % para todos los experimentos de partición, limitando el área de efecto de esta sal. Anandharamakrishnan et al. (2005) usó un sistema $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{PEG}_{4000}$ (14.26/17.88%) y cuatro sistemas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{PEG}_{6000}$ (9.44/10.04, 10.87/12.70, 12.46/15.30, 14.26/17.88 %) con un rango limitado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 9.44 a 14.26 %.

Los sistemas PEG/fosfatos son los sistemas ATPE más ampliamente utilizados (Rito-Palomares, 2004). De acuerdo a los trabajos de investigación revisados, el uso de un sistema polímero/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es una oportunidad que se ha usado muy limitadamente para explorar el comportamiento de la partición de las proteínas del suero de queso.

2.8 Sulfato de amonio como componente para sistemas ATPE

Es generalmente aceptado que los iones afectan la estructura y la dinámica del agua; sin embargo, lo que se entiende como un efecto que existe está bajo debate (Xie & Gao, 2013).

Los cationes y aniones han sido clasificados separadamente en términos de su capacidad para precipitar proteínas. Este ranking es llamado la serie Hofmeister. El mismo ranking aplica para la estabilización de proteínas. ¿Qué causa la serie Hofmeister a nivel molecular? Muchos artículos han sido publicados en dirección a esta pregunta. Las hipótesis propuestas parecen caer en dos principales teorías (Shimizu, McLaren, & Matubayasi, 2006).

En primer lugar, ha sido hipotetizado que la diferencia (variación) en el efecto de los iones sobre la estructura del agua es la causa de la serie Hofmeister. Se ha propuesto que algunos iones (cosmotróficos) mejoran la estructura del agua

rodeando los iones, lo cual provoca el fortalecimiento del efecto hidrofóbico, así estabilizando las proteínas. Por otro lado, los iones que rompen la estructura de agua rodeando los iones (caotrópicos) se consideran que rompen el efecto hidrofóbico, así desnaturalizando las proteínas. Se ha propuesto que hay competencia entre la carga y el tamaño iónico si un ion es caotrópico o cosmotrópico (Figura 3).

En segundo lugar, la diferencia entre la unión sal-proteína, ha sido la causa de la serie Hofmeister. Un análisis termodinámico ha demostrado que las sales que desnaturalizan proteínas tienden a unirse a las proteínas, mientras las sales que estabilizan proteínas tienden a ser excluidas de la superficie de la proteína (Shimizu et al., 2006).

Con respecto a la capacidad estabilización de proteínas, esta serie se ha clasificado de la siguiente manera:

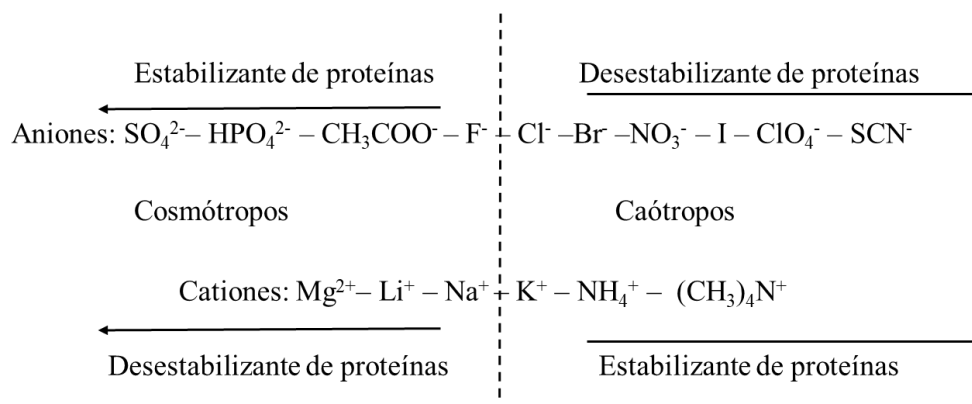


Figura 3. Clasificación de los aniones y cationes de acuerdo a sus propiedades caotrópicas/cosmotrópicas (Yang, Liu, Chen, & Halling, 2010).

Los aniones cosmotróficos aumentan la tensión superficial, es más difícil penetrar en la proteína, disminuyen la solubilidad de la proteína, aumenta la agregación, disminuye la desnaturalización y aumenta la estabilidad proteica. Por otro lado, los aniones caotrópicos disminuyen la tensión superficial, fácilmente penetran en la proteína, aumentan la solubilidad y desnaturalización proteica, y disminuyen la estabilidad (Zhang & Cremer, 2006).

Se ha encontrado que las proteínas son usualmente estabilizadas por un anión cosmotrópico y un catión caotrópico y desestabilizadas por un anión caotrópico y un catión cosmotrópico (Yang et al., 2010).

Para el caso del sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, los iones NH_4^+ y SO_4^{2-} están en los extremos de esta serie y han demostrado estabilizar las proteínas (Duong-Ly & Gabelli, 2014).

Mientras que algunas sales pueden ser usadas como precipitantes, el sulfato de amonio tiene muchas propiedades que la hacen la más usada. Es muy estabilizante para la estructura de las proteínas, muy soluble, relativamente barata, el material puro está fácilmente disponible, y la densidad de una solución saturada (4.1 M) a 25 °C ($\rho=1.235 \text{ g mL}^{-1}$) no es tan alta como otro agente precipitante, el fosfato de potasio (3M, $\rho=1.33 \text{ g mL}^{-1}$) (Burgess, 2009).

El mecanismo de precipitación salina es basado en la solvatación preferencial debido a la exclusión del cosolvente (sal) de la capa de agua cercanamente asociada con la superficie de la proteína (capa de hidratación). La capa de hidratación, típicamente de 0.3 a 0.4 g de agua por g de proteína, juega un papel crítico en el mantenimiento de la solubilidad y el plegado correcto de la conformación nativa (Wingfield, 2001).

De acuerdo a la revisión de literatura, este trabajo de investigación planteó la posibilidad de utilizar un sistema ATPE para la concentración y purificación de las proteínas de suero. En específico usar como componente del sistema PEG₄₀₀₀ que es un polímero de peso molecular medio y ha sido ampliamente usado. Así también, dada las propiedades que presenta y la falta de exploración del sulfato de amonio en sistemas ATPE para la partición de las proteínas del suero de queso, este trabajo se planteó considerarlo como componente del sistema ATPE para la investigación. Por otro lado también se plantea la construcción de diagramas binodales usando como solvente agua y explorar la posibilidad de usar suero como solvente.

2.10 Referencias

- Alcântara, L. A. P., Amaral, I. V., Bonomo, R. C. F., da Silva, L. H. M., da Silva, M. d. C. H., Minim, V. P. R., & Minim, L. A. (2014). Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from cheese whey in aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and sodium polyacrylate. *Food and Bioproducts Processing*, 92(4), 409-415. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.09.006>
- Alcântara, L. A. P., Minim, L. A., Minim, V. P. R., Bonomo, R. C. F., da Silva, L. H. M., & da Silva, M. d. C. H. (2011). Application of the response surface methodology for optimization of whey protein partitioning in PEG/phosphate aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography B*, 879(21), 1881-1885. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.05.007>
- Alves, J. G. L. F., Chumpitaz, L. D. A., da Silva, L. H. M., Franco, T. T., & Meirelles, A. J. A. (2000). Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 743(1), 235-239. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00111-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00111-0)
- Anandharamakrishnan, C., Raghavendra, S. N., Barhate, R. S., Hanumesh, U., & Raghavarao, K. S. M. S. (2005). Aqueous Two-Phase Extraction For Recovery Of Proteins From Cheese Whey. *Food and Bioproducts Processing*, 83(3), 191-197. doi:<https://doi.org/10.1205/fbp.03403>
- Asenjo, J. A., & Andrews, B. A. (2012). Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. *Journal of Chromatography A*, 1238(Supplement C), 1-10. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.049>
- Benavides, J., Rito-Palomares, M., & Asenjo, J. A. (2011). 2.49 - Aqueous Two-Phase Systems A2 - Moo-Young, Murray *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)* (pp. 697-713). Burlington: Academic Press.
- Boaglio, A., Bassani, G., Picó, G., & Nerli, B. (2006). Features of the milk whey protein partitioning in polyethyleneglycol-sodium citrate aqueous two-phase systems with the goal of isolating human alpha-1 antitrypsin expressed in

- bovine milk. *Journal of Chromatography B*, 837(1), 18-23.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.049>
- Burgess, R. R. (2009). Chapter 20 Protein Precipitation Techniques. In R. R. Burgess & M. P. Deutscher (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 463, pp. 331-342): Academic Press.
- Capezio, L., Romanini, D., Picó, G. A., & Nerli, B. (2005). Partition of whey milk proteins in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol–phosphate as a starting point to isolate proteins expressed in transgenic milk. *Journal of Chromatography B*, 819(1), 25-31.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.01.020>
- Carvalho, F., Prazeres, A. R., & Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of The Total Environment*, 445-446(Supplement C), 385-396.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>
- Chakraborty, A., & Sen, K. (2016). Impact of pH and temperature on phase diagrams of different aqueous biphasic systems. *Journal of Chromatography A*, 1433(Supplement C), 41-55.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.016>
- Chen, J.-P. (1989). Clarification of Cheese Whey by Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of Food Science*, 54(5), 1369-1370. doi:10.1111/j.1365-2621.1989.tb05997.x
- da Silva, L. M., & Meirelles, A. A. (2000). Bovine serum albumin, α -lactoalbumin and β -lactoglobulin partitioning in polyethylene glycol/maltodextrin aqueous-two-phase systems. *Carbohydrate Polymers*, 42(3), 279-282.
doi:[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00177-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00177-0)
- de Araujo Sampaio, D., Mafra, L. I., Yamamoto, C. I., de Andrade, E. F., de Souza, M. O., Mafra, M. R., & de Castilhos, F. (2016). Aqueous two-phase (polyethylene glycol+sodium sulfate) system for caffeine extraction: Equilibrium diagrams and partitioning study. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 98(Supplement C), 86-94.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jct.2016.03.004>

- de Lemos, L. R., Santos, I. J. B., Rodrigues, G. D., Ferreira, G. M. D., da Silva, L. H. M., da Silva, M. d. C. H., & de Carvalho, R. M. M. (2010). Phase Compositions of Aqueous Two-Phase Systems Formed by L35 and Salts at Different Temperatures. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 55(3), 1193-1199. doi:10.1021/je900589h
- Dergal, S. B. (2006). *Química de los alimentos*: Pearson Educación.
- Diederich, P., Amrhein, S., Hämmerling, F., & Hubbuch, J. (2013). Evaluation of PEG/phosphate aqueous two-phase systems for the purification of the chicken egg white protein avidin by using high-throughput techniques. *Chemical Engineering Science*, 104(Supplement C), 945-956. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.10.008>
- Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. *Methods in Enzymology*, 541, 85-94. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0>
- Farruggia, B., Nerli, B., & Picó, G. (2003). Study of the serum albumin-polyethyleneglycol interaction to predict the protein partitioning in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, 798(1), 25-33. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.08.044>
- Fu, H., Yang, S.-T., & Xiu, Z. (2015). Phase separation in a salting-out extraction system of ethanol–ammonium sulfate. *Separation and Purification Technology*, 148(Supplement C), 32-37. doi:<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.04.042>
- Gao, Y.-L., Peng, Q.-H., Li, Z.-C., & Li, Y.-G. (1991). Thermodynamics of ammonium sulfate—polyethylene glycol aqueous two-phase systems. Part1. Experiment and correlation using extended uniquac equation. *Fluid Phase Equilibria*, 63(1), 157-171. doi:[https://doi.org/10.1016/0378-3812\(91\)80028-T](https://doi.org/10.1016/0378-3812(91)80028-T)
- Glyk, A., Scheper, T., & Beutel, S. (2015). PEG–salt aqueous two-phase systems: an attractive and versatile liquid–liquid extraction technology for the downstream processing of proteins and enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(16), 6599-6616. doi:10.1007/s00253-015-6779-7

- Goja, A., Yang, H., Cui, M., & Li, C. (2013). Aqueous Two-Phase Extraction Advances for Bioseparation. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 4(1). doi:10.4172/2155-9821.1000140
- González-Amado, M., Rodil, E., Arce, A., Soto, A., & Rodríguez, O. (2016). The effect of temperature on polyethylene glycol (4000 or 8000)–(sodium or ammonium) sulfate Aqueous Two Phase Systems. *Fluid Phase Equilibria*, 428(Supplement C), 95-101. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fluid.2016.06.019>
- Grilo, A. L., Raquel Aires-Barros, M., & Azevedo, A. M. (2016). Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Fundamentals, Applications and Trends. *Separation & Purification Reviews*, 45(1), 68-80. doi:10.1080/15422119.2014.983128
- Gündüz, U., & Korkmaz, K. (2000). Bovine serum albumin partitioning in an aqueous two-phase system: Effect of pH and sodium chloride concentration. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 743(1), 255-258. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(99\)00498-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(99)00498-3)
- Hirata, G. A. M., Pessôa Filho, P. d. A., & Miranda, E. A. (2017). Solid-liquid equilibrium for proteins in solutions with an unconventional salt (ammonium carbamate): Phase behavior analysis. *Fluid Phase Equilibria*, 443(Supplement C), 1-8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.03.031>
- Huddleston, J. G., Wang, R., Flanagan, J. A., O'Brien, S., & Lyddiatt, A. (1994). Variation of protein partition coefficients with volume ratio in poly(ethylene glycol)-salt aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography A*, 668(1), 3-11. doi:[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)80086-3](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)80086-3)
- Huddleston, J. G., Willauer, H. D., & Rogers, R. D. (2003). Phase Diagram Data for Several PEG + Salt Aqueous Biphasic Systems at 25 °C. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 48(5), 1230-1236. doi:10.1021/jc034042p
- Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., . . . Yuan, Z. (2016). Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biological Procedures Online*, 18, 18. doi:10.1186/s12575-016-0048-8
- Jara, F., & Pilosof, A. M. R. (2011). Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein concentrate/hydroxypropylmethylcellulose aqueous two-

- phase systems. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 374-380.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.07.003>
- Jyh-Ping, C. (1992). Partitioning and separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in PEG/potassium phosphate aqueous two-phase systems. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 73(2), 140-147.
doi:[https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90579-J](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90579-J)
- Kalaivani, S., & Regupathi, I. (2015). Synergistic extraction of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin from acid whey using aqueous biphasic system: Process evaluation and optimization. *Separation and Purification Technology*, 146(Supplement C), 301-310.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.03.057>
- Kaul, A. (2000). The Phase Diagram. In R. Hatti-Kaul (Ed.), *Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols: Methods and Protocols* (pp. 11-21). Totowa, NJ: Humana Press.
- Khayati, G., & Shahriari, M. (2016). Measurement and Correlation of Phase Diagram Data of Hydrophilic Alcohols (1-Propanol/2-Propanol)+ Salts ($\text{Na}_2\text{SO}_4/(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{NH}_4\text{NO}_3$)+ Water Systems. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 30(1), 73-80.
- Li, J., Han, W., & Yu, Y. (2013). Chromatography Method. In T. Ogawa (Ed.), *Protein Engineering - Technology and Application* (pp. Ch. 02). Rijeka: InTech.
- Liu, L., Liu, Y., Du, L., Zhao, Y., & Du, H. (2016). (Liquid+liquid) phase equilibrium of aqueous two-phase system containing (surfactant+sodium sulfate+water) at different temperatures. *Fluid Phase Equilibria*, 415(Supplement C), 25-33.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.fluid.2016.01.039>
- Lobato-Calleros, C., Lozano-Castañeda, I., & Vernon-Carter, E. J. (2009). Texture and microstructure of low-fat and low-cholesterol panela type cheeses: different methodologies. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 1(1), 39-48.
doi:<http://dx.doi.org/10.5154/r.inagbi.2009.05.009>
- Lu, Y.-M., Yang, Y.-Z., Zhao, X.-D., & Xia, C.-B. (2010). Bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol (PEG)/potassium citrate aqueous two-

- phase systems. *Food and Bioproducts Processing*, 88(1), 40-46. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.12.002>
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Xavier Malcata, F. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40(10), 1197-1211. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.005>
- Marcos, J. C., Fonseca, L. P., Ramalho, M. T., & Cabral, J. M. S. (1998). Variation of penicillin acylase partition coefficient with phase volume ratio in poly(ethylene glycol)–sodium citrate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711(1), 295-299. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00633-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00633-6)
- Meller da Silva, L. H., & Meirelles, A. J. A. (2001). PEG + Potassium Phosphate + Urea Aqueous Two-Phase Systems: Phase Equilibrium and Protein Partitioning. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 46(2), 251-255. doi:10.1021/je000131f
- Merchuk, J. C., Andrews, B. A., & Asenjo, J. A. (1998). Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711(1–2), 285-293. doi:[http://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00594-X](http://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00594-X)
- Mokhtarani, B., Mortaheb, H. R., Mafi, M., & Amini, M. H. (2011). Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in aqueous two-phase systems of polyvinylpyrrolidone and potassium phosphate. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 879(11-12), 721-726. doi:10.1016/j.jchromb.2011.02.007
- Murari, G. F., Penido, J. A., Machado, P. A. L., Lemos, L. R. d., Lemes, N. H. T., Virtuoso, L. S., . . . Mageste, A. B. (2015). Phase diagrams of aqueous two-phase systems formed by polyethylene glycol+ammonium sulfate+water: equilibrium data and thermodynamic modeling. *Fluid Phase Equilibria*, 406(Supplement C), 61-69. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fluid.2015.07.024>
- Muruchi, L., Galleguillos, H. R., & Jimenez, Y. P. (2016). Aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) 4000 and ferrous sulfate at different

