



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

**ANÁLISIS TEÓRICO-EXPERIMENTAL DE UN SISTEMA DE
MICROFILTRACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE
PLÁSMIDOS DE USO MÉDICO EN UN BIORREACTOR DE
ALTA DENSIDAD**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

PRESENTA:

CINDY ALEJANDRA GUTIÉRREZ VALENZUELA

HERMOSILLO, SONORA

OCTUBRE 2013

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

UNIVERSIDAD DE SONORA

APROBACIÓN DEL JURADO

de la tesis presentada por:

Cindy Alejandra Gutiérrez Valenzuela

Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos la han encontrado satisfactoria.

Oct 16, 2013
Fecha

Armando Tejeda M.
Dr. Armando Tejeda Mansir
Presidente

Oct. 16, 2013
Fecha

Rosa M^a Montesinos C.
Dra. Rosa María Montesinos Cisneros
Secretario

Oct 16 2013
Fecha

Adriana Garibay Escobar
Dra. Adriana Garibay Escobar
Vocal

Oct 16 2013
Fecha

Roberto Guzmán
Dr. Roberto Guzmán Zamudio
Sinodal Externo

UNIVERSIDAD DE SONORA
AUTORIZACION DEL EXAMEN DE GRADO

Octubre 14, de 2013.

Por la presente se hace constar que el estudiante **CINDY ALEJANDRA GUTIERREZ VALENZUELA**, ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de Grado del programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química.



DR. FRANCISCO JAVIER ALMENDARIZ TAPIA
COORDINADOR
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA

RESUMEN

El desarrollo de vacunas de ADN y las terapias génicas constituyen una nueva generación de productos de la biotecnología. Uno de los procesos para la producción de estos productos es la fermentación de la célula conteniendo el ADN plasmídico de interés. Para aumentar la producción de estas células, se propone el uso de un sistema perfusivo formado por un módulo de microfiltración acoplado a un biorreactor donde se producen altas densidades celulares con un alto rendimiento específico de plásmido sin afectar la calidad del mismo. El funcionamiento adecuado del sistema depende en gran medida del funcionamiento de la unidad de microfiltración.

En esta investigación se analizó teórica y experimentalmente la unidad de microfiltración de un sistema perfusivo para la producción de células de *Escherichia coli* conteniendo el plásmido pVAX1-NH36, orientado a producir vacunas contra la leishmaniasis.

Los estudios realizados con soluciones modelo permitieron obtener expresiones tanto para la resistencia de la torta de biomasa como de la membrana del sistema de microfiltración. Los parámetros de la cinética de crecimiento se obtuvieron mediante experimentos a nivel biorreactor tanto en modo lote como perfusivo.

Mediante una combinación de estudios analíticos y cinéticos se determinaron los parámetros del modelo de balance que comprende el comportamiento del crecimiento celular, del consumo de sustrato y de la formación de producto en el biorreactor perfusivo. En los estudios de simulación el sistema de ecuaciones diferenciales acopladas del modelo fue resuelto en una plataforma MATLAB.

Se obtuvo una expresión de la variación de la presión transmembrana con el tiempo a partir de la teoría de microfiltración. Esta expresión, junto con los parámetros obtenidos

experimentalmente y la ecuación del flujo de alimentación se utilizaron para integrar el modelo del sistema perfusivo. Este modelo integrado presenta tres variables dinámicas que cambian con el tiempo de cultivo.

Los estudios citométricos llevados a cabo durante los cultivos muestran que la población celular mantiene su distribución de complejidad y tamaño a lo largo del cultivo, sugiriendo que la técnica de perfusión ayuda a una adecuada propagación celular.

Para definir el espacio de diseño del sistema, se recomiendan diferentes arreglos de alimentación al biorreactor o aumentar el área de permeado para minimizar taponamiento de la membrana. Una combinación de estos métodos podría ser la estrategia óptima un funcionamiento eficaz del sistema.

El estudio de costos marginales permitió realizar una evaluación económica comparativa del sistema perfusivo respecto al sistema por lotes. Los resultados muestran que el incremento en la productividad del plásmido justifica la inversión y costos adicionales asociados al sistema de microfiltración.

Esta investigación apoya la factibilidad técnica y económica de un sistema para la producción de plásmidos de uso médico utilizando una técnica novedosa consistente en un cultivo perfusivo con alimentación exponencial. La realización de más investigación contribuirá en el avance de estos indicadores.

ABSTRACT

The development of DNA vaccines and gene therapies establishes a new generation of biotechnology products. A production method for these products is plasmid DNA containing cells reproduction. In order to optimize the production of these cells, a perfusion system is proposed. Such system is composed by a microfiltration module coupled to a bioreactor capable of producing high cell densities with high specific plasmid yield without affecting its medical-grade quality. The proper functioning of the system depends heavily on the performance of the microfiltration unit.

This research analyzes theoretically and experimentally a microfiltration unit within a perfusion system producing *Escherichia coli* cells containing plasmid pVAX1-NH36 aimed for producing vaccines against leishmaniasis disease.

Studies using model solutions were performed to obtain parameters for the biomass cake resistance and the microfiltration system model. Also, kinetic parameters were obtained from batch and perfusion mode experiments.

Using a combination of analytical and kinetic parameters, a model including the behavior of cell growth, substrate consumption and product formation in the perfusive bioreactor was done. In simulation studies the coupled differential equations system of the model was solved in MATLAB platform.

An expression for the transmembrane pressure variation over time was obtained from microfiltration theory; the experimentally obtained parameters and feed flow equation were combined with the microfiltration theory to integrate the model of the whole system. In this model, there are three variables that change continuously as the fermentation is occurring.

Cytometric studies were conducted to analyze cell population throughout a perfusion experiment. It was found that cells maintain its complexity and size distribution throughout the culture, suggesting that the perfusion technique helps proper cell spreading.

To define the design space of the system, different feed arrangements to the bioreactor were recommended as well as increasing the filtration area to minimize membrane plugging and shearing. A combination of these methods ensures effective operation of the system.

The marginal cost study allowed a comparative economic evaluation perfusivo system compared to batch system. The results show that the increase in productivity of plasmid justifies the investment and additional costs associated with the microfiltration system.

This research supports the technical and economic feasibility of a medical grade plasmid production system using a novel technique consisting of an exponentially feed perfusion culture. Conducting more research will contribute to the improvement of these indicators.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado con todo mi amor

A Dios por acompañarme en cada paso de mi vida.

A toda mi familia, en especial a mis hijas Alejandra y Jacquelynn por su amor y comprensión durante las muchas horas de atención que les he robado.

Y a mis padres, por su enorme paciencia y comprensión, han sido un ejemplo y un apoyo constante, me lo han dado todo y siguen apoyándome cada día.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS	xiii
NOMENCLATURA	xiv
AGRADECIMIENTOS	xvi
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Objetivos.....	4
1.2.1 Objetivo General.....	4
1.2.2 Objetivos Específicos	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 Microfiltración de Cultivos Celulares.....	6
2.2 Leishmaniasis.....	7
2.3 Plásmidos.....	8
2.4 Cultivos Celulares de Alta Densidad.....	12
2.5 Citometría de Flujo	14
2.6 Simulación de Bioprocesos.....	15
2.7 Espacio de Diseño.....	15
METODOLOGÍA.....	18
3.1 Descripción General	18
3.2 Materiales.....	20

3.3	Equipo.....	21
3.4	Métodos	27
3.4.1	Protocolo de Funcionamiento de la Membrana	27
3.4.2	Microfiltración en Modo Diafiltración y Concentración con Soluciones Modelo.....	30
3.4.3	Cinéticas de Crecimiento Celular, Consumo de Sustrato y Formación de Producto.....	32
3.4.4	Citometría de Flujo	39
3.4.5	Espacio de Diseño.....	40
3.5	Marco Teórico.....	42
3.5.1	Modelo de Microfiltración.....	42
3.5.2	Cinéticas de Crecimiento Celular, Consumo de Sustrato y Formación de Producto.....	46
3.5.3	Análisis Económico del Proceso.....	50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		52
4.1	Determinación de la Resistencia de la Membrana.....	52
4.2	Microfiltración en Modo Diafiltración y Concentración con Soluciones Modelo	52
4.3	Cinéticas de Crecimiento Celular, Consumo de Sustrato y Formación de Producto.....	58
4.4	Integridad Celular	61
4.5	Simulación de la Microfiltración	66
4.6	Análisis Económico del Proceso.....	71
4.7	Espacio de Diseño.....	75

4.7.1 Tasas de Alimentación.....	75
4.7.2 Recirculación	80
4.7.3 Otros Factores Determinantes para el Diseño.....	80
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	85
5.1 Conclusiones.....	85
5.2 Recomendaciones	86
BIBLIOGRAFÍA	88

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Proceso de producción de plásmidos, de gen a paciente (Prazeres et al., 1999).	2
2	Comparación de costo y facilidad de procesamiento de vacunas de primera (viral), segunda (recombinante) y tercera (ADN) generación en relación con el control del peligro requerido para producir cada uno de ellos. Las vacunas basadas en ADN se destacan de otros tipos de vacunas debido a la simplicidad de la molécula y las instalaciones para manejarlo (González-Valdez, 2013).	13
3	Comparación del espacio de diseño y los rangos de funcionamiento estándares para las operaciones de rutina (Calcott, 2011).	16
4	Descripción general del enfoque metodológico del proyecto.	19
5	Sistema KrosFlo Research Ili utilizado en los procesos de microfiltración.	22
6	Incubadora VWR Orbital Shaker Incubator utilizada para las cinéticas de crecimiento a nivel matraz.	24
7	Sistema perfusivo formado por el controlador Applikon eZ-Control, el biorreactor, el sistema KrosFlo Research Ili con el módulo de microfiltración y la bomba peristáltica Cole-Parmer Masterflex L/X en el Laboratorio de Bioprocesos.	25
8	Equipo FACSCanto II utilizado para los estudios de citometría de flujo.	26
Figura		Página
9	Arreglo experimental KrosFlo Research Ili System con una membrana de microfiltración de 500 kDa utilizado para los protocolos de manejo, la	

	determinación de la resistencia de la membrana, y los experimentos de diafiltración y concentración. (1) alimentación, (2) recipiente de almacenamiento, (3) bomba de alimentación, (4) membrana de MF, (5) línea de retenido, (6) válvula de contrapresión, (7) línea de permeado y (8) bomba de extracción de permeado.	28
10	Curva patrón para determinación de glicerol.	38
11	Esquema de un módulo de microfiltración y el perfil de concentración.	43
12	Esquema del sistema de cultivo en perfusión.	48
13	Experimento de microfiltración hidráulica con membrana de 500kDa para determinación de la resistencia de la membrana utilizando un flujo cruzado de 50 mL/min.	53
14	Experimentos de diafiltración de biomasa con concentración celular de 18.15 g/L y flujo cruzado de 100 mL/min (\diamond); de 150 mL/min (\square) y 200 mL/min (Δ). Agua ($—$). Las líneas solidas representan el modelo ajustado.	54
15	Gráfica del cambio del flux de permeado (\diamond), la concentración celular (\square) y la masa de torta en la membrana (Δ) en el tiempo durante una concentración a presión transmembrana constante de 34.5kPa. Las líneas solidas representan el modelo obtenido en la plataforma MATLAB.	57
16	(a) Crecimiento celular (Δ), consumo de sustrato (\square) y (b) producción de plásmido (\diamond) en un cultivo a nivel fermentador en modo de lote. Las líneas solidas representan el modelo obtenido con la plataforma MATLAB.	59
Figura		Página
17	(a) Crecimiento celular (Δ), consumo de sustrato (\square) y (b) producción de plásmido (\diamond) en cultivo perfusivo con una velocidad de crecimiento de 0.2 h ⁻¹ . Las líneas solidas representan el modelo obtenido por la plataforma MATLAB.	60
18	Determinación de contenido de glicerol en muestras de perfusión a	