- temperatures. *Fluid Phase Equilibria*, 412(Supplement C), 29-38.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.fluid.2015.12.014>
- Nagaraja, V. H., & Iyyaswami, R. (2015). Aqueous two phase partitioning of fish proteins: partitioning studies and ATPS evaluation. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3539-3548. doi:10.1007/s13197-014-1425-4
- Nandini, K. E., & Rastogi, N. K. (2011). Integrated Downstream Processing of Lactoperoxidase from Milk Whey Involving Aqueous Two-Phase Extraction and Ultrasound-Assisted Ultrafiltration. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(1), 173-185. doi:10.1007/s12010-010-9026-9
- Pérez, O. E., Wargon, V., & M.R. Pilosof, A. (2006). Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *Food Hydrocolloids*, 20(7), 966-974.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.11.005>
- Perumalsamy, M., & Batcha, M. I. (2011). Synergistic extraction of bovine serum albumin using polyethylene glycol based aqueous biphasic system. *Process Biochemistry*, 46(2), 494-497.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.023>
- Pihlanto, A. (2011). Whey proteins and peptides. *Nutrafoods*, 10(2), 29-42.
doi:10.1007/bf03223386
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110(Supplement C), 48-68.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>
- Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., & Ramesh, V. (2011). Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules—a review. *Science and Technology*, 1(1), 7-16.
- Rito-Palomares, M. (2004). Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *Journal of Chromatography B*, 807(1), 3-11.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.01.008>
- Rito-Palomares, M., & Cueto, L. (2000). Effect of biological suspensions on the position of the binodal curve in aqueous two-phase systems. *Journal of*

- Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 743(1), 5-12.
doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00059-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00059-1)
- Rito-Palomares, M., & Hernandez, M. (1998). Influence of system and process parameters on partitioning of cheese whey proteins in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711(1), 81-90. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00011-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00011-5)
- Rodrigues, L. R., Venâncio, A., & Teixeira, J. A. (2001). Partitioning and separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in polyethylene glycol/ammonium sulphate aqueous two-phase systems. *Biotechnology Letters*, 23(22), 1893-1897. doi:10.1023/a:1012710031589
- Rodrigues, L. R., Venâncio, A., & Teixeira, J. A. (2003). Recovery of the proteose peptone component 3 from cheese whey in Reppal PES 100/polyethylene glycol aqueous two-phase systems. *Biotechnology Letters*, 25(8), 651-655.
- Rosa, P. A. J., Ferreira, I. F., Azevedo, A. M., & Aires-Barros, M. R. (2010). Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2296-2305. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.034>
- Shimizu, S., McLaren, W. M., & Matubayasi, N. (2006). The Hofmeister series and protein-salt interactions. *The Journal of Chemical Physics*, 124(23), 234905. doi:10.1063/1.2206174
- Snyder, S. M., Cole, K. D., & Szlag, D. C. (1992). Phase compositions, viscosities, and densities for aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25 .degree.C. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 37(2), 268-274. doi:10.1021/je00006a036
- Spyropoulos, F., Portschi, A., & Norton, I. T. (2010). Effect of sucrose on the phase and flow behaviour of polysaccharide/protein aqueous two-phase systems. *Food Hydrocolloids*, 24(2), 217-226. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.09.008>
- Tovar Jiménez, X., Arana Cuenca, A., Téllez Jurado, A., Abreu Corona, A., & Muro Urista, C. R. (2012). Traditional Methods for Whey Protein Isolation and

- Concentration: Effects on Nutritional Properties and Biological Activity. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56, 369-377.
- Voros, N., Proust, P., & Fredenslund, A. (1993). Liquid-liquid phase equilibria of aqueous two-phase systems containing salts and polyethylene glycol. *Fluid Phase Equilibria*, 90(2), 333-353. doi:[https://doi.org/10.1016/0378-3812\(93\)85071-S](https://doi.org/10.1016/0378-3812(93)85071-S)
- Wiendahl, M., Völker, C., Husemann, I., Krarup, J., Staby, A., Scholl, S., & Hubbuch, J. (2009). A novel method to evaluate protein solubility using a high throughput screening approach. *Chemical Engineering Science*, 64(17), 3778-3788. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ces.2009.05.029>
- Wingfield, P. T. (2001). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]*, APPENDIX 3, Appendix-3F. doi:10.1002/0471140864.psa03fs13
- Xie, W. J., & Gao, Y. Q. (2013). A Simple Theory for the Hofmeister Series. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 4(24), 4247-4252. doi:10.1021/jz402072g
- Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 33(6, Part 1), 756-774. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>
- Yang, Z., Liu, X.-J., Chen, C., & Halling, P. J. (2010). Hofmeister effects on activity and stability of alkaline phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(4), 821-828. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.005>
- Zhang, H., Jiang, B., Feng, Z.-B., Qu, Y.-X., & Li, X. (2016). Separation of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin in Whey Protein Isolate by Aqueous Two-phase System of Polymer/Phosphate. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 44(5), 754-759. doi:[https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(16\)60932-5](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(16)60932-5)

- Zhang, W., Hu, Y., Wang, Y., Han, J., Ni, L., & Wu, Y. (2013). Liquid–liquid equilibrium of aqueous two-phase systems containing poly(ethylene glycol) of different molecular weights and several ammonium salts at 298.15K. *Thermochimica Acta*, 560(Supplement C), 47-54. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tca.2013.02.015>
- Zhang, Y., & Cremer, P. S. (2006). Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(6), 658-663. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.09.020>
- Zuñiga, A. D. G., Coimbra, J. S. R., & Minim, L. A. (2001). Partitional coefficients of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin in aqueous two phase systems: influence of molecular mass. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, 3(3), 149-155. doi:10.1080/11358120109487722

CAPÍTULO 3

PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUERO DE QUESO MEDIANTE EXTRACCIÓN ACUOSA EN DOS FASES

Resumen

Las proteínas del suero de queso pueden separarse con extracción acuosa en dos fases (ATPE). Con apoyo de un diagrama binodal para la mezcla de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (AS) con polietilenglicol 4000 (Peg4), se estudió la partición de fases para maximizar la separación de proteínas de suero y reducir la presencia de lactosa. El rendimiento aumentó a medida que se redujo la concentración de Peg4 o aumentó la de AS. Cuando el componente polimérico estuvo ausente aún se obtuvo formación de un sistema bifásico, lo que se atribuyó a la estructura polimérica de las proteínas. El sistema ATPE puede usarse como método no energético de concentración de proteínas.

Palabras clave: ATPE; diagrama binodal; proteínas; rendimiento de extracción; suero de queso

Abstract

Whey proteins can be separated by aqueous two phase extraction (ATPE). With the aid of a binodal diagram for the mixture of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (AS) with polyethylene glycol 4000 (Peg4), the phase partitioning was studied to maximize the separation of whey proteins and reduce the presence of lactose. The separation yield increased as the concentration of Peg4 diminished or the concentration of AS increased. When the polymeric component was absent, a two-phase system was still formed, which was attributed to the polymeric structure of proteins. The ATPE system can be used as a non-energy method for protein concentration.

Key words: ATPE; binodal diagram; cheese whey; extraction yield; proteins

3.1. Introducción

El suero es un subproducto de la manufactura de queso (Perumalsamy & Murugesan, 2012). Dependiendo de la calidad de la leche, entre 8 y 9 kg de suero son producidos de cada 10 kg de leche (Nath et al., 2015). En virtud de que tiene demanda química de oxígeno alta, el suero es un material con alto potencial contaminante, por lo que su manejo representa una preocupación industrial desde el punto de vista ambiental (Masotti, Cattaneo, Stuknytė & De Noni, 2016; Nath et al., 2015). El suero contiene lactosa, proteínas y lípidos, lo que lo hace atractivo para la preparación de bebidas (Liutkevičius et al., 2016) o como suplemento alimenticio (Masotti et al., 2016). Las principales proteínas del suero son α -lactoalbúmina (α la), β -lactoglobulina (β lg) y albúmina de suero bovino (BSA) (Perumalsamy & Murugesan, 2012). La α la contiene aminoácidos azufrados como el triptófano y gran cantidad de cisteína que ayudan a reforzar el sistema inmune. La β lg es la proteína más abundante en el suero y es una excelente fuente de aminoácidos esenciales (Alcântara et al., 2011). En adición, las proteínas del suero poseen alto valor biológico debido a que son casi totalmente absorbidas por el sistema digestivo (Kreczmann et al., 2015). Sin embargo, el suero contiene también

ciertas cantidades de grasa (Fagan, Castillo, O'Callaghan, Payne, & O'Donnell, 2009), que dificultan la recuperación de proteínas (Torkamani et al., 2016), y alta concentración de lactosa (Kalaivani & Regupathi, 2015), que ha sido identificada como el principal problema para el uso de este subproducto (de Souza et al., 2010), debido a que muchas personal alrededor del mundo padecen de intolerancia a la lactosa (Jelen & Tossavainen, 2003).

El aprovechamiento del suero se ha basado comúnmente en el uso separaciones por membrana y secado por atomización (Anandharamakrishnan, Rielly & Stapley, 2007; Kreczmann et al., 2015), lo que presenta desventajas pues no se realiza ningún procedimiento de purificación y las proteínas pueden resultar afectadas por el tratamiento térmico. La aplicación de un sistema acuoso en dos fases (ATPE, por sus siglas en inglés) es una alternativa que evita procedimientos térmicos y es viable para separar proteínas (Asenjo & Andrews, 2012; Glyk, Scheper, & Beutel, 2015). En un sistema ATPE ocurre una separación líquido-líquido mediante mezclas de dos polímeros o un polímero y una sal, que en ciertas concentraciones producen una solución verdadera en una sola fase, pero en otras causan la formación de dos fases inmiscibles, entre las cuales se reparten las biomoléculas presentes en la mezcla (Raja, Murty, Thivaharan, Rajasekar & Ramesh, 2011). El método ATPE ha sido estudiado incluso para separar proteínas en forma selectiva (Gai, Qu, Zhang & Zhang, 2011; Nitsawang, Hatti-Kaul & Kanasawud, 2006). En el caso de suero, mediante mezclas basadas en polietilenglicol y fosfato de potasio o citrato de sodio, se ha demostrado que es factible el fraccionamiento de α la en la fase polimérica y β lg en la fase salina (Alcântara et al., 2011; Kalaivani y Regupathi, 2015; Giraldo, Reis & Minim, 2001). Por otro lado, Anandharamakrishnan, Raghavendra, Barhate, Hanumesh, and Raghavarao (2005) mostraron que la grasa puede ser separada también usando ATPE, lo que hace atractivo el método para ser usado con suero. Sin embargo, el caso de la eliminación de lactosa a través de ATPE no ha sido estudiado, pero con base en los trabajos de Chethana, Nayak, and Raghavarao (2007) con betalaínas, tal componente puede ser retenido también en la fase salina del sistema ATPE, aunque en un proceso de fraccionamiento de las proteínas del suero, quedaría en mezcla con la β lg, dificultando la recuperación

de esta proteína. En adición, el contenido de proteínas en el suero es menor a 10 mg mL⁻¹ (Kalaivani y Regupathi, 2015), lo que sugiere que, además de la purificación, se deben emprender acciones de concentración de estos compuestos. En virtud del alto contenido de agua, el suero puede ser usado como disolvente de los componentes formadores del sistema ATPE, de manera que al desarrollarse las dos fases puede obtenerse no sólo una purificación de las proteínas, sino también una concentración de las mismas, en función de la partición de volúmenes. El objetivo del presente trabajo fue aplicar el método de extracción acuosa en dos fases para concentrar y purificar proteínas de suero de queso, atendiendo la eliminación de lactosa.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Suero de queso

Se fabricó queso panela a partir de leche entera de ganado Holstein utilizando el método descrito por Lobato-Calleros, Castañeda-Lozano y Vernon-Carter (2009). Se separó el suero y se sometió a evaluación de contenido de lactosa, proteína y grasa.

3.2.2. Diagrama binodal de fases

Se prepararon soluciones al 40 % de polietilenglicol [HO-(CH₂CH₂O)_n-CH₂OH], poly(ethane-1,2-diol) 4000 (Peg4) (Sigma-Aldrich, Co., Germany) y sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄; AS] (J. Bayer, México), usando agua desionizada como disolvente. Se usó el método del punto de turbidez para construir un diagrama binodal de fases (Li, He, Liu, Li & Liu, 2005). En un tubo Pyrex® con tapa de rosca, de 70 mL, de 25 mm × 200 mm, se colocaron 5 g de la solución de Peg4 y se agregó gota a gota la solución de AS hasta observar apariencia turbia sostenida aun después de agitación. Se registró el peso mediante balanza analítica (Ohaus, USA) y se agregó gota a gota agua hasta observar transparencia estable. Se registró peso, se agregó nuevamente solución de AS hasta observar turbidez y así sucesivamente. Para cada mezcla se calculó la concentración de AS (x_{AS}^{bin} , %) y Peg4 (y_P^{bin} , %) con las Ecuaciones (3.1) y (3.2), donde P , AS y H identifican Peg4,

sulfato de amonio y agua, respectivamente; i es la i -ésima mezcla; n es el número de preparaciones hasta la obtención de la mezcla i ; y_P^0 y x_{AS}^0 son concentraciones de las soluciones originales de las soluciones; y_P^i y x_{AS}^i son concentraciones de la soluciones agregadas en cada mezcla i ; w_P^0 y w_{AS}^0 son pesos de las soluciones agregadas al inicio de cada rutina y w_P^i , w_{AS}^i y w_H^i son pesos de P , AS y H agregados en cada mezcla i . Los datos de Peg4 (y_P , %) y AS (x_{AS} , %) correspondientes a estado de turbidez se graficaron para obtener un diagrama binodal de fases experimental para la mezcla AS-Peg4. Todo este procedimiento se hizo por triplicado.

$$y_P^{bin} = \frac{y_P^0 w_P^0 + \sum_{i=1}^n y_P^i w_P^i}{w_P^0 + \sum_{i=1}^n w_P^i + \sum_{i=1}^n w_H^i} \times 100 \quad (3.1)$$

$$x_{AS}^{bin} = \frac{y_{AS}^0 w_{AS}^0 + \sum_{i=1}^n y_{AS}^i w_{AS}^i}{w_{AS}^0 + \sum_{i=1}^n w_{AS}^i + \sum_{i=1}^n w_H^i} \times 100 \quad (3.2)$$

Los datos experimentales (x_{AS}^{bin} , y_P^{bin}) se sometieron a regresión no lineal mediante el software Sigma Plot® (SPSS, 2002), para ajustarlos a un modelo con la forma de la Ecuación (3.3) (Merchuk, Andrews, & Asenjo, 1998b), donde k_1 , k_2 y k_3 son constantes de regresión.

$$y_P^{bin} = k_1 \exp(k_2 (x_{AS}^{bin})^{0.5} - k_3 (x_{AS}^{bin})^3) \quad (3.3)$$

3.2.3. Líneas de operación

Se identificaron los puntos sobre la curva binodal correspondientes a las mayores concentraciones de AS (x_{AS}^{max} , y_P^{bin}) y Peg4 (x_{AS}^{bin} , y_P^{max}) y con ellos se ajustó la Ecuación (3.4), que constituyó la línea de operación principal (TL_{main}), donde k_4 es su pendiente (Ecuación 3.5).

$$y_P = k_4 (x_{AS} - x_{AS}^{bin}) + y_P^{max} \quad (3.4)$$

$$k_4 = \frac{y_P^{bin} - y_P^{max}}{x_{AS}^{max} - x_{AS}^{bin}} \quad (3.5)$$

Para construir líneas secundarias de operación (TL_{sec}), paralelas a TL_{main} , se localizó el punto crítico (C), donde la línea de operación tiene longitud nula. Para encontrar C se derivó la Ecuación (3.3) y el resultado (Ecuación 3.6) se igualó con la Ecuación (3.5), de donde se obtuvo la abscisa x_C , cuya sustitución en la Ecuación (3.3) permitió obtener la ordenada y_C de C.

$$\frac{dy_P^{bin}}{dx_{AS}^{bin}} = \frac{d[k_1 \exp(k_2 (x_{AS}^{bin})^{0.5} - k_3 (x_{AS}^{bin})^3)]}{dx_{AS}^{bin}} = k_4 \quad (3.6)$$

A partir del punto C(x_C , y_C) se trazó una línea perpendicular a TL_{main} con pendiente $-1/k_4$ (Riddle, 1995). Se determinó la intersección entre ambas (denotada como D) y se localizaron cinco puntos equidistantes (E, F, G, H, I) sobre la misma perpendicular, a través de los cuales se trazaron las TL_{sec} . La Ecuación (3.7) representa la recta que pasa por el punto E(x_{AS}^E , y_P^E).

$$y_P = k_4 (x_{AS} - x_{AS}^E) + y_P^E \quad (3.7)$$

Se determinó la intersección de las TL_{sec} con la curva binodal (Ecuación 3.3) utilizando un procedimiento de igualación-sustitución y para cada línea se determinó la longitud (TL_L , %) por medio del teorema de Pitágoras (Riddle, 1995), en la forma descrita por la Ecuación (3.8), que muestra el caso de la línea que pasa por el punto E, donde x e y representan concentraciones de AS y Peg4, respectivamente y los subíndices indican que se hace referencia a las intersecciones en los lados superior (T) e inferior (B) de la línea de operación.

$$TL_L = \sqrt{(x_E^B - x_E^T)^2 + (y_E^B - y_E^T)^2} \quad (3.8)$$

La relación entre la curva binodal y las líneas de operación se representó a través de la ecuación de Othmer-Tobias (Murari et al., 2015), donde k_5 y k_6 son

constantes de regresión. Para ello, los puntos de intersección de las líneas de operación con la curva binodal se ajustaron a la Ecuación (3.9) mediante regresión lineal, donde S y T se describen en la Ecuación (3.10).

$$S = \ln(k_5) + k_6 T \quad (3.9)$$

$$S = \ln\left(\frac{100 - y_P^T}{y_P^T}\right); \quad T = \ln\left(\frac{100 - x_{AS}^B}{x_{AS}^B}\right) \quad (3.10)$$

3.2.4. Análisis de partición de volúmenes

La partición de volúmenes (R) entre las fases superior (V_T) e inferior (V_B) del sistema ATPE se definió en la forma de la Ecuación (3.11) y se evaluó en siete puntos, denotados como 1 a 7 en la Figura 5 y localizados sobre la TL_{main} con Peg4 a 30, 25, 15, 5, 0.5 y 0.1 %.

$$R = \frac{V_T}{V_B} \quad (3.11)$$

En adición, R se evaluó en el punto medio de TL_{main} y en el punto D. El valor de R se correlacionó con la concentración de Peg4 y AS y se determinó la concentración que permitió tener partición equitativa de volúmenes (PEV; $R=1$). Un procedimiento similar se realizó con las TL_{sec} . Las mezclas se prepararon a 25 °C con agua desionizada como disolvente.

3.2.5. Sistemas ATPE basados en AS-PEG4-suero

Se prepararon mezclas a 25 °C usando suero como disolvente en vez de agua. La composición correspondió a los mismos puntos 1 a 7 descritos antes. Las fases fueron separadas y evaluadas en términos de R y concentración de proteína y lactosa. Para cada componente se determinó un coeficiente de partición (K) mediante la Ecuación (3.12) y rendimientos de separación (Y_T , Y_B) con las Ecuaciones (3.13) y (3.14), respectivamente, donde c_T , c_B y c_0 son concentraciones de proteína o lactosa en las fases superior (T), inferior (B) y en el suero original (V_0), respectivamente.

$$K = \frac{C_T}{C_B} \quad (3.12)$$

$$Y_T (\%) = \left(\frac{C_T \times V_T}{C_0 \times V_0} \right) \times 100 \quad (3.13)$$

$$Y_B (\%) = \left(\frac{C_B \times V_B}{C_0 \times V_0} \right) \times 100 \quad (3.14)$$

3.2.6. Variables respuesta

La concentración de proteína se determinó con el método de absorción a 220 nm (Kamizake, Gonçalves, Zaia & Zaia, 2003), con un espectrofotómetro Hach DR 5000 UV-Vis (Hach, México). Las determinaciones se apoyaron con una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) en un rango de 10 a 80 mg mL⁻¹ y los resultados se expresaron como mg equivalentes de BSA por mL (mg mL⁻¹). La concentración de lactosa se midió con el método de fenol-sulfúrico (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith, 1956), con un espectrofotómetro con lector de microplacas (Biotek, Sinergy 2, BioTeck Instruments, USA) y el apoyo de una curva estándar de lactosa en el rango de 10 a 200 mg mL⁻¹. En adición, se midió contenido de grasa en el suero original con un equipo Milko Scan FT1 (Foss, Dinamarca).

3.2.7. Análisis de datos

Se analizó la relación de la partición de volúmenes (R), de la concentración de proteína y lactosa en las fases, del rendimiento de separación (Y) y del coeficiente (K) de partición, en función de la concentración de Peg4. Los datos se sometieron a rutinas de regresión y el coeficiente de determinación (r^2) se tomó como indicador de la significancia de cambio en el comportamiento.

3.3. Resultados y Discusión

3.3.1. Composición del suero de queso

El suero de queso tuvo 1.02 (± 0.01) % de grasa, 10.68 (± 0.077) mg mL⁻¹ de proteína total y 53.90 (± 0.29) mg mL⁻¹ de azúcares totales. Los contenidos de proteína y azúcares fueron del mismo orden de magnitud a lo reportado por Kalaivani y Regupathi (2015), quienes encontraron valores de 5.49 y 47.20 mg mL⁻¹, respectivamente.

3.3.2. Diagrama binodal de fases

La Figura 4a muestra el diagrama binodal de fases obtenido para el sistema formado por (NH₄)₂SO₄ (AS) y PEG 4000 (Peg4). Los datos experimentales se ajustaron bien a la ecuación de Merchuk et al. (1998) (Ecuación 3.3), con coeficiente de determinación (r^2) de 0.9982 (± 0.0004) y con valores en los parámetros k_1 , k_2 y k_3 de 84.2218 (± 4.1078) %, -0.4650 (± 0.0211) %^{-0.5} y 0.0007 ($\pm 5.76 \times 10^{-6}$) %⁻³, respectivamente, que corresponden a un comportamiento a 25 °C. Estos resultados fueron semejantes a los obtenidos por González-Amado, Rodil, Arce, Soto y Rodríguez (2016) a 20 °C, quienes para el mismo sistema AS-Peg4 encontraron los valores de 69.02, -0.34 y 0.00086 para las mismas constantes, respectivamente. En el presente trabajo sólo se evaluó la condición de 25 °C, que es la temperatura más utilizada en la construcción de sistemas ATPE (Huddleston, Willauer & Rogers, 2003; Murari et al., 2015; Voros et al., 1993) y es representativa de condiciones ambientales. Sin embargo, con base en los datos de González-Amado et al. (2016) a 5, 20 y 35 °C, a medida que la temperatura aumenta, la curva binodal se desplaza sólo ligeramente hacia la región de menor concentración de componentes (Figura 4b).

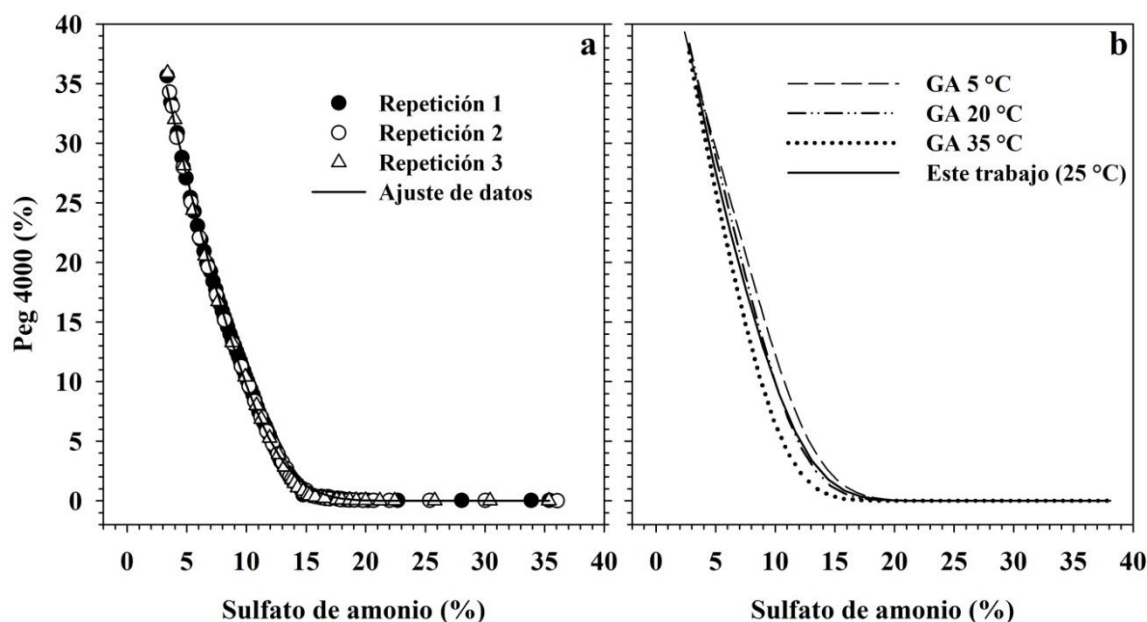


Figura 4 (a) Diagrama binodal de fases y ajuste de datos a la ecuación de Merchuk et al. (1998). Las repeticiones 1 a 3 corresponden a rutinas experimentales. (b) Comparación de la curva binodal obtenida en el presente trabajo con otros resultados para observar efecto de temperatura. GA son curvas construidas con datos de González-Amado et al. (2016).

El polietilenglicol (PEG) es el polímero más usado en sistemas ATPE y se ha reportado que con mayor peso molecular (M_{PEG}) la cantidad requerida para formar un sistema bifásico es menor (Raja et al., 2011). Si la Ecuación (3.3) del presente trabajo se somete a un análisis de cálculo de área bajo la curva (AUC), mediante el método de Simpson de 1/3 (Chapra & Canale, 2015), en el rango de concentración de AS de 3.46 a 34.78 % (ver sección de Líneas de Operación), se obtiene un valor de 180.75 %². El Cuadro 3 muestra parámetros de la ecuación de Merchuk et al. (1998) y AUC calculada para sistemas ATPE contruidos a 25 °C en otros trabajos con AS y PEG de distinto M_{PEG} . Se desprende que a medida que M_{PEG} ha sido mayor el valor de AUC ha sido menor, lo que indica que la curva binodal se desplaza hacia la izquierda y confirma que el desarrollo de un sistema bifásico requiere menor concentración de los componentes. Este fenómeno se ha atribuido a incompatibilidad entre los componentes del sistema, debido al incremento en la

hidrofobicidad del PEG de altos pesos moleculares (Murari et al., 2015; Voros et al., 1993). En adición, a partir de M_{PEG} de 10000 Da, el AUC ha dejado de variar significativamente, lo que sugiere que el peso molecular deja de ser influyente. Por otro lado, con el aumento de M_{PEG} se incrementa la viscosidad de la mezcla (Snyder, Cole & Szlag, 1992), lo que puede aumentar el tiempo de decantación (Asenjo & Andrews, 2012). Por ello, en el presente trabajo se eligió el uso de PEG con peso molecular intermedio (4000 Da).

3.3.3. Líneas de operación

Los puntos de mayor concentración de AS y Peg4 sobre la curva binodal tuvieron, en promedio, coordenadas A(3.46, 35.25 %) y B(34.78, 0.01 %) (Figura 5a). Por tanto, la línea de operación principal (TL_{main} , Ecuación 3.4) tuvo pendiente k_d igual a -1.1255 (Ecuación 3.5). La aplicación de la Ecuación (3.6) y la igualación con k_d permitió obtener el punto crítico con coordenadas C(13.88, 2.33 %), desde el cual se trazó una perpendicular con pendiente (+1/1.1255) y se localizó la intersección con TL_{main} en el punto D(23.28, 12.66 %). A lo largo de la línea C-D se localizaron los puntos equidistantes E(15.40, 4.11 %), F(16.92, 5.80 %), G(18.45, 7.49 %), H(20.06, 9.27 %) e I(21.67, 10.97 %) y a través de ellos se trazaron las TL_{sec} con intersecciones sobre la curva binodal en los puntos E_{top} (9.67, 10.53 %), E_{bot} (18.94, 0.09 %), F_{top} (7.96, 15.92 %), F_{bot} (22.11, 4.91×10^{-3} %), G_{top} (6.57, 20.96 %), G_{bot} (25.19, 1.12×10^{-4} %), H_{top} (5.35, 25.80 %), H_{bot} (28.27, 9.55×10^{-7} %), I_{top} (4.28, 30.48 %) e I_{bot} (31.36, 2.64×10^{-9} %). La longitud de las distintas líneas de operación (Ecuación 3.8) fue 13.48, 20.17, 27.26, 33.74, 40.02 y 46.94 %, para TL_E , TL_F , TL_G , TL_H , TL_I y TL_{main} , respectivamente.

Tabla 6 Parámetros de la ecuación de Merchuk et al. (1998) y áreas bajo la curva (AUC, %²) correspondientes a diagramas binodales de fase construidos a 25 °C con sulfato de amonio y PEG de diferente peso molecular.

Referencia	M _{PEG} (Da) ¹	k_1 ²	k_2	k_3	AUC ³ (% ²)
Murari et al. (2015)	400	40.86	-0.20	0.00001	515.6
Voros et al. (1993)	1000	106.21	-0.48	0.00020	292.1
Voros et al. (1993)	2000	111.25	-0.58	0.00050	177.4
Huddleston et al. (2003)	2000	88.36	-0.44	0.00040	220.9
Present work	4000	84.22	-0.47	0.00070	164.2
Murari et al. (2015)	10000	99.33	-0.59	0.00170	96.3
Murari et al. (2015)	35000	87.85	-0.51	0.00180	100.4

¹M_{PEG}: peso molecular de polietilenglicol. ²Constantes k_1 , k_2 , k_3 : parámetros de la ecuación de Merchuk (Ecuación 3.3). ³AUC: área bajo la curva obtenida con el método de Simpson de 1/3 (Chapra & Canale, 2015) en el rango de 3.46 a 34.71 % de sulfato de amonio.

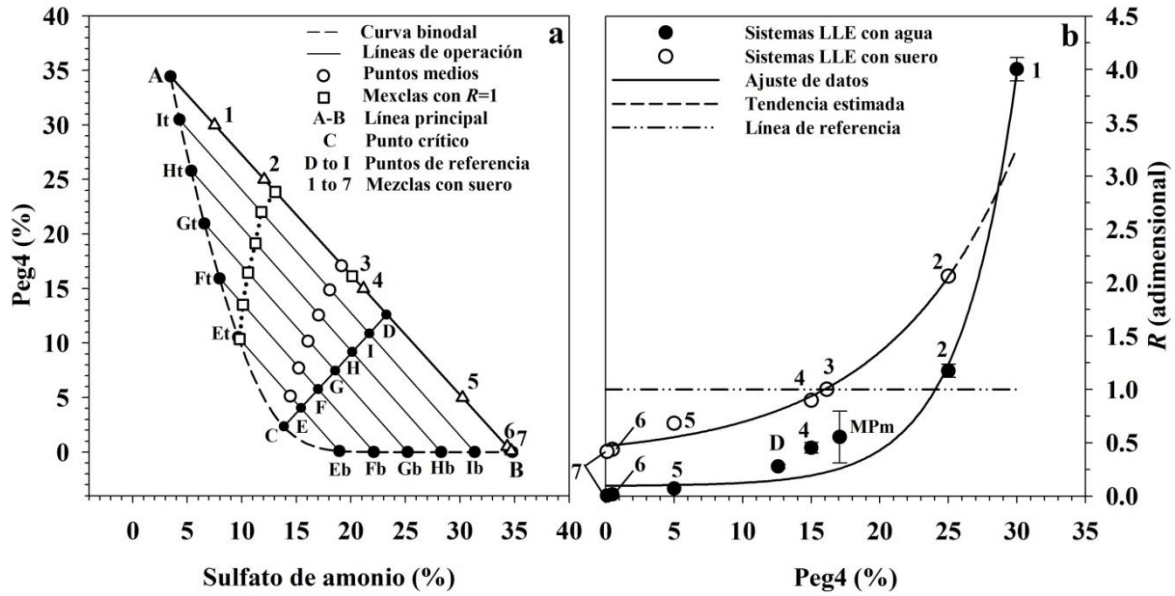


Figura 5 (a) Diagrama de fases del sistema $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -PEG4000 a 25 °C. Los subíndices t y b corresponden a las fases superior e inferior, respectivamente. (b) Relación entre la partición de volúmenes (R) y la concentración de Peg4 para sistemas ATPE preparados con agua y suero como disolvente. MPm corresponde al punto medio de TL_{main} .

Los datos de concentración del Peg4 en los puntos superiores de intersección y la concentración de AS en los puntos inferiores se ajustaron bien ($r^2 = 0.9899$) a la Ecuación (3.15), que corresponde a la Ecuación de Othmer-Tobias (Murari et al., 2015). Este modelo, junto con la Ecuación (3.3), que corresponde a la curva binodal de equilibrio, representan la región bifásica y el conjunto de líneas de operación del sistema AS-Peg4 que pueden desarrollarse.

$$\left(\frac{100 - y_P^T}{y_P^T} \right) = 0.5718 \left(\frac{100 - x_{AS}^B}{x_{AS}^B} \right)^{1.841} \quad (3.15)$$

3.3.4. Partición de volúmenes

A medida que el Peg4 (y_P) se redujo en las mezclas basadas en agua como disolvente, la partición de volúmenes (R ; Ecuación 3.11) disminuyó en forma

exponencial hacia un valor cercano a cero (Figura 5b), en forma congruente ($r^2 = 0.9927$) con la Ecuación (3.16), donde w representa a R y k_7 , k_8 y k_9 son constantes de regresión con valores de 0.0947 (adimensional), 0.0025 (adimensional) y $0.2453 \%^{-1}$, respectivamente.

$$w = k_7 + k_8 \exp(k_9 y_P) \quad (3.16)$$

Este comportamiento era esperado, en virtud de que en ausencia de alguno de los componentes del sistema ATPE (AS o Peg4) debe generarse una solución en una sola fase. Por otro lado, en operaciones de separación basadas en equilibrio líquido-vapor, a mayor diferencia entre composición de fases la separación de componentes se facilita (McCabe, Smith & Harriot, 2005). Por analogía, en un sistema ATPE, a mayor distancia entre la curva binodal y la condición de operación, se espera tener mayor estabilidad del sistema bifásico, lo que sugiere que la máxima estabilidad puede conseguirse con la mezcla del punto D, que es el más alejado de la curva binodal (Figura 5a). Sin embargo, R tuvo valor de 0.2780 en tal condición (Figura 5b), es decir, que la fase inferior fue significativamente mayor a la superior. En una operación continua, la separación de componentes basada en ATPE puede implementarse en forma similar a una decantación gravitatoria continua (McCabe et al., 2005) y la extracción de fases a través de rebosaderos en las zonas alta y baja del equipo puede favorecerse si la línea de interfase se localiza a la mitad del sistema. Sin embargo, la composición de mezclas sobre las diferentes líneas de operación con $R=1$ no correspondió a los puntos medios, sino a estados ubicados en el primer tercio superior de las mismas cuando el sistema usó agua como disolvente (Figura 5a). En adición, la relación entre la longitud de las líneas de operación (TL_L) y las concentraciones de AS y Peg4 para $R=1$ fue lineal (Figura 10; Ecuaciones 3.17 y 3.18) y cuanto mayor fue TLL las cantidades requeridas de Peg4 se incrementaron con mayor tasa que las de AS, lo que puede ser una desventaja por el mayor costo del polímero.

$$x_{AS}^{R=1} = 0.1099 TL_L + 7.6807; \quad r^2 = 0.9726 \quad (3.17)$$

$$y_P^{R=1} = 5.4680 TL_L + 0.3986; \quad r^2 = 0.9987 \quad (3.18)$$

Con base en lo anterior y con el fin de evaluar el efecto de la cantidad de polímero a usar para conseguir una purificación de proteínas del suero de queso, se hizo una estudio basado en mezclas localizadas sobre la línea principal de operación.