	diferentes tiempos.	63
19	Gel de electroforesis mostrando la pureza del plásmido producido a diferentes tiempos durante la perfusión. El carril 1 y 8 corresponden al marcador de peso molecular, los carriles del 2 al 7 muestran las bandas de pDNA de las muestras tomadas a los tiempos de fermentación mostrados en la parte superior del gel.	64
20	Gráficas obtenidas por el citómetro de flujo para los controles de células vivas (izquierda) y muertas (derecha).	65
21	Gráficas obtenidas por el citómetro de flujo para las muestras tomadas a los tiempos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 7.5 horas durante la fermentación.	67
22	Masa acumulada en la superficie de la membrana calculada de acuerdo al modelo integrado.	70
23	Gráfica del cambio de la presión transmembrana (\square) y la concentración celular (\diamond) en el tiempo durante una concentración a flujo constante de $3.79 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{m}^2\text{s}$.	76
24	Cambio de presión transmembrana experimental (\diamond) y su con línea de ajuste (---), flux de permeado (---) y concentración celular (---) durante una perfusión.	77
25	Cambio de presión transmembrana (---), flujo de permeado (---) y concentración celular (---) durante (a) el segundo y (b) tercer experimento perfusivo con diferente arreglo de alimentación.	79
26	Requerimiento de flujo de permeado según el incremento de concentración celular.	81
Figura		Página
27	Fermentador con caldo biológico (a), medio de cultivo definido para alimentar (b) y permeado del sistema (c).	82
28	Comparación de permeado cuando la membrana está rota (izq.) y en buenas condiciones (der).	84

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Candidatos prometedores para vacunas de tercera generación (Palatnik-de-Sousa, 2008).	9
2	Parámetros analíticos recomendados para el control en proceso y pruebas de lanzamiento de plásmido, posibles métodos de análisis y especificaciones sugeridas (Urthaler <i>et al.</i> , 2012).	11
3	Experimentos realizados en modalidad de diafiltración con soluciones conteniendo 18.15 g/L de células peso seco.	31
4	Soluciones que se requieren para la realización de la curva patrón para la determinación de glicerol en las muestras de fermentaciones.	37
5	Resumen de parámetros obtenidos mediante experimentos de diafiltración de biomasa.	56
6	Parámetros utilizados en las simulaciones realizadas en la plataforma MATLAB.	62
7	Resumen de parámetros obtenidos experimentalmente y comparación con los parámetros de referencia.	68
8	Bases para la evaluación económica del sistema de microfiltración.	72
9	Análisis económico del sistema perfusivo tomando en cuenta gastos y producción marginal a partir de la perfusión en lote.	73
10	Cálculos y evaluación económica del sistema perfusivo.	74

NOMENCLATURA

A	Área de la membrana.	(m ²)
C	Constante de concentración de la unidad de microfiltración.	Adim.
C _B	Concentración de soluto en solución.	(g/L)
C _P	Concentración de soluto en permeado.	(g/L)
D _{AB}	Coefficiente de difusión.	(m ² s ⁻¹)
D	Dilución	(h ⁻¹)
F	Flujo de alimentación o permeado	(L/h)
F ₀	Flujo inicial de alimentación	(L/h)
J	Flux de permeado	(m ³ m ⁻² s ⁻¹)
J _{SS}	Flux de permeado en estado estacionario	(m ³ m ⁻² s ⁻¹)
K _s	Constante de Monod.	(g/L)
m _X	Biomasa.	(kg)
n	Índice de compresibilidad.	Adim.
ΔPTM	Presión transmembrana.	(kPa)
P ₀	Presión a la salida del módulo.	(kPa)
P _f	Presión en la alimentación del módulo.	(kPa)
P _i	Presión a la entrada del módulo.	(kPa)
R _a	Resistencia de adsorción.	(m ⁻¹)
R _c	Resistencia de la torta de biomasa (cake).	(m ⁻¹)
R _m	Resistencia de la membrana.	(m ⁻¹)
R _{pp}	Resistencia en estado estacionario.	(m ⁻¹)
R _t	Resistencia total en la membrana	(m ⁻¹)
S	Concentración de sustrato en el cultivo	(g/L)
S _f	Concentración de sustrato en la alimentación al inicio de la perfusión	(g/L)
t	Tiempo del cultivo	(h)

t_0	Tiempo de inicio de la etapa perfusiva	(h)
V	Volumen de operación del biorreactor.	(L)
V_0	Volumen inicial en el biorreactor.	(L)
X	Concentración de biomasa en el biorreactor.	(g/L)
X_0	Concentración de biomasa inicial en el biorreactor	(g/L)
X_C	Concentración de biomasa en la torta.	(g/L)
$Y_{X/S}$	Rendimiento biomasa/sustrato	(g cel/g sust)

Letras griegas

α	Resistencia específica de la torta.	(m kg ⁻¹)
α^*	Fracción del flujo de retenido que se recircula.	Adim.
α'	Constante relacionada con forma y tamaño de partículas en la torta.	(m kg ⁻¹)
δ	Grosor de torta de biomasa.	(m)
$\Delta\pi$	Contrapresión osmótica	(kPa)
ρ_0	Masa sólida seca por unidad de volumen libre de sólidos en la membrana.	(kg m ⁻³)
μ^*	Velocidad de específica de crecimiento.	(h ⁻¹)
μ_0	Velocidad específica de crecimiento al inicio de la etapa perfusiva	(h ⁻¹)
μ_{Lote}	Velocidad específica de crecimiento durante la etapa lote	(h ⁻¹)
$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidad específica de crecimiento máxima.	(h ⁻¹)
μ_{Perf}	Velocidad específica de crecimiento durante la etapa perfusiva	(h ⁻¹)
η	Viscosidad del caldo	(kPa-s)
σ	Coefficiente de retención	Adim.
ω	Masa de sólidos base seca depositados en la membrana por unidad de área.	(kg m ⁻²)

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a varias personas e instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo. En primer lugar, a mi director de tesis, el Dr. Armando Tejeda Mansir por haber confiado en mí en todo momento durante la realización de esta investigación. Por su inestimable paciencia, ayuda y enseñanzas, sin las cuales la realización de este trabajo hubiera sido imposible. Por siempre estar dispuesto a dedicarme su tiempo y su conocimiento. Se lo agradezco de corazón.

De igual forma, me gustaría agradecer su apoyo a un grupo de personas que al comenzar este proyecto, me sumergieron en el mundo de la biología que apenas recordaba, la Dra. Rosa María Montesinos y su grupo de entonces tesistas Lucy, Atenas y Damariz, sin duda que sin su ayuda, entender la nueva área de estudio que enfrentaba, hubiera sido muy difícil.

También quiero agradecer la ayuda de la Dra. Adriana Garibay, siempre dispuesta a apoyarme, enseñarme y sacarme de problemas con el citómetro. A ella y a su equipo de trabajo, gracias por compartir sus instalaciones con nosotros.

Agradezco también al Dr. Roberto Guzmán y a la Universidad de Arizona por haberme recibido durante mi estancia y por haber compartido sus conocimientos y proyectos, también a Armando y Mariano por su apoyo y hospitalidad. A la División de Ingeniería y al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Sonora por su apoyo económico para la realización de esta estancia. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la otorgación de la beca mixta No. 290674, y al Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia porque sin su apoyo para la gestión de los trámites para la autorización de esta beca, mi estancia no hubiera sido posible.

A la Universidad de Sonora, en especial al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas y al Departamento de Ciencias Químico Biológicas por facilitar las instalaciones y equipo necesario para el proyecto. A todos los que forman parte del Posgrado de Ciencias de la Ingeniería, Ingeniería Química por darme la oportunidad de participar en este posgrado. Al Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IP por compartir el paquete celular conteniendo el plásmido de estudio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haber financiado, con el proyecto 179779 “Estudio de la recuperación y purificación de ADN plasmídico (ADN_p) por membranas: ultrafiltración tangencial y cromatografía de intercambio iónico”, la presente investigación y mediante el Programa de Becas para Estudios de Posgrado, becario No. 412589.

Debo agradecer sin duda a mi compañero de trabajo Rodolfo Munguía, por todas esas horas de discusiones y trabajo, por compartir sus experiencias y conocimientos, porque a pesar de las largas horas de preparación y fermentaciones, siempre logramos mantener un ambiente entretenido en el laboratorio. También a mis compañeros Adriana, Alonso, Aurora, e Iván por todo su apoyo en cada uno de los experimentos que realizamos, sobre todo por su divertida imaginación que hacen el trabajo pesado más ameno.

A mis hijas, padres, hermanos, amigas y amigos, por darme ánimos en los buenos y malos momentos, por creer siempre en mí y sobre todo por estar siempre ahí para mí.

A todos, muchas gracias.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

Hoy en día, el ADN plasmídico (ADNp) crece en importancia convirtiéndose en la próxima generación de productos de biotecnología. Las vacunas y terapias con ADN son tecnologías conocidas como una nueva forma de tratar a personas y animales con materiales completamente genéticos. Estas técnicas pueden ser utilizadas para prevenir enfermedades causadas por virus, bacterias y parásitos o para tratar enfermedades autoinmunes, alergias y cáncer (Prazeres *et al.*, 1999; Carnes y Williams, 2007). Algunas ventajas sobre las terapias tradicionales incluyen la corrección de enfermedades genéticas, el tratamiento selectivo de células y tejidos dañados para su auto reparación, así como un mayor periodo de protección (Rubanyi, 2001).

Para la aplicación de estas terapias se han desarrollado vectores cuyo objetivo es el de transportar y expresar genes en un sitio apropiado, a niveles específicos y de manera controlada (Anderson, 1998). No existe un vector universal, cada terapia genética tendrá sus requerimientos técnicos específicos (Rubanyi, 2001) por lo que existen diferentes estudios para tratar varias enfermedades, como la hepatitis B (Yakhchali *et al.*, 2007), el sarampión (Ongkudon, 2011) o la leishmaniasis (Palatnik-de-Sousa, 2008). Varios investigadores utilizan ADNp como vector, ya que es más seguro y fácil de producir que los vectores virales (Tejeda y Montesinos, 2008).

En la Figura 1 se presenta un esquema del desarrollo, producción y aplicación de las vacunas de ADNp. Un factor importante en la producción de ADNp es la selección de la célula hospedera. Ésta debe tener la habilidad de crecer rápidamente y alcanzar

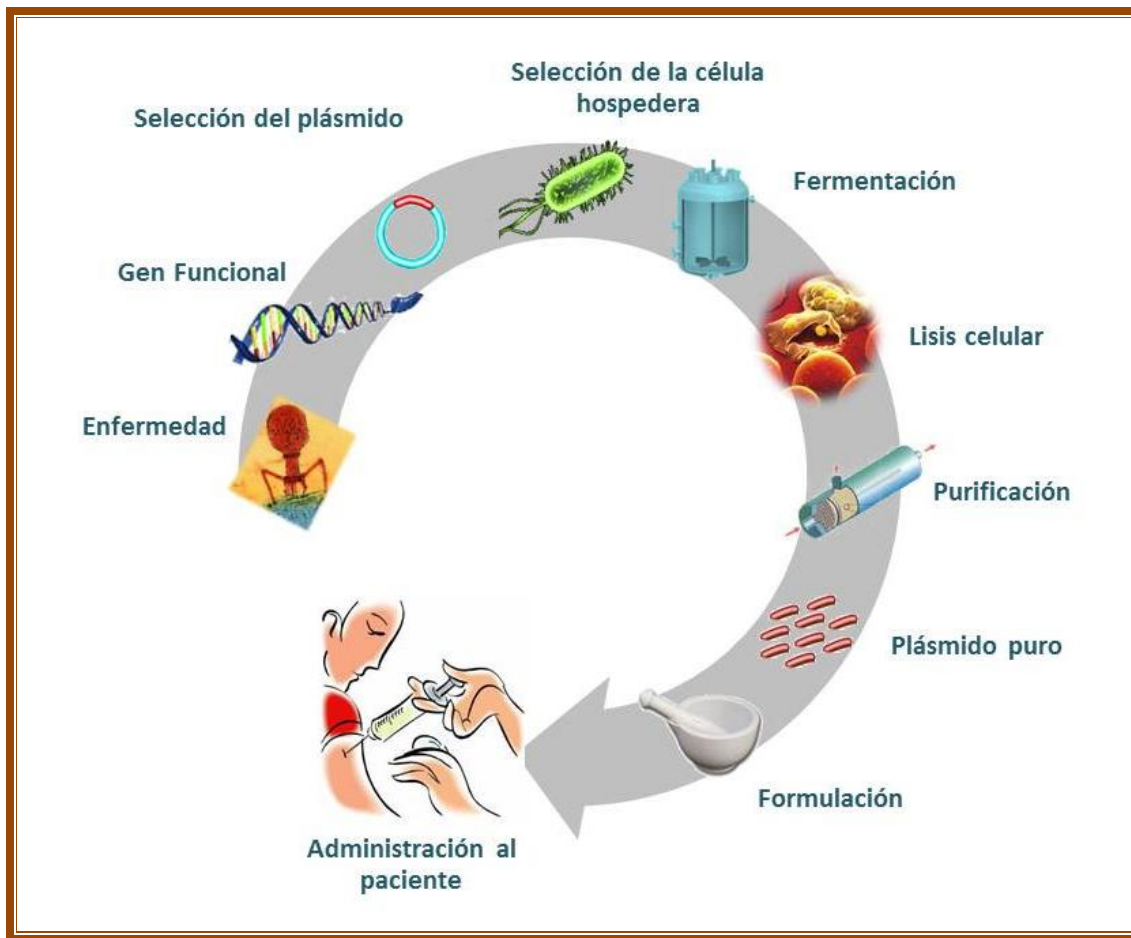


Figura 1. Proceso de producción de plásmidos, de gen a paciente (Prazeres *et al.*, 1999)

rendimientos adecuados de plásmido, bajo las regulaciones de calidad establecidas. (Prazeres *et al.*, 1999).

La bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) presenta varias ventajas como organismo hospedero, es el organismo vivo más estudiado, puede modificarse genéticamente con facilidad y está considerada como biológicamente segura para la clonación de genes y de vectores de expresión (Tejeda y Montesinos, 2008).

La biomasa de *E. coli* generada por el proceso de fermentación debe ser lisada o rota para liberar el ADN plasmídico (ADNp). El método de lisado para el aislamiento del plásmido no debe provocar daños al plásmido, ni rompimiento del ADN cromosómico de la célula hospedera ya que estos fragmentos son más difíciles de separar del ADNp (Carnes y Williams, 2007).

El objetivo de los procesos siguientes al de lisado es obtener el ADNp puro. Una gran variedad de operaciones son eficientes para la purificación de plásmido, por ejemplo la combinación de métodos de cromatografía (intercambio iónico y exclusión por tamaño molecular). Otros métodos de purificación incluyen la microfiltración por flujo tangencial, la cual se utiliza para cosechar células, concentrar, intercambiar buffer y remover impurezas selectivamente basándose en el tamaño de las moléculas. La purificación del ADNp a partir de *E. coli* ha presentado grandes desafíos en comparación con la purificación de proteínas, esto se debe a la química del ADNp y su similitud física con los ácidos nucleicos de la célula hospedera (Carnes y Williams, 2007).

Existen diferentes modos de cultivo para propagar células hospederas, como lote, lote alimentado, continuo y perfusión. Los cultivos en perfusión permiten trabajar a altas densidades celulares (Hernandez *et al.*, 2009), mediante el uso de una operación externa para concentrar los caldos biológicos mediante el uso de membranas de microfiltración.

Los equipos utilizados en microfiltración generalmente operan con flujo cruzado o tangencial, utilizando módulos que pueden presentar diferentes geometrías como tubulares y de hojas espiral. Dentro de los módulos de tubulares están los tubos de fibra huecas donde la alimentación fluye a presión a través del cabezal de entrada por el interior de los tubos, de tal manera que el permeado se colecta en la parte externa de los tubos a través de la fibra y el retenido sale por el extremo opuesto de los tubos a través del cabezal de salida. Este funcionamiento, y el hecho de que los diámetros de los poros son muy pequeños, hacen que estas fibras sean especialmente útiles para separar células. El diseño de equipos de microfiltración está basado en una combinación de teoría y experimentación, para estimar las áreas de los equipos, las etapas necesarias y el tiempo requerido de un proceso (Tejeda *et al.*, 2011).

En esta investigación se analizó teórica y experimentalmente un sistema de microfiltración acoplado a un biorreactor operando en modo perfusivo para la producción del plásmido pVAX-NH36 alojado en *E. coli* DH5 α . Se utilizó un modelo matemático para simular el comportamiento del crecimiento celular, del consumo de sustrato y de la formación de producto en el biorreactor. Este modelo se acopló a un modelo matemático que describe el comportamiento de la separación para conformar el modelo integral del sistema. Mediante estudios de simulación dinámica y de proceso se determinó el espacio de diseño. Los resultados del estudio se utilizaron para efectuar un análisis económico del proceso.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Desarrollar un análisis teórico y experimental de un sistema de microfiltración para la producción de plásmido de uso médico en un biorreactor de alta densidad.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Establecer un protocolo para el funcionamiento de la membrana y determinar la resistencia de la misma.
- Obtener los parámetros del sistema de microfiltración con soluciones modelo en modo diafiltración y concentración.
- Emplear un enfoque teórico-experimental para describir el comportamiento del crecimiento celular, del consumo de sustrato y de la formación de producto en un biorreactor de alta densidad.
- Analizar el efecto de la microfiltración sobre la morfología celular.
- Desarrollar un modelo integral del comportamiento para simular la unidad de microfiltración.
- Efectuar el análisis económico del proceso.
- Constituir el espacio de diseño del proceso, particularmente las tasas de alimentación y recirculación.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microfiltración de Cultivos Celulares

Los procesos de membranas son cada vez más utilizados en biotecnología e ingeniería de procesos. Esto se debe a la variedad de aplicaciones que existen, a que son simples de operar, a que suelen ser más económicas en comparación con otras opciones de procesamiento y a que están disponibles en una variedad de formatos como la microfiltración (Rathore y Shirke, 2011).

Los procesos de ultrafiltración y microfiltración pueden separar solutos de partículas coloidales de tamaño de 1 a 100 nm y de 0.1 a 10 μm , respectivamente, usando una diferencia de presión de por lo general 100 a 500 kPa como la fuerza impulsora. Hoy en día las membranas de ultrafiltración y microfiltración son comúnmente hechas de materiales poliméricos, tales como poliamida, polisulfona, acetato de celulosa, policarbonato y un número de otros polímeros avanzados (Bowen, 1995).

Con el fin de aumentar la productividad de *E. coli* en fermentaciones donde se combinan etapas por lote, lote alimentado y perfusión, recientemente se utilizó una membrana de microfiltración para la retención celular. Se desarrollaron modelos para evaluar la fermentación y el rendimiento de la membrana. El modelo utilizado sólo funcionó adecuadamente para describir el comportamiento a corto plazo de la membrana. Una evaluación más a detalle del modelo y los resultados experimentales indicaron que la obstrucción en la membrana no se debía únicamente a las células. Por lo que se asume que las incrustaciones de los componentes del medio y productos intracelulares liberados al medio desempeñan un papel importante en la disminución del flujo a través de la membrana (Cuellar *et al*, 2009).

Cuando se desarrollan modelos para la separación de moléculas por microfiltración, los procesos de membrana sufren de resistencia de la capa límite de transferencia de masa causada por la polarización de concentración. Existe una diferencia entre los mecanismos de transferencia de masa convencionales y los mecanismos transferencia de masa en membranas (Hwang, 2011).

2.2 Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad causada por protozoos parásitos (del género *Leishmania*) y transmitidos por la picadura de los mosquitos (de los géneros *Phlebotomus* en Europa, África y Asia y *Lutzomyia* en América). Actualmente, es endémica en 88 países y afecta a 12 millones de personas en todo el mundo. Varias especies de *Leishmania* causan enfermedades humanas, desde lesiones cutáneas hasta leishmaniasis visceral fatal, leishmaniasis mucosa y leishmaniasis cutánea difusa (Palatnik-de-Sousa, 2008).

La Organización Mundial de la Salud estima que existen más de 12 millones de casos actualmente, con una incidencia anual de más de 600 000 casos por año y 750 000 muertes anuales. Aunque no existen cifras confiables debido al gran número de casos no reportados, y por una gran proporción de casos asintomáticos o subclínicos (de Jesus Hernandez-Flores, 2007). En México, la leishmaniasis cutánea o también llamada úlcera de los chicleros es común en el Sureste de México, Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, Michoacán, Jalisco y Nayarit (Rodriguez-Dominguez, 2002).

En la actualidad se buscan alternativas para su tratamiento, ya que por más de 60 años, los compuestos pentavalentes de amonio han sido el tratamiento estándar. Sin embargo, esta enfermedad presenta alta resistencia a estos fármacos. En la India, la frecuencia de resistencia es cercana a 100%. Otras desventajas son la administración prolongada (tratamientos de 28 días) y efectos colaterales tóxicos (aunque reversibles) como son:

fatiga, mialgias, anormalidades electrocardiográficas, elevación de amino transferasas, y pancreatitis química (Hernandez-Flores, 2007).