3.3.5. Separación de proteína de suero

Se prepararon mezclas para los puntos 1, 2 y 4 a 7 identificados en la Figura 9 pero como disolvente se usó suero en lugar de agua. La mezcla 1, que contuvo 30 % de Peg4, no formó un sistema bifásico, aunque estuvo localizada dentro de la región de dos fases en el diagrama binodal preparado con agua, lo que sugiere que la curva de equilibrio se desplazó hacia la derecha al usar suero como disolvente. Los sistemas 2 y 4 a 7 mostraron mayor R en comparación con los sistemas basados en agua a la misma concentración de Peg4 (y_P) (Figura 9b).

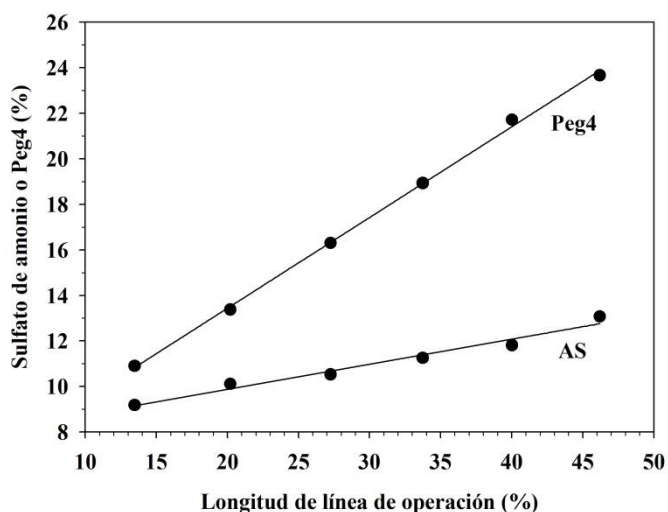


Figura 6 Relación entre la longitud de la línea de operación y la concentración de sulfato de amonio (AS) y PEG 4000 (Peg4) para obtener partición de volúmenes $R=1$.

En forma similar al caso de sistemas basados en agua, R disminuyó en forma exponencial y los datos se ajustaron bien ($r^2=0.9857$) a la Ecuación (3.16), pero

con valores en las constantes k_7 , k_8 y k_9 iguales a 0.3259 (adimensional), 0.1236 (adimensional) y $0.1053 \%^{-1}$, respectivamente. Con base en la Ecuación (3.16), la mezcla basada en suero que permitió $R=1$ tuvo concentración de 20.01 % de AS y 16.13 de Peg4 (punto 3; Figuras 9a y 9b). Esta condición contrastó con la identificada cuando se usó agua como disolvente (13.78, 23.63 %, respectivamente; Figura 5a) y se localizó aproximadamente al centro de la TL_{main} , lo que fortalece la postura de que la curva binodal se desplazó respecto a la original. Al respecto, Rito-Palomares y Hernandez (1998) estudiaron el efecto de añadir suero de leche a un sistema ATPE formado por fosfato/PEG1000 con agua. Estos autores eligieron seis puntos cercanos a la curva de equilibrio monofase-bifase y añadieron poco a poco suero de queso hasta obtener una mezcla en estado de monofase. Los resultados mostraron que la condición de transición entre fases se desplazó hacia la derecha a altas concentraciones de PEG y este fenómeno puede deberse a la presencia de proteínas, lactosa, lípidos y sales en el suero, que alteran el equilibrio iónico. También con base en la Ecuación (3.16), en tanto los sistemas basados en agua tuvieron $R=0$ cuando $y_P=0$, los sistemas basados en suero tuvieron $R=0.3259$ en la misma condición (Figura 5b). Aunque este resultado puede parecer no esperado, las proteínas son moléculas de alto peso molecular formadas por aminoácidos unidos covalentemente entre sí, formando largos polímeros no ramificados (Nelson & Cox, 2008). La α -lactoalbúmina posee 123 residuos de aminoácidos con peso molecular de 14,175 Da, mientras que la β -lactoglobulina tiene 162 residuos con peso molecular de 18,277 Da (Pihlanto, 2011). En tal sentido, al disminuir la presencia de Peg4, la función de la fase polimérica aportada por este componente se sustituyó por la característica polimérica de las proteínas del suero y ello explica que la estructura bifásica del sistema se mantuvo. Entre las características más interesantes de la aplicación de sistemas ATPE para purificar proteínas está la posibilidad de separar de manera selectiva una de ellas entre un grupo, a través de su reparto entre las dos fases (Gai et al., 2011) y de hecho Alcântara et al. (2011) y Kalaivani y Regupathi (2015) demostraron la factibilidad de separación de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina. Sin embargo, si el objetivo es maximizar la separación de todas las proteínas, los

resultados del presente trabajo sugieren el uso de una mezcla de suero y AS en cantidades requeridas para formar un sistema bifásico, lo que convierte al método en una estrategia no energética de concentración de proteínas.

Al respecto, a medida que la concentración de Peg4 disminuyó, la proteína se incrementó en la fase polimérica y disminuyó en la fase salina (Figura 7a). En el primer caso, el comportamiento fue congruente ($r^2=0.9821$) con un modelo logarítmico con la forma de la Ecuación (3.19), donde v representa concentración de proteína en la fase superior (%) y las constantes k_{10} , k_{11} y k_{12} tienen valores iguales a $32.2469 \text{ mg mL}^{-1}$, $-7.5125 \text{ mg mL}^{-1}$ y -2.1430% , respectivamente, en contraste con la fase inferior, que se ajustó bien ($r^2=0.9895$) a un modelo exponencial con la forma de la Ecuación (3.16), donde k_7 , k_8 y k_9 tienen valores iguales a $-0.3367 \text{ mg mL}^{-1}$, $1.0062 \text{ mg mL}^{-1}$ y $0.0778 \%^{-1}$, respectivamente.

$$v = k_{10} + k_{11} \ln(y_P - k_{12}) \quad (3.19)$$

Sin embargo, debe considerarse el hecho de que R disminuyó al reducirse la concentración de Peg4 (Figura 5b), pues a medida que el polímero disminuyó, el rendimiento de extracción de proteína en la fase superior (Y_T , Ecuación 3.13) se incrementó (Figura 7c) en forma congruente con la Ecuación (3.19) donde v representa Y_T , $k_{10}=206.5252$, $k_{11}=-37.0026$ y $k_{12}=-21.5045 \%$, de forma que en la condición de 25% de Peg4 el valor de Y_T fue de 54.45% , pero en ausencia total del polímero, el rendimiento se incrementó hasta 92.99% , lo que indicó eficiencia alta de separación de proteínas.

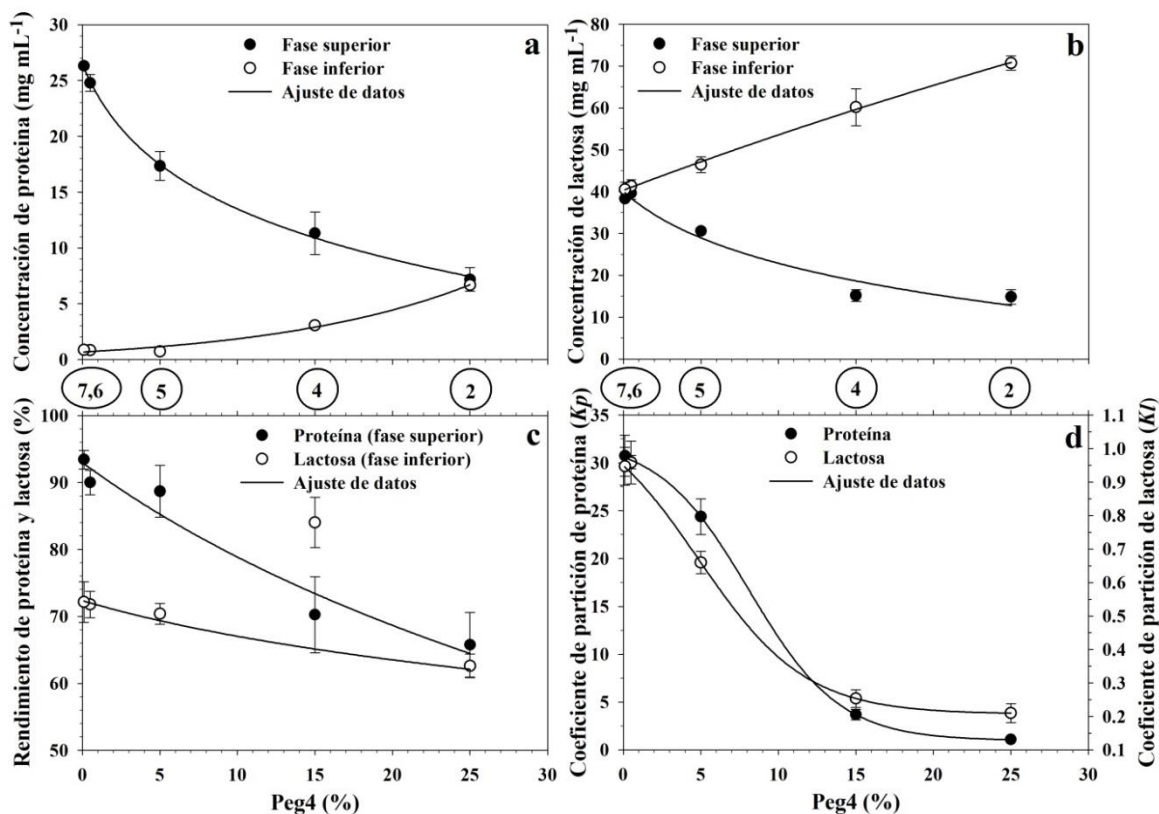


Figura 7 Efecto de la concentración de Peg4 sobre la variación de la concentración de proteína (a) y lactosa (b), sobre el rendimiento de separación (c) y sobre los coeficientes de partición (d) de estos productos en sistemas ATPE. Los números encerrados en círculos identifican los sistemas ATPE señalizados en la Figura 5.

El sulfato de amonio es un compuesto auxiliar en métodos de cuantificación de proteínas por su capacidad de causar la precipitación de éstas (Fujita et al., 1993; Jinn et al., 1989). Debido a ello, a medida que se incrementa el volumen de la fase salina, se causa la formación de una fase proteica que se constituye en la fase polimérica. En el sistema 2, que tuvo el valor mayor de R entre las mezclas evaluadas, la concentración de proteína fue similar entre las fases, en tanto que en el sistema 7, donde R tuvo el valor más pequeño, se tuvo la mayor diferencia de concentración de proteína entre las fases (Figura 7a). La concentración de proteína en el suero de queso original fue de 10.68 mg mL⁻¹, en tanto que en la fase superior

del sistema 7 fue de 26.18 mg mL^{-1} , lo que significa que la proteína se concentró 2.45 veces mediante un método no energético constituido por el sistema ATPE.

La Figura 7b muestra el contenido de lactosa para las fases salina y polimérica en los sistemas ATPE evaluados. En este caso, a medida que disminuyó la concentración de Peg4, la concentración de lactosa aumentó en la fase polimérica y disminuyó en la fase salina, lo que parece un efecto contrario al objetivo buscado de reducir la concentración de lactosa en el extracto de proteínas. El comportamiento fue de tipo logarítmico acorde con la Ecuación (3.19), donde v representa la concentración de lactosa y k_{10} , k_{11} y k_{12} tienen valores de $59.4740 \text{ mg mL}^{-1}$, $-13.8419 \text{ mg mL}^{-1}$ y -4.0770% en el caso de la fase superior ($r^2=0.9535$) y de $-455.5747 \text{ mg mL}^{-1}$, $112.9901 \text{ mg mL}^{-1}$, y -80.5589% , en la fase inferior (0.9698), respectivamente. Sin embargo, en virtud de que el volumen de la fase polimérica disminuyó y de la fase salina aumentó, el rendimiento de separación de lactosa en la fase salina experimentó un incremento a medida que se redujo la concentración de Peg4 (Figura 7c). El comportamiento también se representó ($r^2=0.9686$) por medio de la Ecuación (3.19), con $k_{10}=101.1726$, $k_{11}=-10.5688$ y $k_{12}=-15.2788 \%$, de donde se desprendió que el rendimiento de separación de lactosa en la fase inferior (Y_B , Ecuación 3.14) pasó de 62.11% con 25% de Peg4 a 72.29% con 0.1% del polímero. El suero inicial presentó concentración de lactosa de 53.90 mg mL^{-1} y, aunque en la condición de ausencia casi total de Peg4 (sistema 7, Figura 5) la fase superior del sistema ATPE registró 39.69% de lactosa (Figura 7b), el análisis de rendimiento de extracción mostró que del total, más del 70% del disacárido fue retenido por la fase inferior (Figura 7c), lo que sugiere que la mejor condición para separar proteínas de suero de queso es el desarrollo de un sistema sin polietilenglicol, formado sólo con la adición de sulfato de amonio, porque permite la concentración de proteína y la eliminación de lactosa en alto porcentaje.

El coeficiente de partición K (Ecuación 3.12) se presenta en la Figura 7d para proteína y lactosa para los sistemas 2 y 4 a 7 identificados en la Figura 5. La partición para ambas biomoléculas tuvo comportamiento similar, con tendencia sigmoide acorde la Ecuación (3.20), donde las constantes de regresión k_{13} , k_{14} , k_{15}

y k_{16} tuvieron valor de 0.9735, 31.5051, 8.1000 y -2.9243 para el caso de proteína ($r^2=0.9928$) y de 0.2070, 0.9240, 4.8594 y -3.4524 para el caso de lactosa ($r^2=0.9895$), respectivamente.

$$K = k_{13} + k_{14} / [1 + \exp(-(y_P - k_{15}) / k_{16})] \quad (3.20)$$

Un valor mayor a la unidad en K significa el número de veces que la concentración del compuesto es mayor en la fase polimérica que la salina, mientras que un número menor a la unidad significa que la parte salina tiene una mayor concentración que la polimérica. En el caso de proteína la partición varió de 1.07 a 30.56 en la transición de 25.0 a 0.1 % de Peg4, en tanto que para lactosa, la variación fue de 0.21 a 0.95, lo que indicó que la proteína se concentró principalmente en la fase polimérica y la lactosa en la fase salina.

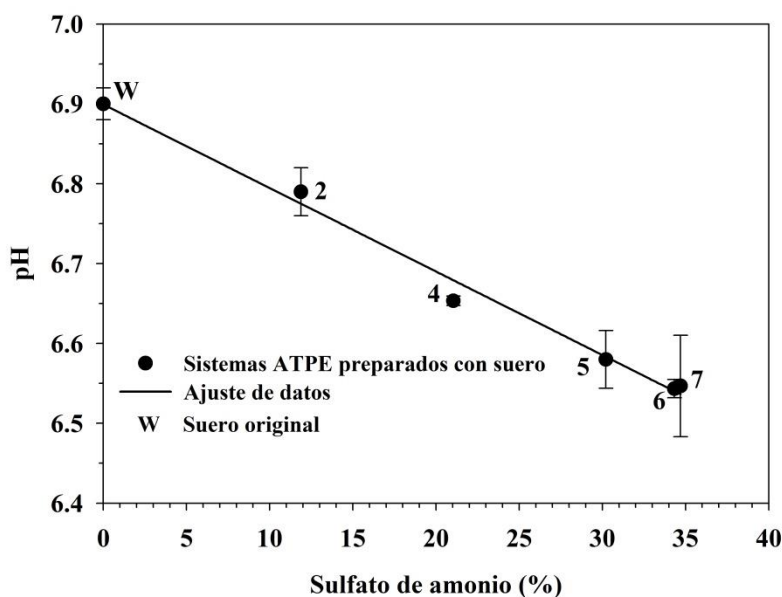


Figura 8 Valores de pH en sistemas ATPE desarrollados con suero de queso, sulfato de amonio y polietilenglicol.

3.3.6. Variación del pH

El pH del suero original fue de 6.90 (± 0.02). A medida que la concentración de AS aumentó y la de Peg4 disminuyó en los sistemas ATPE, el pH disminuyó en forma lineal ($r^2 = 0.9502$) a razón de $0.0105 \%^{-1}$ (Figura 8). Sin embargo, la diferencia total entre el suero original y el sistema con mayor concentración de AS fue de sólo 0.36 unidades, aun cuando este compuesto forma soluciones con pH ácido (Benavides & Rito-Palomares, 2008). La explicación puede estar relacionada con la capacidad buffer del suero. Al respecto, Hill, Irvine y Bullock (1985) reportaron que este material tiene capacidad amortiguadora con pH entre 5.6 y 7.0, debido a las sales fosfato que contiene. El suero de queso panela contiene β -LG, α -LA y BSA, en cantidades aproximadas de 60.0, 30.0 y 6.0 % (Boaglio, Bassani, Picó & Nerli, 2006), respecto al contenido total de proteína, con punto isoeléctrico de 5.2-5.4, 4.7-5.1, 4.9-5.1 (Capezio, Romanini, Picó & Nerli, 2005). El pH de todos los sistemas estuvo alejado en más de una unidad del punto isoeléctrico para las proteínas contenidas en el suero de queso, lo que puede ser benéfico, ya que la estructura de las proteínas no se modifica en gran medida.

3.4. Conclusiones

La extracción acuosa en dos fases tiene un potencial para separar proteínas a partir de suero de queso. El polietilenglicol puede usarse como fase polimérica, sin embargo, a medida que este componente se reduce el rendimiento de extracción de proteína y de eliminación de lactosa se incrementan. El uso de un sistema basado en suero de queso incorporado con sulfato de amonio puede usarse como una estrategia no energética de concentración y purificación de proteínas.

3.5 Referencias

- Alcântara, L. A. P., Minim, L. A., Minim, V. P. R., Bonomo, R. C. F., da Silva, L. H. M., & da Silva, M. D. C. H. (2011). Application of the response surface methodology for optimization of whey protein partitioning in PEG/phosphate aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography B*, 879(21), 1881-1885. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.05.007>.
- Anandharamakrishnan, C., Rielly, C. D., & Stapley, A. G. F. (2007). Effects of process variables on the denaturation of whey proteins during spray drying. *Drying Technology*, 25, 799-807.
- Asenjo, J. A., & Andrews, B. A. (2012). Aqueous two-phase systems for protein separation: phase separation and applications. *Journal of Chromatography A*, 1238, 1–10.
- Benavides, J., & Rito-Palomares, M. (2008). Generic application of polyethylene glycol – salt aqueous twophase systems for the development of processes to biological products primary recovery. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 7, 99-111.
- Boaglio, A., Bassani, G., Picó, G., & Nerli, B. (2006). Features of the milk whey protein partitioning in polyethyleneglycol-sodium citrate aqueous two-phase systems with the goal of isolating human alpha-1 antitrypsin expressed in bovine milk. *Journal of Chromatography B*, 837(1–2), 18-23. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.049>.
- Capezio, L., Romanini, D., Picó, G. A., & Nerli, B. (2005). Partition of whey milk proteins in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol–phosphate as a starting point to isolate proteins expressed in transgenic milk. *Journal of Chromatography B*, 819(1), 25-31. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.01.020>.