Se han utilizado diferentes tipos de vacunas contra la leishmaniasis. Las de primera generación compuestas de parásitos muertos; las vacunas de segunda generación, que utilizan parásitos vivos modificados genéticamente o bacterias o virus que contienen genes de *Leishmania* recombinantes o fracciones nativas. El enfoque más reciente es el de las vacunas de tercera generación, que incluyen genes que codifican para un antígeno protector (Palatnik-de-Sousa, 2008). Estas vacunas de tercera generación están formadas por plásmidos que contienen los genes que codifican para el antígeno protector.

Según estudios realizados en Rio de Janeiro, en los últimos años existe gran interés en el desarrollo de vacunas contra la leishmaniasis. En la Tabla 1 se observan los antígenos que fueron encontrados como los candidatos más prometedores para los próximos años ya que han sido probados en modelos animales (Palatnik-de-Sousa, 2008).

2.3 Plásmidos

El termino plásmido se originó hace poco más de 60 años, y se utilizaba como un término genérico para cualquier partícula genética adicional al cromosoma de una célula. El propósito de definir este término era el de diferenciar los parásitos, los virus y los genes. No fue hasta el año 1970 cuando se comenzaron a utilizar en investigación de genética molecular y en biotecnología (Lederberg, 1998).

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes al ADN cromosómico. Están presentes normalmente en bacterias y su tamaño varía desde 1 a 250 kb. En general, no contienen información esencial, sino que confieren ventajas al hospedador en condiciones de crecimiento determinadas. Por ejemplo, contienen genes de resistencia a un determinado antibiótico, de manera que el plásmido únicamente supondrá una ventaja en presencia de

Tabla 1. Candidatos prometedores para vacunas de tercera generación (Palatnik-de-Sousa 2008).

Antígeno candidato	Modelo animal probado
LACK	Ratones y perros
LeIF, TSA, LmSTII	Ratones, changos, humanos
H1	Ratones, changos
Cpa + CPb	Ratones, perros
KMP11	Ratones, hámsteres, perros
NH36	Ratones, perros

ese antibiótico. Los plásmidos se utilizan como vectores de clonación en ingeniería genética por su capacidad de reproducirse de manera independiente del ADN cromosomal, así como también porque es relativamente fácil manipularlos e insertar nuevas secuencias genéticas (Prescott, 2005).

Debido a su importancia como productos para curar enfermedades, los sistemas de producción de plásmidos han sido revisados recientemente, describiendo a detalle cada una de las etapas y patentes relacionadas con cada parte del proceso de producción (Carnes y Williams, 2007).

El proceso de producción de plásmidos comprende varias operaciones, sin embargo algunos investigadores sólo se enfocan en estrategias de crecimiento para producir bacterias como *E. coli* con el plásmido deseado (Tejeda y Montesinos, 2008). Estos estudio buscan aumentar el rendimiento celular y específico del plásmido con respecto a la masa celular sin afectar la integridad del plásmido (Carnes *et al.*, 2006).

Otros investigadores (Prazeres, 2001; Bohle, 2011; Urthaler *et al.*, 2012) se enfocan a los métodos de purificación de plásmido ya que conforme las vacunas de ADN avanzan en el campo de pruebas clínicas, la demanda de plásmido de grado farmacéutico producido de acuerdo a las prácticas de buena manufactura aumenta.

El control de calidad y análisis de ADNp para aplicaciones farmacéuticas se rige por una serie estatutos. La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (por sus siglas en inglés FDA) con el fin de garantizar consistencia en la fabricación y seguridad en los productos, solicita que para el lanzamiento de cantidades de prueba o a granel de producto, se deben utilizar pruebas estándares de especificidad, sensibilidad, estabilidad, pruebas de lanzamiento y control durante el proceso (IPC por in-process control). La Tabla 2 muestra los parámetros, métodos y especificaciones requeridas para la producción de plásmido (Urthaler *et al.*, 2012).

Tabla 2. Parámetros analíticos recomendados para el control en proceso y pruebas de lanzamiento de plásmido, posibles métodos de análisis y especificaciones sugeridas (Urthaler *et al.*, 2012).

Parámetro	Método	Especificaciones sugeridas
Concentración de DNA	UV-absorbancia (260 nm)	Dependiendo de las especificaciones del producto
Pureza general	UV-escaneo (220-320 nm) o A260/A280	>1.75
Homogeneidad (contenido ccc)	AEC-HPLC, CGE, AGE	>90% ^a
Apariencia	Inspección visible	Claro, sin color
Residuo de DNA genómico	AGE, PCR cuantitativo, Southern blot	<1%
Residuo de RNA	AGE, PCR cuantitativo, análisis de fluorescencia	No detectable en AGE
Residuo de proteínas de célula hospedera	BCA, ELISA	<1%
Endotoxinas LPS	Examen LAL	£1 EU/mg pDNA ^b
Pureza (microorganismos)	Prueba de carga biológica y/o esterilidad	<1 CFU
Identidad (estructura de vector)	AGE, Bioanalizador	Ajuste en fragmentos de restricción
Identidad (secuencia)	Secuenciación	Ajuste
pH		Dependiendo de las especificaciones del producto

^a>80 % recomendado por la US FDA (2007)

^b≤40 EU/mg recomendado por la US FDA (2007)

Otro factor importante en el proceso de producción de plásmidos es el costo. Durante la formulación de vacunas producidas utilizando virus, se requieren instalaciones adecuadas para la generación y procesamiento de virus, estos procedimientos requieren costosas instalaciones con altos niveles de control y medidas de bioseguridad. Mientras que una vez aprobadas, la producción de vacunas de ADN será mucho más simple, ya que son moléculas universales que poseen las mismas características, independientemente de la secuencia que producen, todo el proceso de producción y purificación podría ser completamente normalizado. Por lo que la producción de cualquier vacuna de ADN puede entonces lograrse de forma masiva y todo el proceso de purificación se podía reducir a un par de pasos con protocolos estandarizados. La Figura 2 esquematiza y compara desde un punto de vista económico y de procesamiento, los diferentes tipos de vacunas con respecto a los riesgos estimados que implican el manejo de estas vacunas (Gonzalez-Valdez, 2013).

2.4 Cultivos Celulares de Alta Densidad

Las técnicas de cultivo celular a altas densidades han sido desarrolladas para mejorar la productividad de los procesos de cultivo, también para proporcionar ventajas como la reducción del volumen de cultivo, mejorar los procesos post-fermentación, disminución en los pasos de purificación al tener un volumen reducido, eliminación de etapas de concentración y por lo tanto reducción de costos de operación (Knorre *et al.*, 1991).

Estas técnicas, también presentan inconvenientes como la producción de inhibidores de crecimiento (Yakhchali *et al.*, 2007). Está reportado que los principales productos solubles al fermentar *E. coli* son acetato, etanol, formiato, lactato con cantidades pequeñas de succinato, productos gaseosos de hidrógeno y dióxido de carbono en mayor cantidad (Clark, 1989). Estos productos podrían ser los causantes de la inhibición de crecimiento en los cultivos, según algunos autores esta inhibición puede reducirse o evitarse mediante la alteración del medio de fermentación o la optimización de las estrategias de alimentación (Yakhchali *et al.*, 2007).

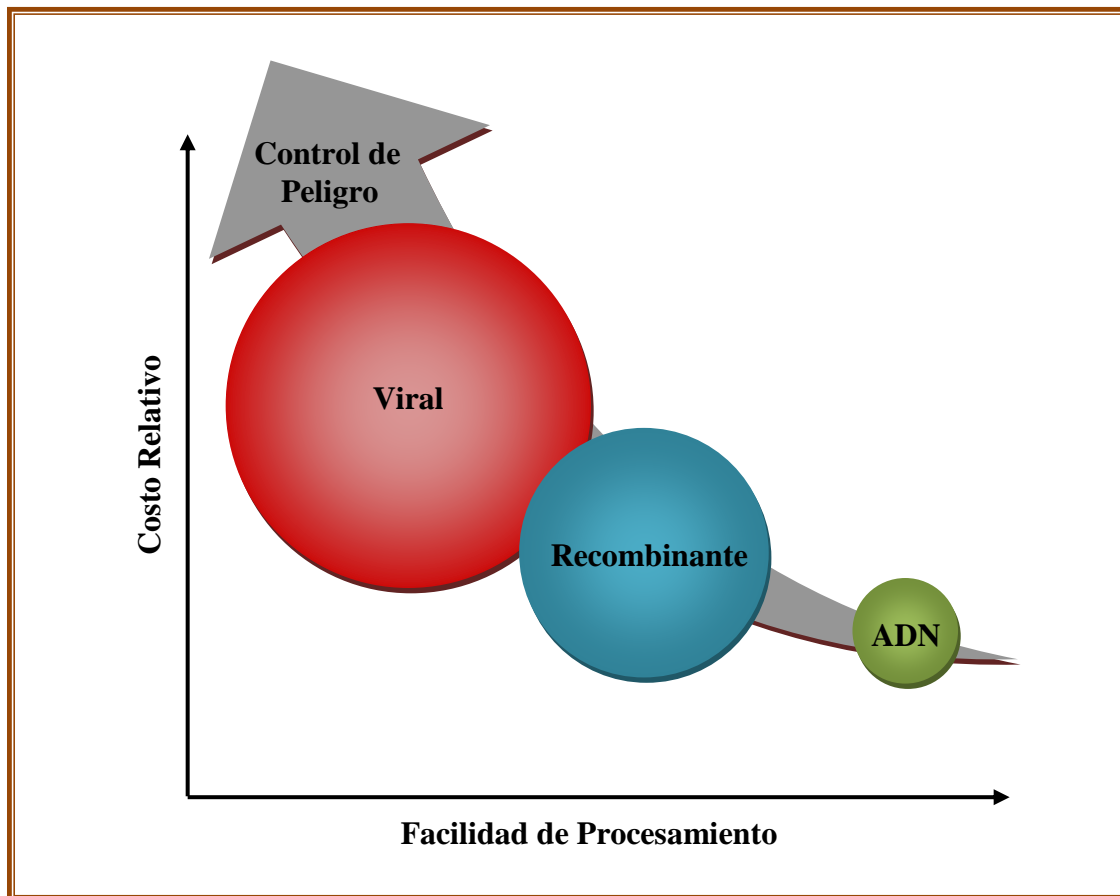


Figura 2. Comparación de costo y facilidad de procesamiento de vacunas de primera (viral), segunda (recombinante) y tercera (ADN) generación en relación con el control del peligro requerido para producir cada uno de ellos. Las vacunas basadas en ADN se destacan de otros tipos de vacunas debido a la simplicidad de la molécula y las instalaciones para manejarlo (Gonzalez-Valdez, 2013).

Diversas técnicas de cultivo celular de alta densidad se han desarrollado para el cultivo de cepas de *E. coli* recombinantes y no recombinantes como el de lote alimentado a concentraciones mayores que 100 g/L peso celular seco (Lee, 1996). Otros sistemas para lograr la alta densidad utilizan como medio de separación sistemas de microfiltración (Voisard *et al.*, 2003; Restaino *et al.*, 2011).