- Chapra, S. C., & Canale, R. P. (2015). Numerical Methods for Engineers, Seventh Edition. New York: McGraw-Hill Education. 970 p. ISBN: 978-0-07-339792-4.
- Chethana, S., Nayak, C. A., & Raghavarao, K. S. M. S. (2007). Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. *Journal of Food Engineering*, 81, 679-687.
- de Souza, R.R., Bergamasco, R., Costa, S.C., Feng, X., Faria, S.H.B., & Gimenes M.L. (2010). Recovery and purification of lactose from whey. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 49, 1137-1143. doi:10.1016/j.cep.2010.08.015.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. doi:10.1021/ac60111a017.
- Fagan, C.C., Castillo, M., O'Callaghan, D.J., Payne, F.A. & O'Donnell, C.P. (2009). Visible-near infrared spectroscopy sensor for predicting curd and whey composition during cheese processing. *Sensorry and Instrumentation for Food Quality*, 3, 62–69. doi:10.1007/s11694-009-9073-5
- Fujita, M., Nomura, K., Hong, K., Ito, Y., Asada, A., & Nishimuro, S. (1993). Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in japan. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 197, 1340-1347. Doi: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2624>.
- Gai, Q., Qu, F., Zhang, T., & Zhang, Y. (2011). Integration of carboxyl modified magnetic particles and aqueous two-phase extraction for selective separation of proteins. *Talanta*, 85, 304-309.
- Giraldo, Z. A. D., Reis, C. J. S., & Minim, L. A. (2001). Partitional coefficients of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in aqueous two phase systems: influence of molecular mass. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3, 149-155.

- Glyk, A., Scheper, T., & Beutel, S. (2015). PEG–salt aqueous two-phase systems: an attractive and versatile liquid–liquid extraction technology for the downstream processing of proteins and enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(16), 6599-6616. doi:10.1007/s00253-015-6779-7.
- González-Amado, M., Rodil, E., Arce, A., Soto, A., & Rodríguez, O. (2016). The effect of temperature on polyethylene glycol (4000 or 8000)–(sodium or ammonium) sulfate aqueous two phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, 428, 95-101. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fluid.2016.06.019>.
- Hill, A. R., Irvine, D. M., & Bullock, D. H. (1985). Buffer capacity of cheese wheys. *Journal of Food Science*, 50(3), 733-738. doi:10.1111/j.1365-2621.1985.tb13784.x.
- Huddleston, J. G., Willauer, H. D., & Rogers, R. D. (2003). Phase diagram data for several peg + salt aqueous biphasic systems at 25 °C. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 48(5), 1230-1236. doi:10.1021/je034042p.
- Jelen, P., & Tossavainen, O. (2003). Low lactose and lactose-free milk and dairy products – prospects, technologies and applications. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 161-165.
- Jinn, T. L., Yeh, Y. C., Chen, Y. M., & Lin, C. Y. (1989). Stabilization of soluble proteins in vitro by heat shock proteins-enriched ammonium sulfate fraction from soybean seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 30, 463-469.
- Kalaivani, S., & Regupathi, I. (2015). Synergistic extraction of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from acid whey using aqueous biphasic system: Process evaluation and optimization. *Separation and Purification Technology*, 146, 301-310. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2015.03.057>.
- Kamizake, N. K. K., Gonçalves, M. M., Zaia, C. T. B. V., & Zaia, D. A. M. (2003). Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. *Journal of Food*

- Composition and Analysis*, 16(4), 507-516. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0889-1575\(03\)00004-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0889-1575(03)00004-8).
- Kreczmann, B., Alonso, A., Liloia, M., Zamboni, E., Cerutti, R., Baroni, D., & Poluján, D. (2015). Procesamiento del lactosuero: elaboración de lactosa y aprovechamiento de proteínas. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 87, 44-49.
- Li, S., He, C., Liu, H., Li, K., & Liu, F. (2005). Ionic liquid-based aqueous two-phase system, a sample pretreatment procedure prior to high-performance liquid chromatography of opium alkaloids. *Journal of Chromatography B*, 826, 58-62.
- Liutkevičius, A., Speičienė, V., Kaminskas, A., Jablonskienė, V., Alenčikienė, G., Miežilienė, A., Bagdonaitė, L., Vitkus, D., & Garmienė, G. (2016). Development of a functional whey beverage, containing calcium, vitamin D, and prebiotic dietary fiber, and its influence on human health. *CyTA – Journal of Food*, 14, 309-316.
- Lobato-Calleros, C., Lozano-Castañeda, I., Vernon-Carter, E. J. (2009). Texture and microstructure of low-fat and low-cholesterol panela type cheeses: different methodologies. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 1, 39-48.
- Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknytė, M., & De Noni, I. (2016). An analytical approach to reveal the addition of heat-denatured whey proteins in lab-scale cheese making. *Food Control*, 63, 28-33. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.016>.
- McCabe, W. L., Smith, J. C. & Harriot, P. (2005). Unit Operations of Chemical Engineering, Seventh Edition. Singapur: McGraw-Hill Co. Inc. 1140 p.
- Merchuk, J. C., Andrews, B. A., & Asenjo, J. A. (1998). Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711(1–2), 285-293. doi: [http://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00594-X](http://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00594-X).

- Murari, G. F., Alves, P. J., Lopes, M. P. A., Rodrigues, L. L., Teixeira, L. N. H., Sindra, V. L., Dias, R. G., & Barbosa, M. A. (2015). Phase diagrams of aqueous two-phase systems formed by polyethylene glycol + ammonium sulfate + water: equilibrium data and thermodynamic modeling. *Fluid Phase Equilibria*, 406, 61–69. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fluid.2015.07.024>.
- Nath, A., Verasztó, B., Basak, S., Koris, A., Kovács, Z., & Vatai, G. (2015). Synthesis of lactose-derived nutraceuticals from dairy waste whey - a review. *Food and Bioprocess Technology*, 9(1), 16-48. doi:10.1007/s11947-015-1572-2.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fifth Edition. New York: W.H. Freeman and Company. 1158 p. ISBN: 13-978-0-7167-7108-1.
- Nitsawang S., Hatti-Kaul R., & Kanasawud P. (2006). Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1103-1107.
- Perumalsamy, M., & Murugesan, T. (2012). Extraction of cheese whey proteins (α -lactalbumin and β -lactoglobulin) from dairy effluents using environmentally benign aqueous biphasic system. *International Journal of Chemical and Environmental Engineering*, 3(1), 50-54.
- Pihlanto, A. (2011). Whey proteins and peptides. *Nutrafoods*, 10(2), 29-42. doi:10.1007/bf03223386.
- Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., & Ramesh, V. (2011). Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules – a review. *Science and Technology*, 1(1), 7-16.
- Riddle, D. F. (1995). *Analytic Geometry*, Sixth Edition. Boston: Cengage Learning, Inc. 496 p. ISBN: 0534948545.
- Rito-Palomares, M., & Hernandez, M. (1998). Influence of system and process parameters on partitioning of cheese whey proteins in aqueous two-phase

systems. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711(1–2), 81-90. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00011-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00011-5)

Snyder, S. M., Cole, K. D., & Szlag, D. C. (1992). Phase compositions, viscosities, and densities for aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25 °C. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 37 (2), 268-274. DOI: 10.1021/je00006a036.

SPSS Inc. (2002). Sigma Plot 8.0 User's Guide. Chicago: SPSS Inc.

Torkamani, A.E., Juliano, P., Fagan, P., Jiménez-Flores, R., Ajlouni, S., & Singh, T.K. (2016). Effect of ultrasound-enhanced fat separation on whey powder phospholipid composition and stability. *Journal of Dairy Science*, 99, 4169-4177. doi:10.3168/jds.2015-10422.

Voros, N., Proust, P., & Fredenslund, A. (1993). Liquid-liquid phase equilibria of aqueous two-phase systems containing salts and polyethylene glycol. *Fluid Phase Equilibria*, 90(2), 333-353. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-3812\(93\)85071-S](http://dx.doi.org/10.1016/0378-3812(93)85071-S)

CAPÍTULO 4

PARTICIÓN DE PROTEÍNA DE SUERO DE QUESO EN UN SISTEMA DE EXTRACCIÓN ACUOSA EN DOS FASES

Resumen

Extracción acuosa en dos fases (ATPE, por sus siglas en inglés) es un procedimiento que usa frecuentemente polietilenglicol (PEG) para la separación de proteínas. El uso de PEG presenta ciertas desventajas ya que es un material costoso y requiere pasos adicionales para purificar la proteína de éste. En el caso particular de las proteínas del suero de queso, estudios previos han demostrado la posibilidad de eliminar su uso y sustituirlo por la misma proteína del suero de queso para la formación de un sistema ATPE proteína/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En el presente trabajo se construyó un diagrama de equilibrio mediante la técnica de inspección de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés). Se evaluaron siete sistemas sobre la línea de operación principal, los cuales fueron los puntos máximos de concentración de suero de queso. En la fase superior se logró la partición de las proteínas del suero de queso, alcanzando un rendimiento de alrededor de 80 %, y éste aumentó en proporción al contenido de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en los sistemas. Sin embargo, la lactosa no experimentó partición debido a la ausencia de PEG, el cual provoca exclusión de la misma en la fase superior del sistema. El estudio de partición de la proteína en un sistema proteína/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ demostró que este es un sistema potencial para la separación y purificación de las mismas.

Palabras clave: ATPE proteína/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, proteínas del suero de queso, inspección de alto rendimiento, separación de lactosa.

Abstract

Aqueous two phase extraction (ATPE) is a system that frequently uses polyethylene glycol (PEG) for the separation of proteins. The use of PEG has certain disadvantages since it is an expensive material and requires additional steps to purify the protein from it. In the particular case of cheese whey proteins, previous studies have shown the possibility of eliminating its use and replacing it with the cheese whey proteins for the preparation of an ATPE protein/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. In the present work, an equilibrium diagram was constructed using the high throughput screening technique. Seven systems were evaluated on the main tie line, which had the maximum concentration of cheese whey. In the top phase, the proteins of the cheese whey were preferably partitioned, reaching a yield of around 80%, and then increased in proportion to the content of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in the systems. However, lactose had no partitioning due to the absence of PEG, which causes its exclusion from the top phase of the system. The study of the partitioning of protein in a system protein/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ showed that this has potential for the separation and purification of some proteins.

Keywords: ATPE protein/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, whey proteins, high throughput screening, lactose partitioning, volume ratio.

4.1 Introducción

La extracción acuosa en dos fases (ATPE) se basa en el equilibrio de dos materiales hidrofílicos y, de acuerdo a éstos, el sistema se puede estabilizar en una o dos fases (Benavides, Rito-Palomares, & Asenjo, 2011). Por sus componentes, un sistema ATPE puede ser categorizado en cinco grupos principales: polímero-polímero, polímero-sal, alcohol-sal, sistemas micelares y sistemas basados en líquidos iónicos (Benavides et al., 2011). El sulfato de amonio (AS) es una sal comúnmente usada para la precipitación de proteínas debido a su alta solubilidad, bajo precio y alta pureza (Duong-Ly & Gabelli, 2014). Por su posición en la serie Hofmeister el AS tiene la capacidad de estabilizar las proteínas (Yang et al., 2010), lo que lo hace un candidato ideal para trabajar con las mismas en sistemas ATPE polímero-sal. El polímero más usado es polietilenglicol (PEG) en sistemas ATPE (Rito-Palomares, 2004) como puede observarse en el Cuadro 4 (Capítulo 1) el peso molecular del PEG va desde 600 hasta 20,000. Con el aumento del peso molecular del PEG, aumenta la viscosidad en la solución acuosa (Fee & Van Alstine, 2006). Los sistemas ATPE basados en PEG/sal o polímero/polímero han sido raramente usados a gran escala debido al alto costo de los polímeros y a la dificultad para aislar las biomoléculas extraídas de la fase polimérica (Goja, Yang, Cui, & Li, 2013) y estos aspectos constituyen desventajas para el uso de PEG.

En sistemas sal/polímero se ha optado por alternativas al PEG como carbohidratos. Al respecto, se ha reportado el uso de ATPE con mezclas de proteína y carbohidratos como hidroximetilcelulosa y proteínas de suero de queso, para el fraccionamiento de las mismas (Jara & Pilosof, 2011), con lo cual se ha logrado una recuperación de 73 y 60 % para α -lactalbúmina (α -LA) y β -lactoglobulina (β -LG) . Spyropoulos et al. (2010) estudiaron el efecto de la concentración de sacarosa sobre el comportamiento reológico de la fase de dos modelos ATPE polisacárido/proteína, en específico goma guar/caseinato de sodio y goma xantana/caseinato de sodio; sin embargo, no se reportan estudios de partición de proteína.

Por otro lado se han reportado curvas de solubilidad para sistemas proteínas/sales precipitantes como son lisozima, insulina humana, análogos de insulina: insulina

Aspart (Novolog®), insulina Determir (Levemir®) / búfer fosfato de potasio, carbonato de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio (Wiendahl et al., 2009), lisozima de huevo de gallina, lisozima humana, glucosa oxidasa, glucosa isomerasa/NaCl, AS, PEG₃₀₀, PEG₁₀₀₀ (Baumgartner et al., 2015), ovoalbúmina, ribonucleasa A, inhibidor de tripsina de soya, lisozima, β -LG A y B/NaCl, AS (Dumetz, Chockla, Kaler, & Lenhoff, 2008), lisozima, insulina porcina, insulina bovina/carbamato de amonio (Hirata, Pessôa Filho, & Miranda, 2017). La concentración de un precipitante puede afectar la solubilidad de una proteína, estabilizándola en agregados, geles, separación de fases líquido-líquido y cristalización (Dumetz et al., 2008). La separación líquido-líquido es considerada como un estado metaestable que ocurre en ausencia de nucleación de cristales (Dumetz et al., 2008). Lo anterior señala que es posible obtener un sistema ATPE con proteína/sal precipitante, sin el uso de PEG. Un sistema con tal característica ofrece la posibilidad de disminuir el costo por PEG y a la vez hacer el proceso más simple, evitando la purificación del mismo. Hasta hoy, la partición de la proteína contenida en el suero de queso de un sistema proteína/sulfato de amonio no se ha reportado. Dada la falta de exploración en este tema, el objetivo de este trabajo fue estudiar la partición de la proteína de suero de queso con base en un sistema de extracción acuosa proteína de suero/AS como un sistema potencial para la separación y concentración de las mismas.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Suero de leche

Se obtuvo suero mediante filtrado de la cuajada resultante del proceso de fabricación de queso panela a partir de leche entera de ganado Holstein, utilizando el método descrito por Lobato-Calleros, Lozano-Castañeda, and Vernon-Carter (2009). El suero se sometió a evaluación de contenido de lactosa, proteína, grasa y sólidos totales.

4.2.2 Diagrama binodal de fases

Se ajustó el pH del suero a un valor de 7.0 usando bicarbonato de sodio (NaHCO₃). Se construyó un diagrama binodal de fases utilizando únicamente suero como

fuelle de proteínea. En adici3n se us3 sulfato de amonio (AS) y agua destilada. Para el desarrollo de la curva binodal no resulta adecuado el m3todo del punto de turbidez, ya que el suero por s3 mismo es un material turbio y esta dificultad fue reportada antes por Rito-Palomares and Hernandez (1998). En su lugar, se utiliz3 la t3cnica de inspecci3n de alto rendimiento (HTS; *high throughout screening*) (Bensch, Selbach, & Hubbuch, 2007; Spyropoulos et al., 2010) con algunas modificaciones. Esta t3cnica es m3s adecuada para soluciones biol3gicas, ya que se basa en la presencia o ausencia de un sistema bif3sico y no en la turbidez. Las concentraciones utilizadas se representan en la Figura 9.

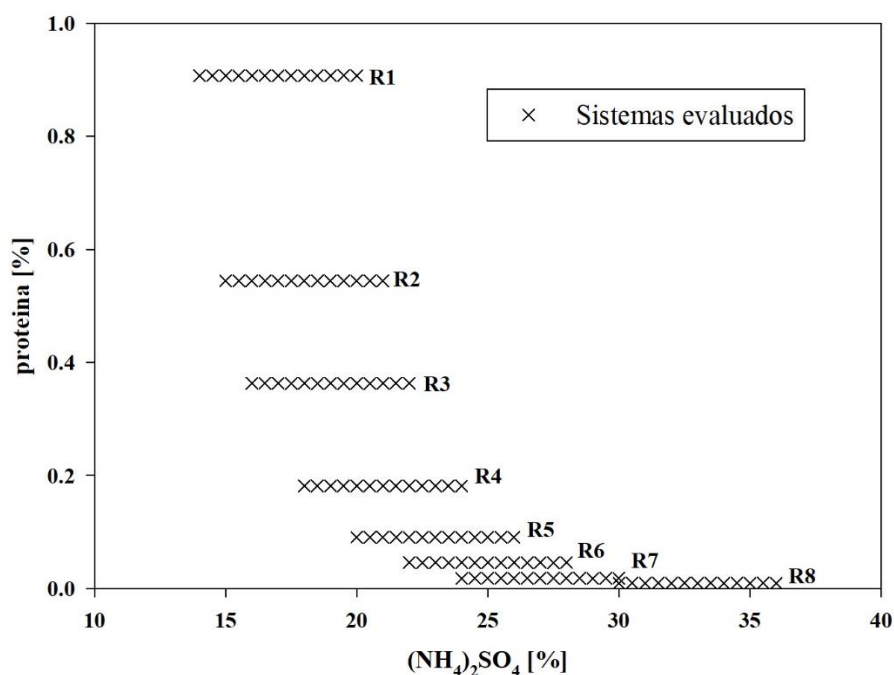


Figura 9 Sistemas evaluados para encontrar la línea binodal. Concentraciones AS/proteína (%/%)**: R1**= 14-20 /0.91; **R2**= 15-21 /0.55; **R3**= 16-22 /0.36; **R4**= 18-24 /0.18; **R5**= 20-26 /0.09; **R6**= 14-20 /0.045; **R7**= 20-30 /0.018; **R8**= 14-20 /9.68x10⁻³.

Se eligieron ocho intervalos de concentraci3n de sulfato de amonio, denominados **R1** a **R8** (Figura 9) con incrementos de 0.5 %. En cada intervalo la concentraci3n de proteínea se mantuvo constante y vari3 de 0.9075 % en **R1** a 9.68x10⁻³ % en **R8**. El límite superior e inferior de cada rango de (NH₄)₂SO₄ (AS) fue aumentando a

medida que el contenido de proteína fue disminuyendo (Figura 9). Se agregó la cantidad de AS, suero y agua destilada suficientes para alcanzar las concentraciones requeridas de cada componente en cada punto. Todos los sistemas se dejaron en equilibrio por 24 h. Posteriormente, se identificó la presencia o ausencia de un sistema bifásico en cada una. En cada rango se identificó la mezcla con menor concentración de AS que formó un sistema bifásico y se consideró para construir la curva binodal. Se eligió un sistema por cada rango para formar la línea binodal. La concentración de sulfato y proteína de los puntos elegidos para la binodal se ajustaron a la ecuación de Merchuk (Ecuación 4.1; Merchuk, Andrews, & Asenjo, 1998) por medio de regresión no lineal usando el software Matlab ((The Mathworks Inc., 1984-2001), donde x_{AS}^{bin} (%) y_P^{bin} (%) son concentraciones de equilibrio de sulfato de amonio y proteína sobre la curva binodal y k_1 , k_2 y k_3 son constantes de regresión.

$$y_P^{bin} = k_1 \exp(k_2 (x_{AS}^{bin})^{0.5} - k_3 (x_{AS}^{bin})^3) \quad (4.1)$$

4.2.3. Línea de operación

Se identificó la condición experimental de equilibrio monofase-bifase con menor concentración de $(NH_4)_2SO_4$, y en el rango de ésta y 40 % se prepararon siete mezclas que usaron suero como disolvente. En cada mezcla se determinó el porcentaje de proteína presente con base en el porcentaje de proteína total en el suero y la cantidad de suero añadido a cada sistema. Los datos de los sistemas experimentales se ajustaron a la Ecuación (4.2), la cual constituyó una línea de operación (TL), donde y_{pro}^{TL} es concentración de proteína, x_{AS}^{TL} es concentración de sulfato de amonio y k_4 y k_5 son constantes de regresión.

$$y_{pro}^{TL} = k_4 + k_5 x_{AS}^{TL} \quad (4.2)$$

Durante este desarrollo, el suero se usó como disolvente y no se diluyó con el fin de no trabajar con concentraciones menores de proteína.

4.2.4 Parámetros de partición

La partición de volúmenes (R) entre las fases superior (V_T) e inferior (V_B) del sistema ATPE se definió en la forma de la Ecuación (4.3) y se evaluó en los siete sistemas localizados sobre la TL_{main} .

$$R = \frac{V_T}{V_B} \quad (4.3)$$

Se prepararon mezclas a 25 °C usando suero como disolvente en vez de agua. La composición correspondió a los mismos puntos 1 a 7 descritos con anterioridad. Las fases fueron separadas y evaluadas en términos de R y concentración de proteína y lactosa. Para cada componente se determinó el coeficiente de partición (K) mediante la Ecuación (4.4) y rendimientos de separación (Y_T , Y_B) con las Ecuaciones (4.5) y (4.6), respectivamente, donde C_T , C_B y C_0 son concentraciones de proteína o lactosa en las fases superior (T), inferior (B) y en el suero original (V_0), respectivamente.

$$K = \frac{C_T}{C_B} \quad (4.4)$$

$$Y_T (\%) = \left(\frac{C_T \times V_T}{C_0 \times V_0} \right) \times 100 \quad (4.5)$$

$$Y_B (\%) = \left(\frac{C_B \times V_B}{C_0 \times V_0} \right) \times 100 \quad (4.6)$$

4.2.5 Variables respuesta

La concentración de proteína se determinó con el método de absorción a 220 nm (Kamizake, Gonçalves, Zaia, & Zaia, 2003), con un espectrofotómetro Hach DR 5000 UV-Vis (Hach, México). Las determinaciones se apoyaron con una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) en un rango de 10 a 80 mg mL⁻¹ y los resultados se expresaron como mg equivalentes de BSA por mL (mg mL⁻¹). La concentración de lactosa se midió con el método de fenol-sulfúrico (DuBois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956), con un espectrofotómetro con lector de microplacas (Biotek, Sinergy 2, BioTeck Instruments, USA) y el apoyo de una curva estándar de lactosa en el rango de 10 a 200 mg mL⁻¹. En adición, se midió contenido de grasa en el suero original con un equipo Milko Scan FT1 (Foss, Dinamarca).

4.2.6 Análisis de datos

Se analizó la relación de la partición de volúmenes (R), de la concentración de proteína y lactosa en las fases, del rendimiento de separación (Y) y del coeficiente de partición (K), en función de la concentración de sulfato de amonio. Se aplicó un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias con el estadístico de ($p < 0.05$) a cada parámetro usando el software SAS 9.0. Además los datos se sometieron a rutinas de regresión y el coeficiente de determinación (r^2) se tomó como indicador de la significancia de cambio en el comportamiento.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Composición del suero de queso

El contenido de grasa, proteína y azúcares para el suero de queso fue 0.715 % (± 0.038), 13.1 (± 0.58) mg mL⁻¹, 49.5 (± 7.56) mg mL⁻¹ respectivamente. El contenido de grasa es 30 % menor, el de proteína 22.6 % mayor y azúcares totales 4.9 % mayor que los resultados reportados en el Capítulo 2 de este trabajo. Esta variabilidad puede ser atribuida a factores que afectan el contenido de sólidos en leche como son frecuencia de alimentación del ganado, estado de lactación, temperatura ambiente, época del año, hora del día de la ordeña entre otras (Dergal, 2006).

4.3.2. Condiciones de equilibrio monofásico-bifásico

Las mezclas con menor concentración de sulfato de amonio que presentaron sistema bifásico están rotuladas como **B.1** a **B.9** en la Figura 13 y con ellas se construyó la curva binodal para el sistema sulfato de amonio/proteína. Las concentraciones fueron 18.25/0.9075, 19.50/0.5445, 21.00/0.3630, 22.50/0.1815, 23.50/0.0908, 24.50/0.0460, 26.00/0.0182, 34.00/9.68x10⁻³ y 40.0/8.80x10⁻³ %, respectivamente. Se añadió la cantidad de sulfato suficiente al punto **B.8** para alcanzar la concentración de 40 % y se calculó el % de proteína, lo que resultó el punto **B.9**. Este procedimiento se realizó así ya que para el punto **B.9** fue difícil manejar concentraciones de suero tan pequeñas. Además, la observación de la fase superior a esa concentración de proteína a simple vista también fue difícil. La curva binodal resultante se muestra en la Figura 10. Los datos se ajustaron a la

ecuación de Merchuk (Ecuación 4.1) mediante regresión no lineal, de donde se obtuvieron los valores de 18.98, -0.3095, 2.852×10^{-4} para las constantes k_1 , k_2 y k_3 , respectivamente ($r^2=0.9903$).

La mezcla **B.1** representa la condición con menor concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, entre aquéllas que se usaron para construir la curva binodal y contuvo 18.25 % de esta sal. Con esta base, se prepararon siete mezclas denotadas como 1 a 7 en la Figura 14, que tuvieron concentración de sulfato de amonio de 22, 26, 30, 34, 36, 38 y hasta 40 %, que representa una condición cercana al límite de solubilidad que es de 43.4 % a 25 °C (Wingfield, 2016). Las mezclas fueron preparadas con suero como disolvente y tuvieron concentración de proteína de 0.94 (1), 0.90 (2), 0.85 (3), 0.80 (4), 0.77 (5), 0.75 (6) y 0.73 % (7), donde los números entre paréntesis corresponden al número asignado a cada mezcla.

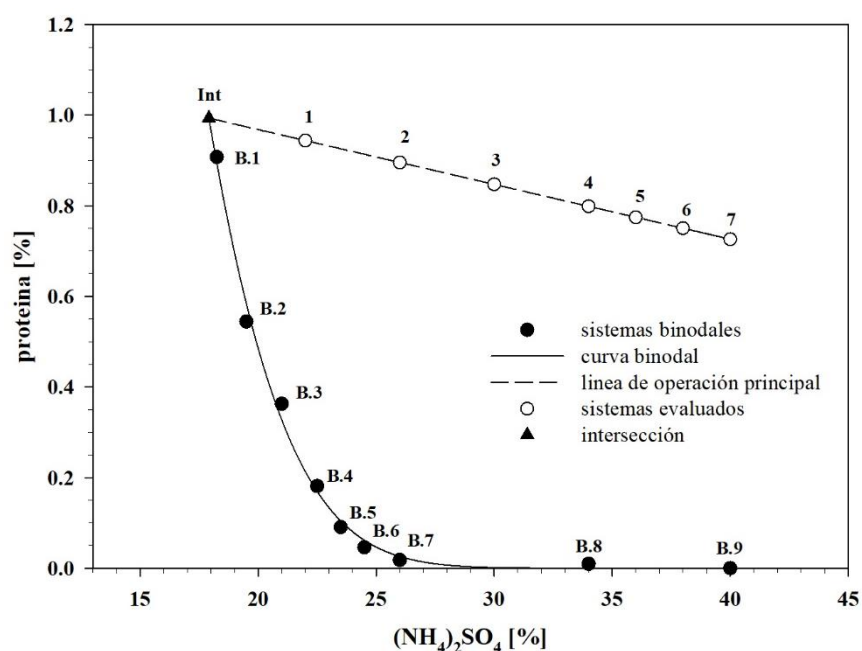


Figura 10 Diagrama binodal de fases y sistemas experimentales evaluados.

Los datos de concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y proteína se ajustaron a la Ecuación (4.2), la cual constituyó la línea de operación (TL), donde las constantes de regresión k_4 y k_5 tuvieron valores de 1.2083 % y $-0.0120 \text{ } \%^{-1}$, respectivamente ($r^2=0.9979$). Las Ecuaciones (4.1) y (4.2) se resolvieron simultáneamente y se

determinó la intersección entre ellas en la condición con 17.9162 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0.9932 % proteína (**Int**, Figura 10), donde la mezcla tuvo 82.08 % de concentración de suero. En tal sentido, el intervalo útil de porcentaje de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para formar un sistema bifásico es de 17.92 a 40.00 %. Por otro lado también se observó que la concentración de proteína máxima en este sistema es alrededor de 1 %.

En la Figura 11, se compara la línea binodal obtenida con PEG₄₀₀₀/AS reportada en el Capítulo 3 y la línea binodal proteína/AS. En una se utilizó agua como solvente (línea sólida), mientras que la otra usó suero de queso como sustrato (línea punteada). Se observa el punto **Int**, que es el punto máximo posible de proteína usando suero como fuente de la misma. La curva binodal obtenida con proteína tiene un rango de concentración de 17.92 a 40.0 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, mientras que la obtenida con PEG₄₀₀₀, tiene un rango más amplio de 3.46 a 34.71 %. El sustituir el PEG por proteínas puede ser una alternativa económica en sistemas ATPE ya que en el caso de las proteínas de suero de queso, se utiliza una concentración baja de éstas, frente a las grandes concentraciones que requiere el PEG. Se debe tomar en cuenta que en los sistemas evaluados que contenían PEG en la fase experimental del Capítulo 3, los resultados de la separación de las fases fueron influenciados por la combinación del PEG y las mismas proteínas del suero de queso. A medida que la concentración de PEG₄₀₀₀ va disminuyendo, el efecto (comienza en 17.92 % de acuerdo a **Int**) de la proteína va aumentando. En la Figura 11 pueden apreciarse los sistemas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /PEG₄₀₀₀ evaluados en el Capítulo 3. Se observa que los sistemas 4, 5, 6 y 7 están dentro de la zona bifásica (encima de la curva binodal) proteína/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lo que corrobora la aseveración del efecto PEG-proteína. Este estado de transición puede explicar el comportamiento sigmoide en los valores de R para los sistemas 5, 6 y 7 en la Figura 6 y Y_{pro}^{top} y K_{pro} de la Figura 7 (Capítulo 3).

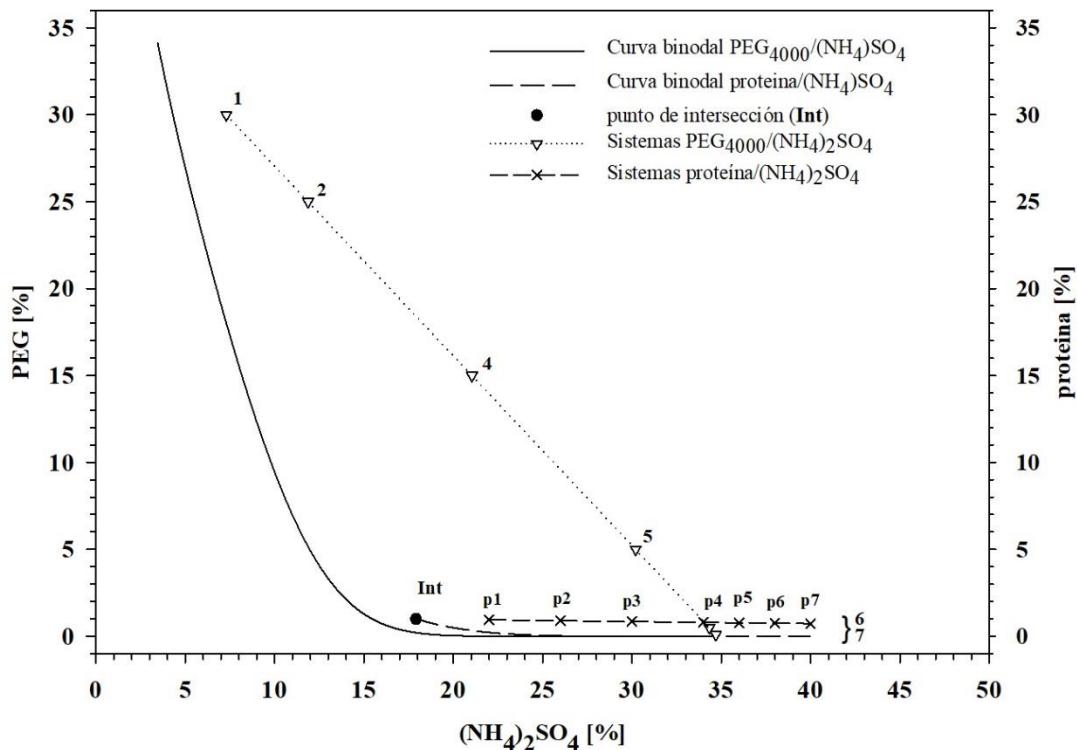


Figura 11. Comparación de curvas binodales para sistemas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{PEG}_{4000}$ (1, 2, 4, 5, 6 y 7), proteína/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (p1 a p7).

Además, en la Figura 11 puede observarse una separación de las curvas binodales, la curva binodal sin PEG_{4000} se forma a concentraciones más altas de los componentes, mientras que la que contiene PEG_{4000} se forma a concentraciones bajas. En otras palabras la curva binodal con PEG_{4000} se desplaza hacia la izquierda. Liu et al. (2016) reportaron que la curva binodal se desplaza hacia la izquierda y hacia el origen cuando se varía la concentración de dodecilsulfato sódico (SDS) con 0, 8 y 16 % en un sistema ATPE $\text{NaSO}_4/\text{Triton X-100}$. El mismo fenómeno es reportado sobre la curva binodal por Merchuk et al. (1998) y Diederich, Amrhein, Hämmerling, y Hubbuch (2013) al aumentar la concentración de sal en un sistema $\text{PEG}_{4000}/\text{mono-difosfato}$ y $\text{PEG}_{1450}/\text{fosfato}$ respectivamente. Al aumentar el contenido de sales, aumenta el contenido de sólidos en el sistema; por tanto, el agua disponible es menor, provocando este efecto de desplazamiento sobre la curva binodal. La presencia de PEG_{4000} , puede reducir la variación de energía libre

del proceso de mezcla (Murari et al., 2015), induciendo la separación de fases a bajas concentraciones de los componentes.

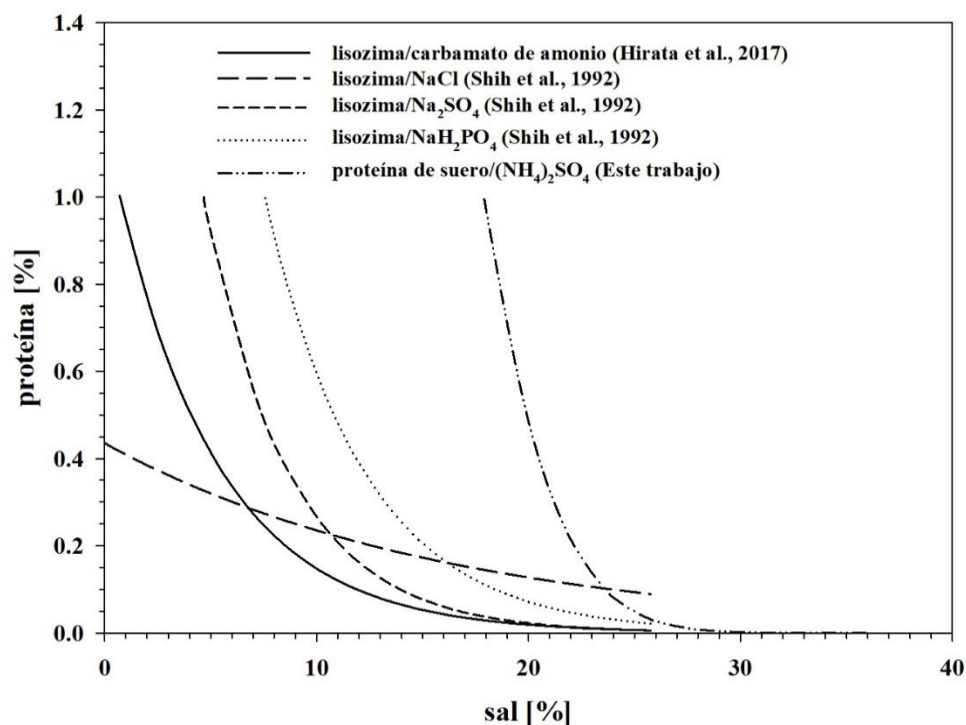


Figura 12 Comparación de curvas de solubilidad para lisozima/diferentes sales de Shih, Prausnitz, y Blanch (1992), Hirata et al. (2017) y la curva binodal de este trabajo.