2.5 Citometría de Flujo

La citometría de flujo ha sido durante varios años un método útil para el estudio de las características de bacterias. Aunque en un principio, el análisis de células bacterianas no se prestaba para experimentos de citometría, los problemas generales asociados con el tamaño relativamente pequeño de bacterias se han superado, y el aumento de la disponibilidad de equipos de citometría de flujo ha permitido importantes progresos en este campo (Hewitt *et al.*, 2000).

El contenido de ADN de cada bacteria puede ser determinado utilizando colorantes fluorescentes específicos para ADN, mientras que cantidad de luz reflejada por una bacteria al pasar por el láser de luz del citómetro es un buen indicador de su masa celular, por lo que el contenido de ADN y la masa de esta bacteria puede ser medida simultáneamente (Boye y Løbner-Olesen, 1991).

La medición de los estados fisiológicos de la célula, su proliferación y su viabilidad, así como los componentes intracelulares, son factores esenciales para la toma de decisiones sobre el control del proceso, ya que éste depende en gran medida del número de células metabólicamente activas. La citometría de flujo es una técnica poderosa para la caracterización rápida de poblaciones de células y su aplicación a procesos biotecnológicos con microorganismos que ha ganado gran interés en los últimos años (Silva, 2011).

2.6 Simulación de Bioprocesos

En la actualidad, las simulaciones se han vuelto indispensables para el análisis y la optimización de los bioprocesos. Varios de estos bioprocesos son específicamente distribuidos, es decir, sus variables cambian en el tiempo y el espacio. Su simulación frecuentemente requiere soluciones aproximadas mediante computadora (Logist *et al.*, 2009).

El sistema del software MATLAB proporciona la posibilidad de resolver sistemas de ecuaciones diferenciales en una interface gráfica sencilla de utilizar. Es adecuado para simulaciones de ingeniería de bioprocesos, para describir el comportamiento de fermentación y de sistemas de biorreactores (Sevella y Bertalan, 2000).

2.7 Espacio de Diseño

El ciclo de desarrollo de un producto define un espacio de diseño que no es definitivo, siempre se está perfeccionando. El espacio de diseño es la zona en la que un proceso puede operar con resultados predecibles para que los productos sean aceptables en todo momento. En la Figura 3 se muestra que este espacio es mayor y más amplio que los rangos de funcionamiento para las operaciones de rutina. Cuando se presenta evidencia de tener definido el espacio de diseño de un proceso a la FDA, generalmente se permite hacer modificaciones en el sistema, siempre y cuando se mantenga dentro de este "espacio" (Calcott, 2011).

El análisis espacial de diseño está basado en preguntas, opciones y criterios para representar el espacio de diseño en torno a un sistema. Los principales componentes son preguntas que identifican cuestiones claves del diseño, opciones que ofrecen posibles respuestas a las preguntas, y criterios para la evaluación y comparación de las opciones. El análisis espacial de diseño también considera justificaciones para el diseño y posibles

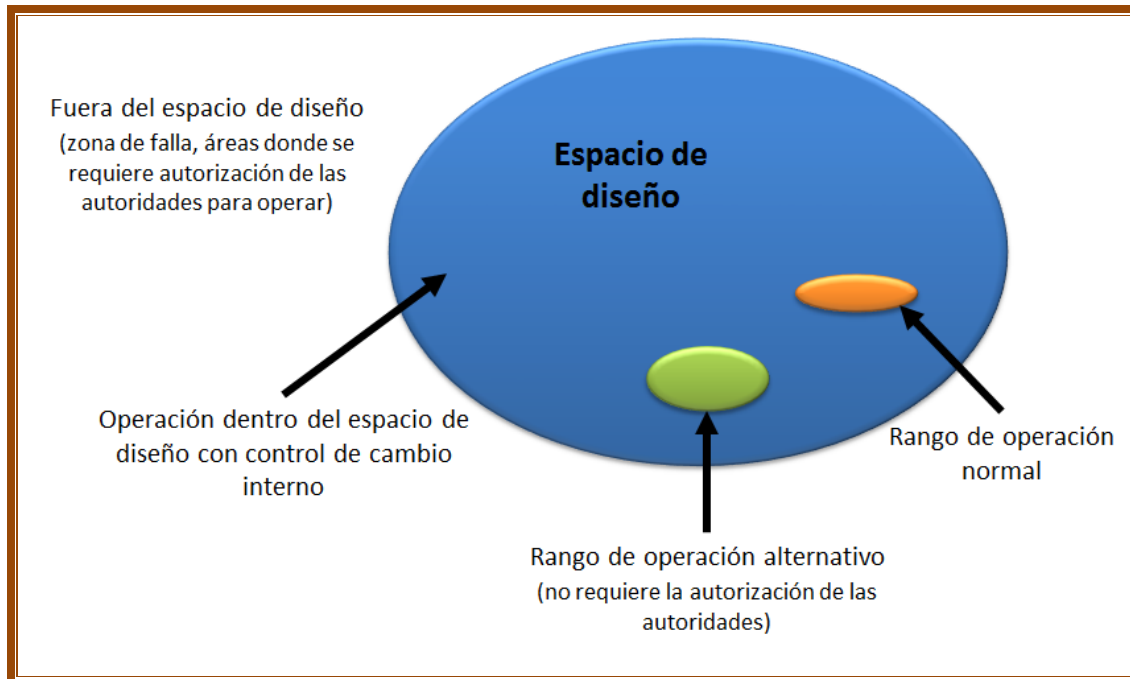


Figura 3. Comparación del espacio de diseño y los rangos de funcionamiento estándares para las operaciones de rutina (Calcott, 2011).

diseños alternativos que reflejan consideraciones tales como consistencia, modelos y analogías, y los datos y teorías relevantes (MacLean, 1991).

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

3.1 Descripción General

Durante este proyecto se analizó teórica y experimentalmente un sistema de microfiltración para la producción de plásmido en un biorreactor de alta densidad. La Figura 4 muestra un diagrama del enfoque metodológico del proyecto. Se realizaron experimentos para el desarrollo de protocolos de funcionamiento del sistema y limpieza de la membrana. Los parámetros del sistema se determinaron mediante experimentos de microfiltración en modo diafiltración y concentración con soluciones modelo. Además con estudios a nivel matraz y a nivel fermentador.

Los parámetros obtenidos se utilizaron en los estudios de simulación mediante el uso de un modelo matemático para describir el sistema perfusivo. Posteriormente se acopló este modelo al del sistema de microfiltración.

Se analizó la morfología celular a lo largo de un cultivo perfusivo mediante citometría de flujo. Además, el estudio de costos marginales permitió la evaluación económica comparativa del sistema.

El espacio de diseño se fue determinando conforme el desarrollo de los experimentos considerando esencialmente la estrategia de alimentación durante las perfusiones. Dando como resultado un área espacial de diseño donde el sistema de microfiltración es funcional y efectivo.

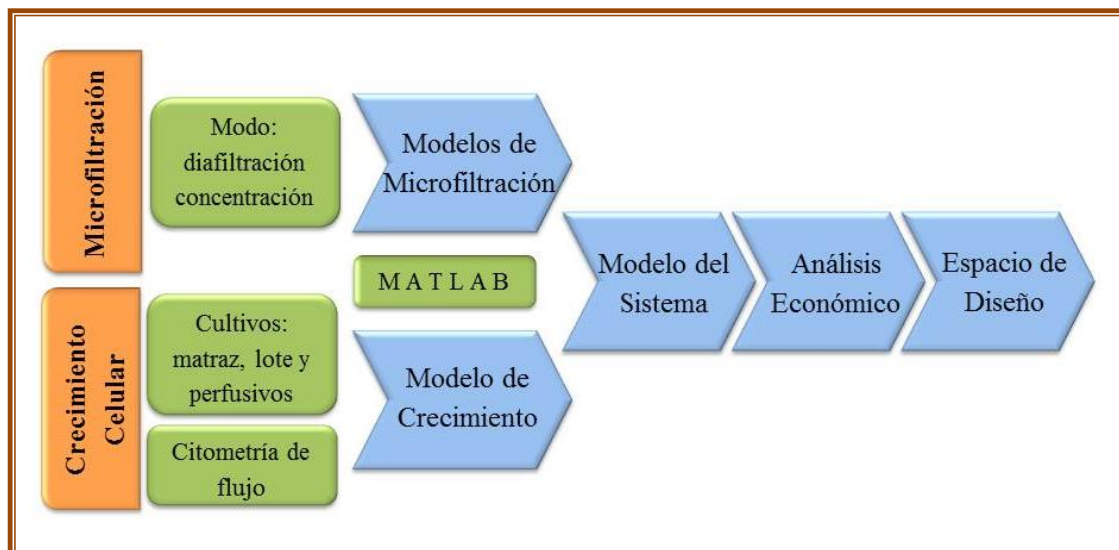


Figura 4. Descripción general del enfoque metodológico del proyecto

3.2 Materiales

Los cultivos celulares se realizaron con la bacteria *E. coli* DH5 α conteniendo el plásmido pVAX1-NH36. El tamaño del plásmido es de 4.0 kbp y contiene un gen que le da resistencia a la kanamicina con propósito de selección. El paquete celular inicial fue obtenido de una fermentación en la planta piloto del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IP.

El módulo empleado en la microfiltración fue el Modelo X3-500S-300-02N (Spectrum Laboratories, Rancho Domínguez, CA, Estados Unidos), está compuesto por una membrana de fibra hueca de polietersulfona (PS) tiene un tamaño de corte de 500 KD, un diámetro interno de 0.5 mm y un área superficial de 0.0145 m².

Los estudios a nivel matraz se realizaron inicialmente en medio de cultivo Terrific Broth (TB) enriquecido con glicerol (Sigma-Aldrich G6279-L), compuesto de extracto de levadura (Fluka 70161-500G), triptona (Fluka 16922-500G-F), fosfato de potasio monobásico (Sigma P5655-500G), fosfato de potasio dibásico (Sigma-Aldrich P2222-500G) y kanamicina (Sigma K0254-20ML).

El medio de cultivo seleccionado consistió en un medio definido conteniendo glicerol (Sigma-Aldrich G6279-L), fosfato de potasio dibásico (Sigma-Aldrich P2222-500G), fosfato de amonio dibásico (Sigma-Aldrich GA5764-500G), ácido cítrico (Jalmek A1325-04) y sulfato de magnesio (Sigma M2773-500G). Además de soluciones traza compuestas de: citrato férrico (Fluka 44941-250G), cloruro de cobalto hexahidratado (Sigma-Aldrich C8661-25G), cloruro de manganeso tetrahidratado (Sigma M8054-500G), cloruro cúprico dihidratado (Meyer 1095), ácido bórico (Sigma B6768-500G), molibdato de sodio dihidratado (Monterrey 4090), acetato de zinc (Mallinckrodt) y sal disódica dihidratada EDTA (Fisher Chemical S311-500). También contiene biotina (Sigma-Aldrich B4501-100MG) y hidrocloreuro de tiamina (Sigma-Aldrich T4625-5G) y kanamicina (Sigma K0254-20ML).

Como antiespumante se utilizó el compuesto 204 (Sigma A6426-500G). El oxígeno puro se adquirió de un proveedor local (Infra). Para el lavado de la membrana se utilizó hidróxido de sodio (Reproquifin 4945P) y etanol (Sigma Aldrich E7148-500ML).

Durante la determinación del consumo de glicerol, se utilizaron los siguientes reactivos: ácido acético glacial (Fermont 03011), acetato de amonio (Fermont 11052), acetilacetona (Sigma Aldrich P7754-100ML-A), periodato sódico (Fermont 59902) y etanol (Sigma Aldrich E7148-500ML).

Para los estudios de citometría de flujo se utilizó EDTA (Fisher Scientific O2793-500) y buffer de fosfato salino (Sigma P4417-50TAB).

Para la purificación del plásmido se utilizaron kits GenElute HP Plasmid Miniprep (Sigma NA0151S-1KT) y se realizaron geles de electroforesis utilizando agarosa para electroforesis (Sigma A5304-100G), azul de bromofenol (Sigma Aldrich 114391-5G) y bromuro de etidio (Sigma Aldrich E8751-10G). También se utilizó un marcador de ADN super enrollado (Invitrogen 15622-012)

3.3 Equipo

El equipo de microfiltración consiste en un sistema KrosFlo Reasearch II TFF System (Spectrum Laboratories, Rancho Domínguez, CA, Estados Unidos) como lo muestra la Figura 5. Los componentes principales son una bomba peristáltica, una válvula de contrapresión y tres transductores de presión que son colocados en las salidas de los módulos de fibras huecas.



Figura 5. Sistema KrosFlo Research II utilizado en los procesos de microfiltración.

La incubadora VWR Orbital Shaker Incubator (Cornelius, OR, Estados Unidos) mostrada en la Figura 6 fue utilizada para la preparación de inóculos y las fermentaciones a nivel matraz. Durante los experimentos, también se utilizaron las centrifugas Sorvall Biofuge Stratos (Thermo Scientific, Alemania) y Durafuge100 Precision (Thermo Electron Corp., Chateau-Gontier, Francia), y el congelador Revco Ultima II Series (Thermo Scientific, Asheville, NC, Estados Unidos).

El crecimiento celular, a nivel fermentador, fue realizado en un biorreactor Applikon (Schiedam, Holanda) de 2L con control eZ, sensores de pH, oxígeno disuelto, temperatura y espuma. Durante las perfusiones, también se utilizó una bomba peristáltica Cole-Parmer Masterflex L/X con dos cabezales Easy-load 3 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). La Figura 7 muestra el sistema perfusivo integrado.

En las determinaciones de densidad óptica se utilizaron un espectrofotómetro UV/VIS Lambda2S (Perkin Elmer, Monterrey, NL, Mexico) y un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Estados Unidos).

Para el análisis de integridad celular se utilizó un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences, Estados Unidos) como el que se muestra en Figura 8.

Se utilizaron además un baño de agua caliente (Bio-Rad, Cornelius, OR, Estados Unidos), una centrifuga Micro Centrifuge (BioRad, Taiwan), una cámara horizontal de electroforesis Sub-Cell GT (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos) y un equipo UVP MultiDoc-It Digital Imaging Systems (UVP, Upland, CA, Estados Unidos).



Figura 6. Incubadora VWR Orbital Shaker Incubator utilizada para las cinéticas de crecimiento a nivel matraz



Figura 7. Sistema perfusivo formado por el controlador Applikon eZ-Control, el biorreactor, el sistema KrosFlo Research III con el módulo de microfiltración y la bomba peristáltica Cole-Parmer Masterflex L/X en el Laboratorio de Bioprocesos



Figura 8. Equipo FACSCanto II utilizado para los estudios de citometría de flujo.

3.4 Métodos

Los métodos 3.4.1 y 3.4.2 se llevaron a cabo utilizando el arreglo experimental que se muestra en la Figura 9.

3.4.1 Protocolo de Funcionamiento de la Membrana

Limpieza de la Membrana. El lavado de las membranas de microfiltración se adaptó de los protocolos de limpieza sugeridos por el proveedor y se llevó a cabo al terminar cada experimento.

El lavado de la membrana se realizó con una solución de NaOH a una concentración de 0.5M de acuerdo a los siguientes pasos:

1. Enjuague. Consiste en tres lavados por recirculación con 50 mL de agua desionizada por un periodo de 2-3 minutos a temperatura ambiente.
2. Lavado. Se lleva a cabo recirculando 50 mL de una solución de NaOH por un periodo de 40 minutos a temperatura ambiente.
3. Retroflujo. Utilizando una jeringa, se inyecta lentamente de 10 a 20 mL de NaOH 0.5M por la salida de permeado.
4. Enjuague. Consiste en tres lavados por recirculación con 50 mL de agua desionizada por un periodo de 2-3 minutos a temperatura ambiente.
5. Verificado de integridad. Se recirculan 50 mL de agua desionizada y se mide el flujo de permeado a diferentes gradientes de presión para verificar que se restablezca la resistencia intrínseca de la membrana.
6. Esterilización. En caso de que el flujo no se restablezca, se trata la membrana con etanol de acuerdo al protocolo de esterilización.

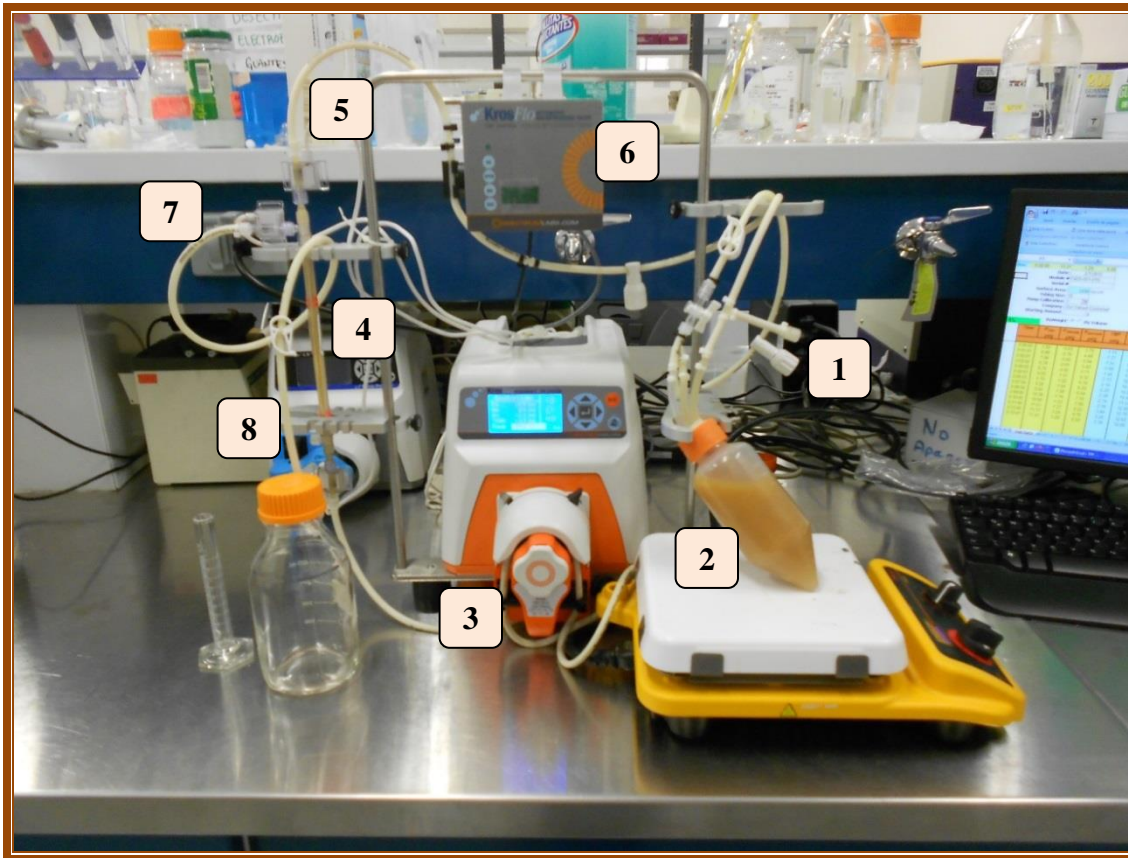


Figura 9. Arreglo experimental KrosFlo Research III System con una membrana de microfiltración de 500 kDa utilizado para los protocolos de manejo, la determinación de la resistencia de la membrana, y los experimentos de diafiltración y concentración. (1) alimentación, (2) recipiente de almacenamiento, (3) bomba de alimentación, (4) membrana de MF, (5) línea de retenido, (6) válvula de contrapresión, (7) línea de permeado y (8) bomba de extracción de permeado.

Protocolo de Esterilización de la Membrana. Es posible esterilizar la membrana en la autoclave, pero no los transductores de presión, por lo que se utilizó el siguiente método de esterilización:

1. Recirculación. Consiste en recircular 50 mL de una solución de 70% etanol por un periodo de 25 minutos a temperatura ambiente.
2. Retroflujo. Utilizando una jeringa, se inyecta lentamente de 10 a 20 mL de etanol por la salida de permeado.
3. Enjuague. Consiste en tres lavados por recirculación con 50 mL de agua desionizada estéril por un periodo de 2-3 minutos a temperatura ambiente.
Nota: Se recomienda tener mecheros encendidos alrededor del área de trabajo para mantener esterilidad.
4. Almacenaje del módulo. Se cierran las salidas de las membranas o realizar las conexiones correspondientes.

Integridad de Membrana. Cuando al realizar la verificación de integridad del procedimiento de limpieza, los valores de volumen de permeado siempre son muy altos y la presión transmembrana no aumenta a más de 5.0 psi, se considera que la membrana está comprometida o dañada.

Verificación de Estabilidad en el Sistema. Para buscar fugas en el sistema se siguen los siguientes pasos:

1. Se inunda el sistema con agua.
2. Se purga el sistema con aire para eliminar todo el líquido del lado del retenido, manteniendo inundado el lado del permeado.
3. Se cierra las líneas de alimentación, permeado y retenido.
4. Se enciende el monitor de presión y se verifica que la lectura de la presión de alimentación sea cero.
5. Se enciende la bomba para la circulación de aire y se ajusta el flujo a 30 mL/min hasta que la presión de alimentación sea de 5.0 psi (aproximadamente 10 segundos). Al final de este período se apaga la bomba.

6. Se revisa la caída de presión después de 1.0 min.
 - a. Si no hay pérdida de presión (<0.5 psi/min) el sistema no tiene fugas.
 - b. Si la caída es mayor a 0.5 psi/min, asegurarse que todas las uniones de mangueras se encuentren correctamente apretadas y repetir los pasos anteriores.
7. Una vez asegurado que el sistema no tiene fugas, liberar la presión en la membrana abriendo las válvulas de retenido y permeado.