Por otro lado, la Figura 12 muestra las curvas de solubilidad lisozima/carbamato de amonio (Hirata et al., 2017); lisozima/NaCl, lisozima/Na₂SO₄, lisozima/NaH₂PO₃ (Shih, Prausnitz, & Blanch, 1992) y la curva binodal obtenida en este trabajo ajustadas a 1 % de concentración de proteína. Se puede observar que las curvas de solubilidad para lisozima están situadas más cerca al origen que la que se reporta en este trabajo para proteína de suero de leche. En otras palabras, el suero de leche necesita más % de AS para entrar a la zona bifásica a diferencia de la lisozima. Esto puede deberse al efecto que tiene cada tipo de sal sobre la solubilidad de la proteína y a la naturaleza de la misma. Debe resaltarse que las curvas de solubilidad en la Figura 12 reportadas en la literatura usan agua como solvente, no un fluido biológico como es el suero de queso. Esto también puede influir en la curva de solubilidad al contener sales y grasa adicional a la proteína. La solubilidad de la proteína es una función compleja de interacciones polares con el

solvente acuoso, interacciones iónicas con la sal e interacciones electroestáticas repulsivas entre las moléculas cargadas (Hirata et al., 2017).

4.3.3. Relación de separación de volúmenes

La relación entre los volúmenes separados (R) se muestra en la Figura 13. A medida que la concentración de sulfato de amonio aumentó, el valor de R aumentó. En los sistemas 1, 2 y 3 el valor de R se mantuvo constante, con un valor aproximado de 0.06, sin diferencia significativa entre ellos y con volumen en la fase inferior que fue 16 veces mayor que en la fase superior. Por otro lado, a partir del sistema 3, el valor de R aumentó rápidamente hasta alcanzar un valor máximo de 0.35 en el sistema 7. En este punto el volumen de la fase inferior fue aproximadamente tres veces mayor que el de la superior. Se puede observar que los sistemas 6 y 7 no mostraron diferencia significativa entre sí, lo que sugirió que a partir del sistema 7, no ocurre un incremento significativo en la relación volúmenes separados.

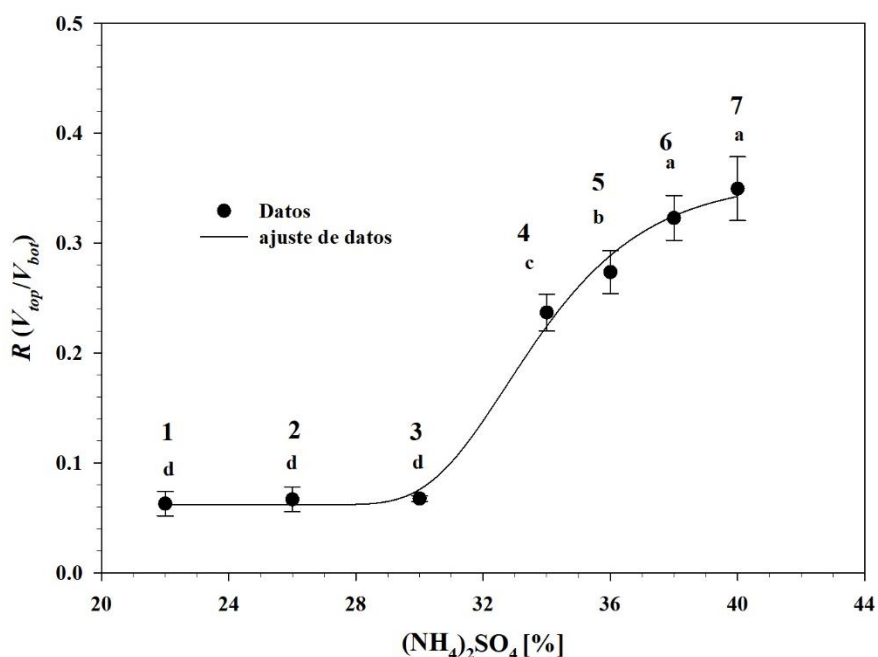


Figura 13 Volúmenes de separación de los sistemas experimentales proteína/sulfato de amonio.

Los valores de R de los 7 sistemas fueron ajustados ($r^2=0.9802$) a la Ecuación (4.7), donde k_6 , k_7 , k_8 y k_9 son constantes de regresión que tuvieron valores de 0.0619, 32.7401, 2.4499 y 0.2953, respectivamente y x es concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

$$R = k_6 + k_7 * \exp\left(-\exp\left(-\left(\frac{x - k_8}{k_9}\right)\right)\right) \quad (4.7)$$

El valor de k_6 representa y_0 , el cual indica que el valor mínimo de R a una concentración de AS de 0 % será de 0.0619. Este valor es similar al obtenido en los sistemas 1, 2 y 3 con R 0.067 ± 0.004 , 0.064 ± 0.010 y 0.067 ± 0.003 respectivamente.

4.3.4. Concentración de proteína y lactosa

La Figura 14 muestra las concentraciones de lactosa obtenida en las fases superior e inferior de cada sistema experimental evaluado. Se observó que en los sistemas 1 y 2 hubo diferencia significativa entre las fases, pero la concentración en las fases superior e inferior de los sistemas 3 al 7 fue estadísticamente igual. La variación entre los sistemas 1 y 2 puede deberse a que éstos son los que mayor contenido de suero contienen, respecto a los otros. La concentración tan similar entre las fases superior e inferior de todos los sistemas parece indicar que la lactosa no modificó su reparto entre las fases con el aumento en la concentración de sulfato de amonio. Un hecho que refuerza esta aseveración es que la relación volúmenes (R) de los sistemas 3 al 6, varió exponencialmente con la concentración de sal (Figura 13) y son los sistemas que no muestran diferencia significativa entre las fases superior e inferior.

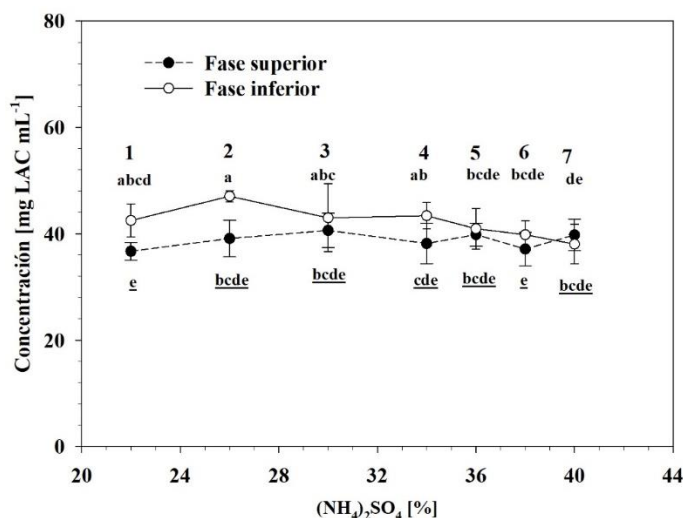


Figura 14 Concentración de lactosa en la fase superior e inferior de los sistemas evaluados.

Por otro lado, el coeficiente de partición para lactosa (K_{lac}) para los siete sistemas no presentó diferencia significativa y tuvo valores cercanos a la unidad, lo que indicó que la concentración fue similar entre las fases (Figura 19). Chethana, Nayak, and Raghavarao (2007) reportaron el comportamiento de un sistema PEG/(NH₄)₂SO₄ usado para la extracción de betalaínas y mostraron que el aumento de peso molecular del PEG (1500, 4000 y 6000) causó disminución en el coeficiente de partición de dextrosa (0.16, 0.10 y 0.06, respectivamente). Sin embargo, el valor de K se mantuvo constante para un sistema PEG₆₀₀₀/(NH₄)₂SO₄ sobre una línea de operación con longitud de 34 % en un rango de R de 0.17 a 1.30. Además, para este mismo rango, el rendimiento para azúcares Y , en la fase inferior mostró un valor constante de alrededor de 90 %.

Liu et al. (2013) reportaron un valor de K de 2.06 y 1.16 para un ATPE etanol/NaHSO₄ y etanol/ NaHSO₄, respectivamente, al estudiar la partición de flavonoles y azúcares de *Lonicera caprifolium*. Babu, Rastogi, and Raghavarao (2008) estudiaron el efecto del peso molecular del PEG (1500, 4000, 6000 y 20,000) sobre la partición de proteína y azúcares de un extracto enzimático de piña usando un ATPE basado en PEG/fosfato de potasio en una concentración 14 %/14 %. El

valor de K_{pro} (proteína) disminuyó de 3.2 a 1.6, mientras que el K_{sug} disminuyó de 0.53 a 0.49 con un rango de R de 0.96 a 0.60. Un rango de 0.62 a 0.66 y 0.63 a 0.66 de K_{sug} se reportó al variar el contenido de PEG de 12-18 % para sistemas PEG₁₅₀₀/fosfato y PEG₄₀₀₀/fosfato (a una concentración fija de fosfato, 14 %) con un rango de R de 0.71 a 0.44 y 0.61 a 0.43 respectivamente. Por lo anterior, parece ser que los azúcares, se separaron hacia la fase inferior por el “efecto de volumen de exclusión” provocada por el PEG en la fase superior (Babu et al., 2008). Como puede verse en la mayoría de las referencias descritas arriba, el valor de K_{sug} se mantuvo constante a pesar que el valor de R cambie. Lo que parece indicar que el valor de K_{sug} dependió de la presencia del PEG, y que no cambió con la concentración de éste.

Al comparar los valores de K_{lac} obtenidos en el Capítulo 3, presentados en la Figura 7. El valor de K_{lac} va desde 0.21 hasta 0.95 para concentraciones de PEG₄₀₀₀ de 25 hasta 0.1 %. A medida que la concentración de PEG₄₀₀₀ aumenta el valor K_{lac} , lo que indica que la lactosa migra de la fase inferior a la fase superior a medida que el PEG₄₀₀₀ disminuye. El valor de K_{lac} fue de 0.95 (cercano a 1.0) para PEG₄₀₀₀ a 0.1 %; que es un valor similar al encontrado en todos los sistemas evaluados usando proteína/(NH₄)₂SO₄. Lo que corrobora la exclusión de la lactosa por PEG. Por tanto, en este trabajo, al sustituir el PEG por la proteína del suero, el efecto de exclusión del polímero sobre la lactosa no estuvo presente.

La Figura 18 muestra las concentraciones de proteína de las fases superior e inferior de los sistemas evaluados. La concentración de proteína en la fase superior aumentó exponencialmente del sistema 1 hasta el sistema 3. Sin embargo, el valor de R se mantuvo constante (Figura 13). Posteriormente, a partir de este sistema, la concentración de la proteína desciende de forma exponencial con el aumento de la concentración de AS. Este fenómeno puede ser explicado por el aumento en el valor de R (la fase superior aumenta a partir del sistema 3, Figura 13). Por otro lado, la concentración de proteína en la fase inferior desciende muy poco del sistema 1 al 2, mientras que del sistema 2 al 4 tiene una pendiente negativa

constante. A partir del sistema 5 al 7 la concentración de proteína no varió de manera significativa.

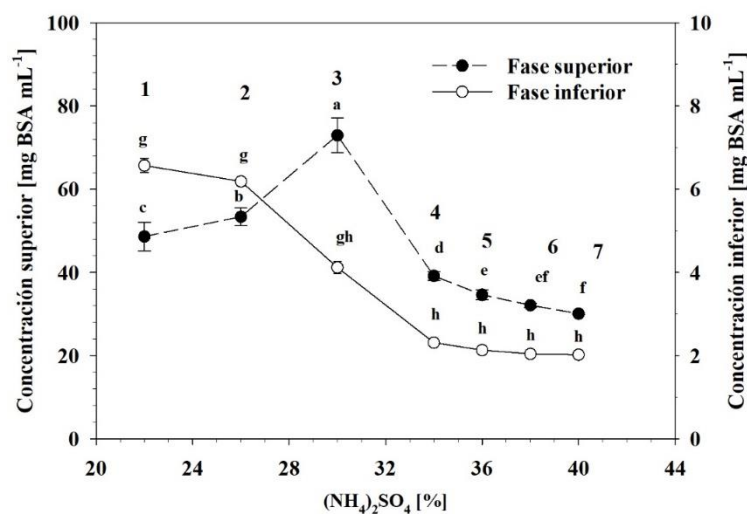


Figura 15 Concentración de proteína en la fase superior e inferior de los sistemas evaluados.

Este mismo comportamiento es observado en la Figura 16, el valor de K_{pro} aumenta exponencialmente de 7.42 a 17.74 del sistema 1 al 3, (manteniendo un valor de R constante), posteriormente el valor desciende hasta 14.86 en el sistema 7 con una pendiente constante y un aumento exponencial de R de 0.67 a 0.35.

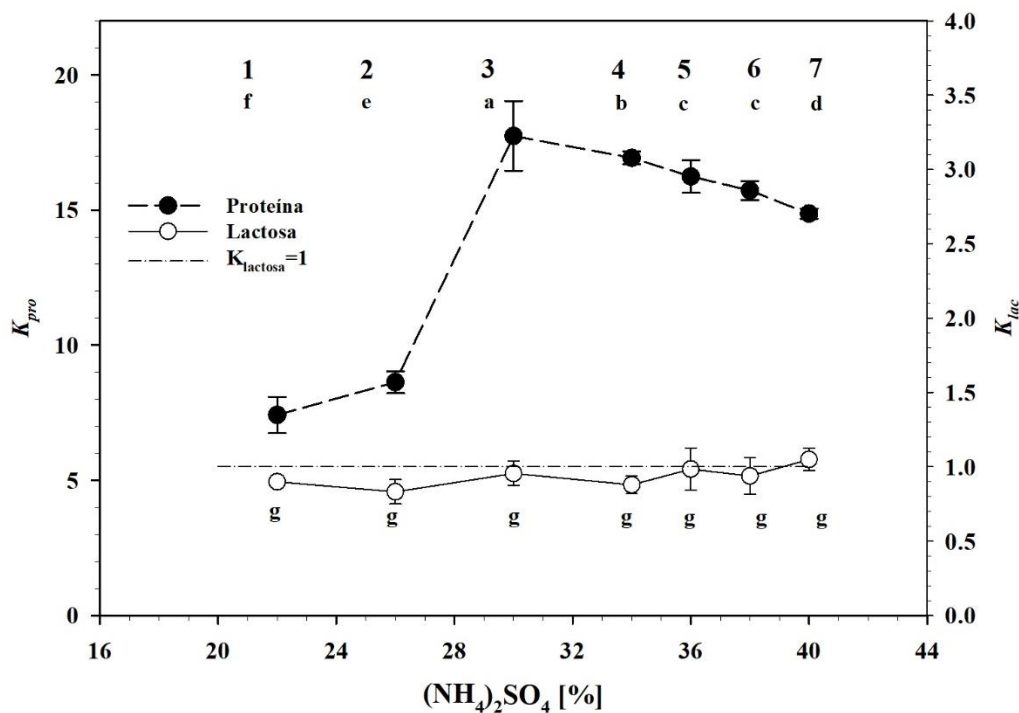


Figura 16 Coeficiente de partición para los sistemas evaluados.

El fenómeno de precipitación salina provocado por el aumento en la concentración de sulfato hace particionar a las proteínas hacia la fase superior (Babu et al., 2008). En soluciones acuosas, el enlace de hidrógeno es formado entre las moléculas de agua y la superficie de las proteínas. Por el enlace de hidrógeno las cadenas laterales de las moléculas de proteína adsorben moléculas de agua para formar una capa ordenada de agua alrededor de ellas. La capa de agua previene a las moléculas de proteína agregar o precipitar. Los aminoácidos hidrofóbicos, tales como isoleucina, valina, leucina y fenilalanina tienden a perder el agua ordenada cuando la fuerza iónica en la solución incrementa. La distribución de estos aminoácidos en la superficie determina la hidrofobicidad en la proteína. Así si el contenido de sal incrementa, la proteína se asocia una con otra y precipita, con el objetivo de disminuir su hidrofobicidad. Este proceso es llamado “precipitación salina fraccionada” (Li, Han, & Yu, 2013). Con incrementos moderados en el aumento de sal, la proteína podría no precipitar y separarse de otras proteínas con

menor hidrofobicidad. La β -LG se encuentra presente en el suero en una concentración aproximada de 60 % (Capezio et al., 2005). El sistema 3 muestra un Y_{pro}^{top} de 54.4 % muy cerca al contenido de β -LG. Por otro lado, esta proteína se polimeriza en un octámero en un rango de pH de 5.2 a 7.0 (rango en el que se desarrolló este trabajo) (Madureira et al., 2007) lo que podría explicar la alta concentración del sistema 3 en volumen constante.