Determinación de la Resistencia de la Membrana. La resistencia intrínseca de la membrana fue obtenida mediante un experimento de diafiltración hidráulica que consistió en recircular agua en el sistema a un flujo cruzado constante de 50 mL/min utilizando las presiones transmembrana de 1.5, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 11.0, 18.0 psi. Como respuesta se midió el flux de permeado para cada una de las presiones transmembrana seleccionadas.

La variación de la presión transmembrana se realizó utilizando una válvula automática de contrapresión colocada a la salida del retenido, al fijar la presión transmembrana en dicha válvula, ésta hace presión en la manguera de retenido hasta alcanzar la presión deseada.

3.4.2 Microfiltración en Modo Diafiltración y Concentración con Soluciones Modelo

Cada experimento de diafiltración con soluciones modelo se realizó recirculando una suspensión conteniendo 18.15 g/L de células peso seco, a un flujo cruzado constante, variando la presión transmembrana y midiendo el flux de permeado. La Tabla 3 muestra los experimentos realizados en el sistema de microfiltración en modalidad de diafiltración.

Tabla 3. Experimentos realizados en modalidad de diafiltración con soluciones conteniendo 18.15 g/L de células peso seco.

Flujo cruzado (mL/min)	ΔPTM (kPa)
100	4.1, 13.8, 34.5, 55.1, 75.8, 96.5 y 117.1
150	5.5, 13.8, 34.5, 55.1 y 75.8
200	27.6, 34.5, 55.1, 75.8, 96.5 y 117.1

La variación de la presión transmembrana se realizó mediante la válvula automática de contrapresión colocada a la salida del retenido. Después de cada uno de los experimentos, la membrana fue lavada de acuerdo al protocolo de limpieza antes mencionado.

Los experimentos de concentración de soluciones modelo se realizaron utilizando la presión transmembrana o flux de permeado constante. En ambos casos se empleó un flujo cruzado de 150 mL/min y se prescindió de la alimentación de suspensión.

Concentración a Presión Transmembrana Constante. Se coloca en el recipiente de almacenamiento 250 mL de una suspensión celular de 9.72 g/L peso seco. Se prende la bomba de alimentación y mediante la válvula reguladora de contrapresión se fija la presión transmembrana a 34.5 kPa. Durante el experimento se mide el flux de permeado y la concentración de la suspensión celular en el tanque de almacenamiento a cada minuto.

Concentración a Flux de Permeado Constante. Se coloca en el recipiente de almacenamiento 250 mL de una suspensión celular de 7.83 g/L peso seco. Para mantener el flux de permeado constante, se prende la segunda bomba peristáltica conectada a la línea de permeado y se ajusta el flujo de permeado a 3.3 mL/min, es decir un flux de permeado de $3.79 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{m}^2\text{-s}$. Durante el experimento se midió el incremento de la presión transmembrana y el incremento de la concentración de la suspensión celular dentro del tanque de almacenamiento, en intervalos de 1.0 min.

3.4.3 Cinéticas de Crecimiento Celular, Consumo de Sustrato y Formación de Producto

Para obtener las curvas de crecimiento en los cultivos, se tomaron muestras para determinar la concentración celular a diferentes tiempos mediante lecturas de absorbancia a 600 nm (DO_{600}).

Preparación de Medio de Cultivo TB para Matraz. La preparación de medio de cultivo TB consiste en la preparación de dos tipos de soluciones: un medio sin sales y una solución de sales.

La solución de medio sin sales se prepara para obtener una concentración final de 24 g/L de extracto de levadura, 12 g/L de triptona y 37.86 g/L de glicerol, disolviéndolos en el mismo orden y aforando a un volumen de manera que al agregarle la solución de sales y el inóculo, se obtenga el volumen total de medio deseado.

La solución de sales se prepara disolviendo 2.31 g/L de fosfato de potasio monobásico y 12.54 g/L de fosfato de potasio dibásico en aproximadamente 100 mL de agua. Estas dos soluciones se esterilizan por separado, y una vez estériles y frías, se mezclan en condiciones estériles. Se le agrega kanamicina para tener una concentración final (considerando el inóculo) de 50 µg/mL y después el inóculo necesario.

Preparación de Medio de Cultivo Definido. La preparación de medio de cultivo definido consiste en la preparación de tres tipos de soluciones: sales, glicerol y vitaminas. Las soluciones se preparan en volúmenes correspondientes al 70, 16 y 4% del volumen final de medio a preparar, respectivamente.

Para preparar la solución de sales se utilizan dos soluciones trazas. La solución traza 1 contiene 110.8 g/L citrato férrico. La solución traza 2 contiene 2.5 g/L cloruro de cobalto hexahidratado, 15 g/L cloruro de manganeso tetrahidratado, 1.5 g/L cloruro cúprico dihidratado, 3 g/L ácido bórico, 2.1 g/L molibdato de sodio dihidratado, 33.8 g/L acetato de zinc y 14.1 g/L sal disódica dihidratada EDTA.

La solución de sales se prepara para obtener una concentración final de 13.3 g/L fosfato de potasio dibásico, 4 g/L fosfato de amonio dibásico, 1.7 g/L ácido cítrico, 1 g/L de solución traza 1 y 1 g/L de solución traza 2. Una vez disueltos los componentes se ajusta el pH a 6.8 utilizando amoníaco.

La solución de glicerol se prepara para obtener una concentración final de 13, 18, 25 o 50 g/L de glicerol y 1.2 g/L sulfato de magnesio. El medio de cultivo con concentraciones de 18, 25 y 50 g/L de glicerol se utiliza para alimentar el biorreactor durante la perfusión.

Para la preparación de la solución de vitaminas, se utiliza una solución stock conteniendo 0.2 g/L de biotina y una con 4.5 g/L de tiamina esterilizadas utilizando un microfiltro de 0.2 μm . En cada preparación se toman 1.25 mL/L de la solución de biotina y 2.0 mL/L de la solución de tiamina, se mezclan y se aforan al volumen correspondiente.

Una vez esterilizadas las soluciones de sales y el glicerol, bajo condiciones estériles se agrega la solución de glicerol a las sales, posteriormente la solución conteniendo las vitaminas y kanamicina para alcanzar una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$.

El 10% del volumen final restante del medio de cultivo corresponde al inóculo que se utiliza para cada fermentación. Cuando el medio se prepara para alimentar únicamente, se reemplaza este volumen con agua estéril.

Cultivos Celulares a Nivel Matraz. Para los experimentos de diafiltración y concentración de soluciones modelo se cultivaron células en matraces con 200 mL de medio TB, a 37 °C y 250 rpm en la incubadora durante 8 horas. Para concentrar estos caldos se centrifugó a 5000 rpm por 5.0 min en una centrífuga refrigerada.

Para la preparación de los inóculos para los cultivos en lote y los cultivos perfusivos a nivel biorreactor, se realizaron una serie (de 3 a 6) de transferencias de matraz a matraz, iniciando con una muestra del banco de células en medio definido. Los cultivos fueron crecidos a 30 °C y 260 rpm en la incubadora por periodos de 8 a 10 horas.

Cultivos Celulares a Nivel Fermentador: por Lote y Perfusivo. Los cultivos celulares a nivel biorreactor se iniciaron a partir de los cultivos a nivel matraz. Una vez alcanzada la fase exponencial de estos cultivos, se centrifugaron para reducir el volumen y proporcionar el 10% de inóculo en la fermentación con suficiente biomasa para comenzar la fermentación con $DO_{600} = 2.0$.

Todas las fermentaciones se realizaron a pH a 6.8 ± 0.1 controlado mediante adición de hidróxido de amonio al 12.5% o ácido fosfórico al 10%. La temperatura en el biorreactor se mantuvo a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando el enfriamiento con el intercambiador de calor o la chaqueta de calentamiento del biorreactor.

El oxígeno disuelto fue calibrado a 0% con la utilización de nitrógeno y a 100% con saturación de aire y 700 rpm de agitación. El sistema se aireó a 3.0 vvm (volumen de aire/volumen de medio), en este caso 3.0 L/min. El oxígeno disuelto se mantuvo a 30%, siendo controlado mediante la variación de la agitación entre 400 y 900 rpm con pulsos de hasta 1.0 L/min de O_2 que varían automáticamente según el sistema lo requiera para mantener 30% de saturación de oxígeno disuelto.

Durante el crecimiento celular en modo perfusivo, la alimentación de nutrientes se realiza de acuerdo con una estrategia de alimentación exponencial predeterminada, es decir, después de que se consume una cantidad inicial de sustrato de carbono durante la fase de lote, pero antes de agotar el sustrato, comienza la fase de alimentación de nutrientes y al mismo tiempo se inicia con la perfusión.

Consumo de Glicerol. En los experimentos de perfusión, el consumo de glicerol fue determinado mediante análisis por el método de Bondioli y Della Bella (Bondioli y Della Bella, 2005).

Se preparó una solución de acetilacetona de 0.2M mezclando 5 mL de ácido acético 1.6M, 5 mL de acetato de amonio 4M y 200 μL de acetilacetona. También se preparó

una solución de periodato de sodio 10 mM disolviendo 0.021g de periodato de sodio en 5 mL de ácido acético 1.6 M, una vez disuelto, se agregó 5 mL de acetato de amonio 4M y se mezclaron. Se requirió además un solvente de trabajo formado por etanol 96% y agua en proporciones iguales. Estas soluciones fueron preparadas al tiempo de realizar el estudio.

Para la obtención de la curva patrón de glicerol se tomó una muestra de medio de cultivo antes de inocular, donde la concentración de glicerol es de 13 g/L. Se diluyó la muestra 500 veces, es decir, se diluyó 200 μ L en 100 mL para minimizar el error. Se prepararon 7 tubos con concentraciones conocidas como son mostradas en la Tabla 4.

Para efectuar las determinaciones a cada tubo se agregó 1.2 mL de solución de periodato sódico y se agitó por 30 segundos. Al finalizar este período, se agregó 1.2 mL de solución de acetilacetona, se agitó y colocó en baño de agua a 70 °C por un minuto. Inmediatamente después se puso en agua con hielo e rápidamente se midió en el espectrofotómetro a 410 nm.

La obtención de la curva patrón se efectuó graficando la absorbancia contra concentración y agregando una línea de tendencia que pasa por el origen. Con la ecuación de la recta, se calcularon las concentraciones posteriores. La Figura 10 muestra los tubos obtenidos en la curva patrón.

Las muestras fueron obtenidas directamente del biorreactor cada hora durante la fermentación. Para su análisis se centrifugan por 3 minutos a 6000 rpm y se colecta el sobrenadante. Posteriormente se procesan como se describe anteriormente para la obtención de la curva patrón.