La Figura 17a y 17b, muestra los rendimientos en la fase superior para lactosa y proteína para los sistemas evaluados. En la Figura 17b muestra que el Y_{lac}^{top} se mantiene constante en los tres primeros sistemas de 5.16-5.98 %, a partir del sistema 3 hasta el 7 hay un aumento casi constante en el rendimiento de lactosa. Este fenómeno se aprecia al aumentar la cantidad de sulfato. El comportamiento de R para lactosa (Figura 13) y Y_{lac}^{top} son muy similares (Figura 17b). Al graficar el porcentaje de volumen de la fase superior (V^{top} [%]), con el rendimiento de lactosa (Y_{lac}^{top} [%]) (Figura 17a) se observa una tendencia lineal. Se ajustó la Ecuación 4.8 a estos datos.

$$Y_{lac}^{top} = k_{10} + k_{11}V^{top} \quad (4.8)$$

Los valores de parámetros obtenidos fueron -0.95 y 1.01 para k_{10} y k_{11} respectivamente, con un ajuste de $r^2=0.992$. El valor de la pendiente indica que el rendimiento de lactosa es directamente proporcional al volumen. Como se discutió anteriormente si la lactosa no particiona entre las fases, el rendimiento es proporcional al volumen de las fases.

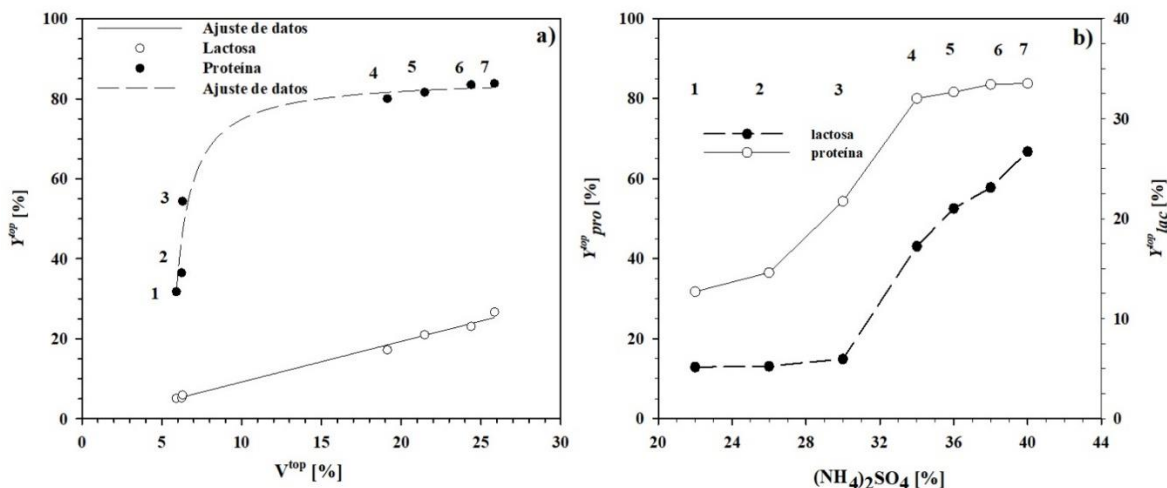


Figura 17 Rendimiento para la fase superior de los sistemas experimentales evaluados

Por otro lado, el rendimiento de proteína con respecto a la concentración de sulfato (Fig. 17b) también muestra una tendencia muy relacionada con el comportamiento de R (Figura 13). Sin embargo, al graficar el porcentaje de volumen de la fase superior contra el rendimiento, el comportamiento se ajustó a la Ecuación (4.9) que tiene forma hiperbólica.

$$Y_{pro}^{top} = k_{12} + \frac{k_{13}V^{top}}{k_{14} + V^{top}} \quad (4.9)$$

Los valores de parámetros obtenidos fueron 96.21, -10.84 y -4.93 para k_{12} , k_{13} y k_{14} respectivamente, con una $r^2=0.958$. Este tipo de ecuación representa las reacciones enzimáticas y se caracteriza por la saturación del sustrato. A muy bajas concentraciones, la velocidad incrementa en proporción directa a la concentración del sustrato (reacción de primer orden con respecto a la concentración de sustrato). A concentraciones más altas, la enzima se satura con el sustrato, y la velocidad no incrementa más (reacción de orden cero con respecto a la concentración de sustrato) (Rittmann & McCarty, 2001). A medida que la concentración de AS aumenta, provoca el efecto de precipitación salina sobre la proteína, obligándola a migrar hacia la parte superior. En esta fase, el volumen mostró ser dependiente de

la concentración de la proteína. Sin embargo, conforme la concentración de AS incrementó aun más, la fase superior parece ser que se saturó de proteína y el volumen de esta fase no aumentó más. Esta saturación en la parte superior puede ser lo que causó que el restante de la proteína (16 % del total, sistema 7) en la fase inferior no particionó hacia la fase superior.

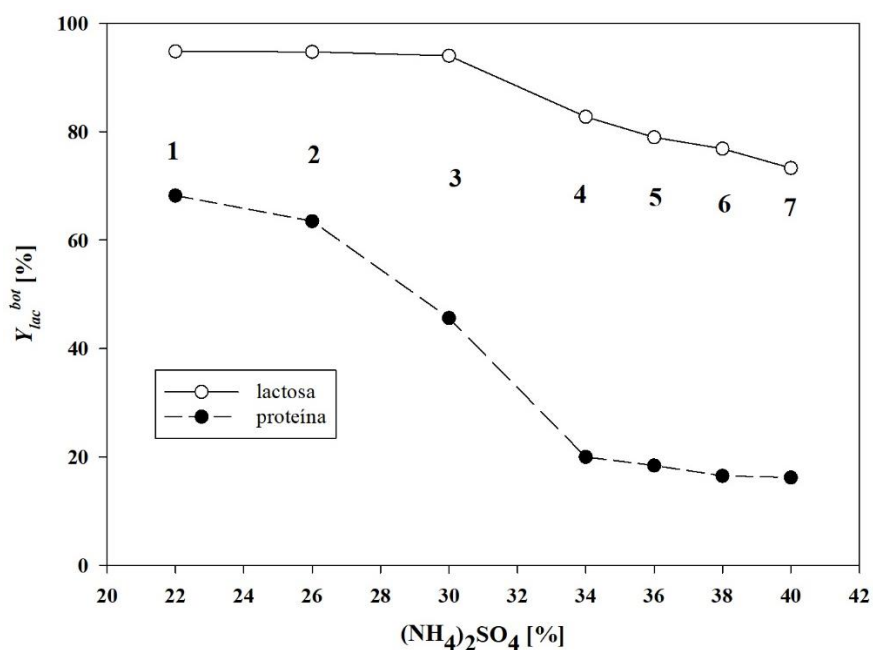


Figura 18 Rendimiento para la fase inferior de los sistemas experimentales evaluados

En la Figura 18 se observa que tanto el rendimiento de lactosa y proteína disminuyeron a medida que la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aumentó. Este comportamiento es contrario al rendimiento de ambos en la fase superior. El rendimiento de lactosa Y_{lac}^{bot} va desde 94.8 hasta 73.30 %, mientras que el de proteína Y_{pro}^{bot} de 68.23 hasta 16.18 %. En general, el rendimiento de lactosa fue mayor en la fase inferior, en comparación con el rendimiento de proteína. En los sistemas 4, 5 y 6 el rendimiento de lactosa fue aproximadamente tres veces menor que el de proteína. Como se estableció anteriormente la mayor parte de la proteína particionó hacia la fase superior.

Al analizar estos resultados, se encontraron dos sistemas potenciales para separar la proteína a la fase superior. El sistema 3, que tuvo 54.4 y 5.98 % para Y_{pro}^{top} y Y_{lac}^{top} con una concentración de AS de 30 % y un V^{top} de 6.3 %. Aquí la concentración de proteína fue 6.45 veces más que el suero. En tanto, el sistema 4 con 80.01 y 17.22 % para Y_{pro}^{top} y Y_{lac}^{top} y con una concentración de AS de 34 % y un V^{top} de 19.14 %, mostró una concentración de proteína de 3.46 veces más que el suero. El sistema 3, permitió una alta concentración de proteína, baja concentración de lactosa y un volumen reducido. Esto representa una ventaja ya que en procesos de purificación posteriores como diálisis, un menor volumen genera menor costo de purificación. Sin embargo en la fase inferior se concentró el 45.6 % de proteína con un V^{bot} del 94.02 % mucho mayor que se tendría que desechar o purificar. El sistema 4 ofreció un rendimiento de proteína 0.5 veces más al sistema 3, sin embargo, con tres veces el volumen y en consecuencia 3 veces más concentración de lactosa. Los sistemas 4, 5, 6 y 7 presentaron Y_{pro}^{top} superiores al 80 %. Además se logró concentrar la proteína aproximadamente tres veces con respecto al suero de leche. Esto significa que el sistema posee buenas características para concentrar las proteínas del suero de queso, siendo su característica más notable el usar sólo AS como componente del sistema ATPE.

4.4 Conclusiones

Se estudió la partición de proteína y lactosa en un sistema AS/proteína de suero de leche. El sistema mostró características potenciales para concentrar las proteínas en la fase superior. Se logró concentrar la proteína de 2.65 a 6.45 veces en comparación con el suero de queso y se obtuvieron rendimientos cercanos al 80 %. Sin embargo, la evidencia experimental señaló que la lactosa no particionó hacia ninguna fase. Por tanto, en este sistema, el rendimiento de lactosa dependió directamente del volumen de la fase en la que se evaluó.

4.5 Referencias

- Babu, B. R., Rastogi, N. K., & Raghavarao, K. S. M. S. (2008). Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 47(1), 83-89. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cep.2007.08.006>
- Baumgartner, K., Galm, L., Nötzold, J., Sigloch, H., Morgenstern, J., Schleining, K. Hubbuch, J. (2015). Determination of protein phase diagrams by microbatch experiments: Exploring the influence of precipitants and pH. *International Journal of Pharmaceutics*, 479(1), 28-40. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.027>
- Benavides, J., Rito-Palomares, M., & Asenjo, J. (2011). 2.49 Aqueous Two-Phase Systems. *bioprocess engineering*, 11, 16.
- Bensch, M., Selbach, B., & Hubbuch, J. (2007). High throughput screening techniques in downstream processing: Preparation, characterization and optimization of aqueous two-phase systems. *Chemical Engineering Science*, 62(7), 2011-2021. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ces.2006.12.053>
- Capezio, L., Romanini, D., Picó, G. A., & Nerli, B. (2005). Partition of whey milk proteins in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol–phosphate as a starting point to isolate proteins expressed in transgenic milk. *Journal of Chromatography B*, 819(1), 25-31. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ichromb.2005.01.020>
- Chethana, S., Nayak, C. A., & Raghavarao, K. S. M. S. (2007). Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. *Journal of Food Engineering*, 81(4), 679-687. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.12.021>
- Dergal, S. B. (2006). Química de los alimentos: Pearson Educación.
- Diederich, P., Amrhein, S., Hämmerling, F., & Hubbuch, J. (2013). Evaluation of PEG/phosphate aqueous two-phase systems for the purification of the chicken

- egg white protein avidin by using high-throughput techniques. *Chemical Engineering Science*, 104(Supplement C), 945-956. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.10.008>
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. doi:10.1021/ac60111a017
- Dumetz, A. C., Chockla, A. M., Kaler, E. W., & Lenhoff, A. M. (2008). Protein Phase Behavior in Aqueous Solutions: Crystallization, Liquid-Liquid Phase Separation, Gels, and Aggregates. *Biophysical Journal*, 94(2), 570-583. doi:<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.116152>
- Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. *Methods in Enzymology*, 541, 85-94. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0>
- Goja, A., Yang, H., Cui, M., & Li, C. (2013). Aqueous Two-Phase Extraction Advances for Bioseparation. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 4(1). doi:10.4172/2155-9821.1000140
- Fee, C. J., & Van Alstine, J. M. (2006). PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues. *Chemical Engineering Science*, 61(3), 924-939. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.04.040>
- Hirata, G. A. M., Pessôa Filho, P. d. A., & Miranda, E. A. (2017). Solid-liquid equilibrium for proteins in solutions with an unconventional salt (ammonium carbamate): Phase behavior analysis. *Fluid Phase Equilibria*, 443(Supplement C), 1-8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.03.031>
- Jara, F., & Pilosof, A. M. R. (2011). Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein concentrate/hydroxypropylmethylcellulose aqueous two-phase systems. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 374-380. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.07.003>

- Kamizake, N. K. K., Gonçalves, M. M., Zaia, C. T. B. V., & Zaia, D. A. M. (2003). Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(4), 507-516. doi:[https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(03\)00004-8](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(03)00004-8)
- Li, J., Han, W., & Yu, Y. (2013). Chromatography Method. In T. Ogawa (Ed.), *Protein Engineering - Technology and Application* (pp. Ch. 02). Rijeka: InTech.
- Liu, L., Liu, Y., Du, L., Zhao, Y., & Du, H. (2016). (Liquid+liquid) phase equilibrium of aqueous two-phase system containing (surfactant+sodium sulfate+water) at different temperatures. *Fluid Phase Equilibria*, 415(Supplement C), 25-33. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fluid.2016.01.039>
- Liu, Y., Han, J., Wang, Y., Lu, Y., Zhang, G., Sheng, C., & Yan, Y. (2013). Selective separation of flavones and sugars from honeysuckle by alcohol/salt aqueous two-phase system and optimization of extraction process. *Separation and Purification Technology*, 118(Supplement C), 776-783. doi:<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.08.018>
- Lobato-Calleros, C., Lozano-Castañeda, I., & Vernon-Carter, E. J. (2009). Texture and microstructure of low-fat and low-cholesterol panela type cheeses: different methodologies. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 1(1), 39-48. doi:<http://dx.doi.org/10.5154/r.inagbi.2009.05.009>
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Xavier Malcata, F. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40(10), 1197-1211. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.005>
- Merchuk, J. C., Andrews, B. A., & Asenjo, J. A. (1998). Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711(1), 285-293. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00594-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00594-X)

- Murari, G. F., Penido, J. A., Machado, P. A. L., Lemos, L. R. d., Lemes, N. H. T., Virtuoso, L. S., . . . Mageste, A. B. (2015). Phase diagrams of aqueous two-phase systems formed by polyethylene glycol+ammonium sulfate+water: equilibrium data and thermodynamic modeling. *Fluid Phase Equilibria*, 406(Supplement C), 61-69. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fluid.2015.07.024>
- Rito-Palomares, M. (2004). Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *Journal of Chromatography B*, 807(1), 3-11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.01.008>
- Rito-Palomares, M., & Hernandez, M. (1998). Influence of system and process parameters on partitioning of cheese whey proteins in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711(1), 81-90. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00011-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00011-5)
- Rittmann, B. E., & McCarty, P. L. (2001). *Environmental biotechnology: principles and applications*: McGraw-Hill.
- Shih, Y.-C., Prausnitz, J. M., & Blanch, H. W. (1992). Some characteristics of protein precipitation by salts. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(10), 1155-1164. doi:10.1002/bit.260401004
- Spyropoulos, F., Portschi, A., & Norton, I. T. (2010). Effect of sucrose on the phase and flow behaviour of polysaccharide/protein aqueous two-phase systems. *Food Hydrocolloids*, 24(2), 217-226. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.09.008>
- Wiendahl, M., Völker, C., Husemann, I., Krarup, J., Staby, A., Scholl, S., & Hubbuch, J. (2009). A novel method to evaluate protein solubility using a high throughput screening approach. *Chemical Engineering Science*, 64(17), 3778-3788. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ces.2009.05.029>

- Wingfield, P. T. (2016). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]*, APPENDIX 3, Appendix-3F. doi:10.1002/0471140864.psa03fs13
- Yang, Z., Liu, X.-J., Chen, C., & Halling, P. J. (2010). Hofmeister effects on activity and stability of alkaline phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(4), 821-828. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.005>

CONCLUSIONES GENERALES

En la primera fase de la investigación se demostró que la extracción acuosa en dos fases tiene un potencial para separar proteínas a partir de suero de queso. El polietilenglicol puede usarse como componente para la fase polimérica, sin embargo, a medida que este componente se reduce el rendimiento de extracción de proteína y lactosa incrementan. El uso de un sistema basado en suero de queso incorporado con sulfato de amonio puede usarse como una estrategia no energética de concentración y purificación de proteínas.

En la segunda fase de la investigación, fue posible particionar la proteína en la fase superior en un ATPE $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /proteína. El sistema muestra características potenciales para concentrar las proteínas en la fase superior. Se logró concentrar la proteína de 2.65 a 6.45 veces en comparación con el suero de queso y se obtuvieron rendimientos cercanos al 80 %. Sin embargo, la evidencia experimental apunta que la lactosa no particiona hacia ninguna fase, por tanto el rendimiento de lactosa depende directamente del volumen de la fase en la que se encuentre.

RECOMENDACIONES

Es recomendable realizar diagramas de equilibrio con el sustrato en cuestión con el objetivo de estudiar el comportamiento real de las biomoléculas de interés, ya que al realizar diagramas de equilibrio con agua, el particionamiento se comporta de manera distinta. Para soluciones biológicas, la técnica selección de alto rendimiento es más adecuada que el método punto de turbidez. Se recomienda estudiar sistemas a lo largo de la línea de operación principal en lugar de un sistema en varias líneas de operación.

El particionamiento de la lactosa es engañoso, se recomienda hacer un análisis de la relación volumen, rendimiento y coeficiente de partición para formular conclusiones.

Se recomienda para medir la proteína de la fase superior utilizar el método de absorción a @220 nm debido a que el rango de concentraciones utilizado es más bajo que el usado @280 nm, por lo que este método requiere menos muestra o una mayor dilución.

Debido a la alta viscosidad en la parte superior a altas concentraciones de PEG, es posible tener errores de medición en la proteína cuando se muestrea con micropipetas, por lo que es recomendable hacer dos diluciones para tomar una mayor cantidad de muestra y disminuir el error, que hacer una sola dilución con muy poca muestra y aumentar el error.

Es necesario estandarizar el suero para poder replicar los mismos resultados, debido a la naturaleza de la muestra el suero de queso es variable en contenido y acidez.

El efecto del pH sobre la partición de proteína es importante, sin embargo no se estudió en esta investigación por lo cual se recomienda estudiarlo en futuros trabajos de investigación.

Se recomienda no usar centrifugación para la separación de las fases, ya que ésta puede afectar el valor de R . Si se usa centrifugación es recomendable hacerlo a menos de 600 rpm.