Tabla 4. Soluciones que se requieren para la realización de la curva patrón para la determinación de glicerol en las muestras de fermentaciones

Tubo	Solución de glicerol (1:500) (mL)	Solvente de trabajo (mL)
1*	0.0	2.0
2	0.2	1.8
3	0.4	1.6
4	0.6	1.4
5	0.8	1.2
6	1.0	1.0
7	1.2	0.8

* Blanco

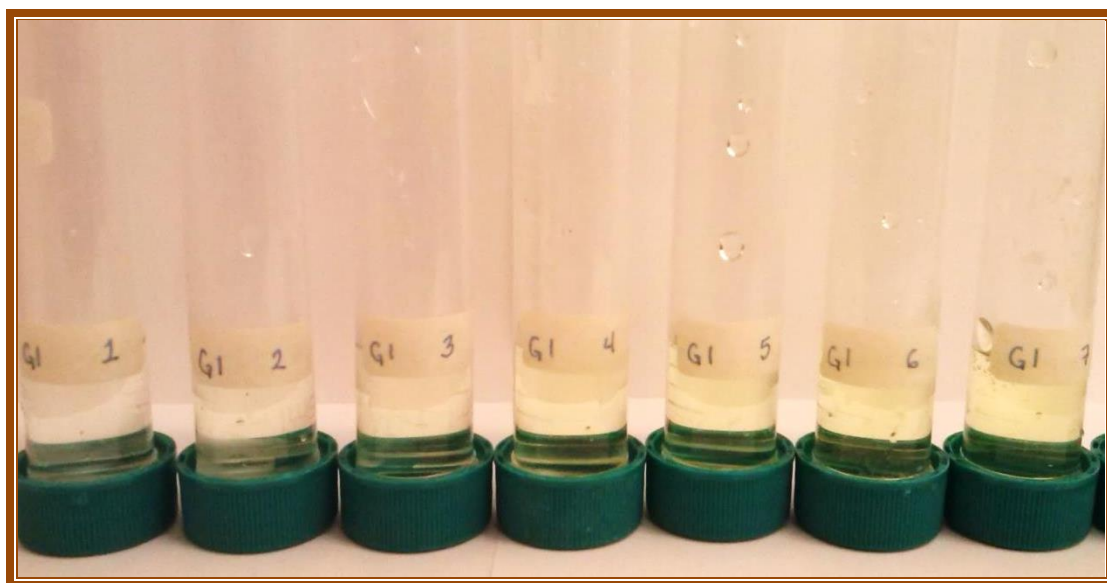


Figura 10. Curva patrón para determinación de glicerol.

Purificación de Plásmido. Las muestras de la fermentación tomadas cada hora, con un índice de masa de 4 (DO_{600}), fueron purificadas utilizando el kit GenElute HP Plasmid Miniprep de purificación.

Para determinar la concentración y pureza de plásmido, se utiliza el espectrofotómetro a una absorbancia de DO_{260} y DO_{280} . Una manera de determinar la pureza es mediante la relación 260/280 y otra manera es mediante la electroforesis en gel de agarosa, la cual también nos da información sobre la isoforma en la que se encuentra.

Electroforesis. Las muestras de plásmido purificado provenientes de los diferentes tiempos de fermentación se analizan mediante electroforesis en gel. Se prepara un gel de agarosa al 1% disolviendo la agarosa en agua desionizada, esto se logra calentando el agua con la agarosa lentamente en microondas y agitando cada 15 segundos aproximadamente, sin dejar que hierva. Una vez disuelto, se coloca en el molde para realizar el gel junto con un peine con pocillos. Una vez que el gel ha solidificado, se coloca en la unidad de electroforesis y se llena de solución TAE, la cual está formada por 40 mM de Tris, 20 mM de ácido acético y 1mM de EDTA a pH 8.0. Para iniciar la electroforesis se colocan 2 μ L de marcador de ADN super enrollado mezclados con 2 μ L de buffer de carga azul de bromofenol en el primer carril. En los siguientes carriles se colocan 4 μ L de muestra mezclados con 2 μ L de buffer de carga azul de bromofenol.

La unidad de electroforesis se conecta a la fuente de corriente a 80 V durante 40 minutos. Al terminar, el gel es colocado en una solución de 0.5 μ g/mL bromuro de etidio en la incubadora con mezclado de 30 rpm por 50 min. Para obtener la imagen del gel se coloca en el equipo UVP MultiDoc-It Digital Imaging Systems.

3.4.4 Citometría de Flujo

Para analizar el efecto de la técnica de cultivo sobre la morfología celular, particularmente el de la microfiltración se realizó un estudio de citometría de flujo. Se

tomaron muestras del cultivo cada hora durante la fermentación. Estas muestras fueron lavadas mediante los siguientes pasos: (1) se toma una muestra de 1×10^6 células y se agrega a 1.0 mL de solución de PBS con EDTA; (2) se centrifuga por 10 min a 6,000 rpm; (3) se desecha el sobrenadante y (4) se resuspende en 1.0 mL de solución de PBS para después proceder a su adquisición en el citómetro.

Para realizar el control de células muertas, se sometió una de las muestras de la fermentación a un tratamiento térmico para asegurar la muerte celular. Este tratamiento consistió en calentar a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, después se procedió al lavado de acuerdo al protocolo antes mencionado.

Los parámetros empleados al momento de leer en el citómetro fueron: FSC 550 y SSC 500.

3.4.5 Espacio de Diseño

El espacio de diseño del sistema se fue definiendo conforme se desarrollaron los experimentos. Particularmente, se enfocó el análisis en la estrategia de alimentación del medio de cultivo en la etapa perfusivo.

Tasas de Alimentación. Inicialmente se investigó el efecto de la concentración celular sobre la caída de presión en modo concentración a flujo constante. Se utilizó un volumen de 250 mL de una suspensión celular de 8.85 g/L y el flux se mantuvo constante a $3.79 \times 10^{-6}\text{ m}^3/\text{m}^2\text{-s}$, es decir, 3.3 mL/min. Durante el experimento se tomaron muestras de concentración y lecturas de presión transmembrana a diferentes tiempos.

En un cultivo perfusivo típico se mantiene el volumen de cultivo constante en el biorreactor. Para tal efecto, el flujo de permeado debe ser igual que el flujo de alimentación. Cuando la alimentación es en forma exponencial, el flujo de permeado también incrementa exponencialmente.

Cuando los flujos de permeado son altos, se genera vacío en el lado del permeado de la membrana, al ir aumentando este vacío, la presión de alimentación de la membrana aumenta críticamente. Al alcanzar una presión de alimentación a la membrana de 172 kPa, el sistema se detiene automáticamente para proteger sus componentes.

Una forma de controlar el aumento de presión es aplicando retroflujo en la membrana, éste removerá una porción de la torta formada en la membrana y volviendo la presión transmembrana a parámetros aceptables. El retroflujo consistió en aplicar 10 mL de agua estéril, en condiciones estériles por una de las salidas de permeado de la membrana.

Otro enfoque es aumentar la concentración de glicerol en el medio de alimentación durante la perfusión. Para tal efecto, se realizaron tres experimentos.

En el primer experimento, se realizó una perfusión en la que se alimentó medio definido enriquecido en glicerol a una concentración de 18 g/L y se observó el desarrollo del sistema. Esto se consideró el caso base.

En el segundo experimento, se implementó la estrategia de concentración realizando una perfusión alimentando exponencialmente 800 mL de medio enriquecido con 25 g/L de glicerol en 2.8 horas. Posteriormente se alimentaron exponencialmente 2000 mL de una solución de medio enriquecido con 50 g/L de glicerol por 5.2 horas.

Cambiar la concentración de todo el medio de cultivo fue la estrategia del tercer experimento. Se alimentó medio de cultivo a 1.72X de concentración de todos los componentes respecto a la concentración del medio del lote, con esta proporción la concentración de glicerol en el medio de alimentación era de 18 g/L.

Recirculación de permeado. Para analizar la conveniencia de recircular parte del permeado al biorreactor se analizó la evolución de la concentración de glicerol en el sistema y apariencia del permeado.

Recirculación de retenido. La velocidad de recirculación del retenido en la membrana es un parámetro de diseño a considerar, el efecto de este parámetro se investigó en los experimentos de diafiltración a de soluciones modelo

3.5 Marco Teórico

3.5.1 Modelo de Microfiltración

Los fenómenos que ocurren en un módulo de microfiltración han sido documentados por diversos autores (Bowen, 1995; Cuellar *et al*, 2009; Hwang, 2011). La Figura 11 muestra el esquema de un módulo de microfiltración incluyendo el perfil de concentración sobre la superficie de la membrana.

Flux de Permeado. El flux de permeado (J) se define como el volumen de permeado por unidad de tiempo por unidad de área disponible para la filtración. La relación entre flux y presión están relacionadas por la Ley de Darcy, que puede ser expresada como:

$$J = \frac{\Delta PTM}{\eta(R_t)} \quad (1)$$

Donde la resistencia total (R_t) de la membrana la conforma la suma de varias resistencias:

$$R_t = R_m + R_a + R_{pp} + R_c \quad (2)$$

En este análisis se considera la resistencia de la membrana (R_m) y la resistencia de la torta de biomasa (R_c) y se desprecian las resistencias por adsorción (R_a) y por obstrucción de poros (R_{pp}). De tal manera que:

$$J = \frac{\Delta PTM}{\eta(R_m + R_c)} \quad (3)$$

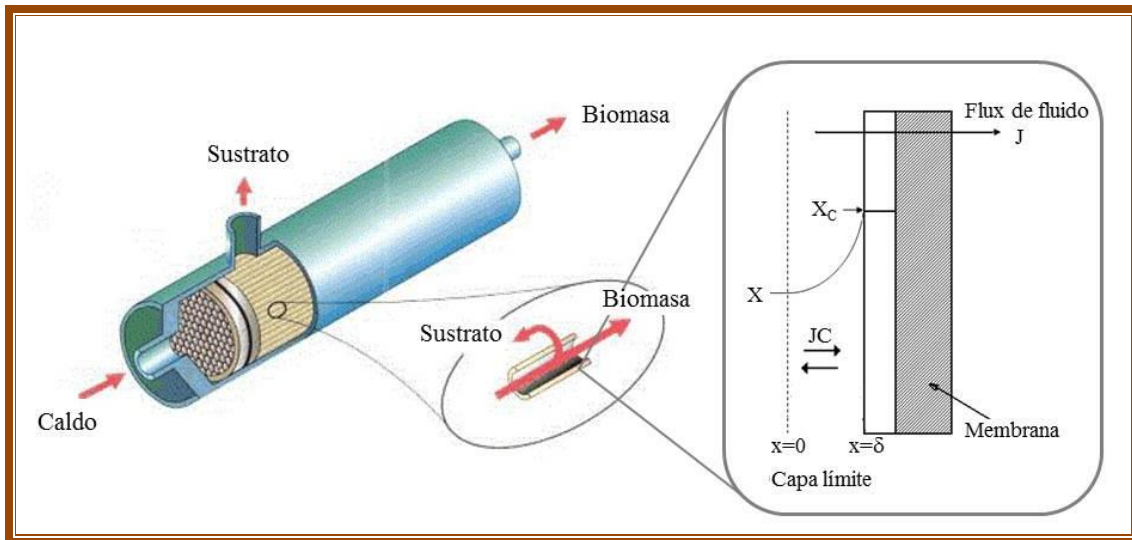


Figura 11. Esquema de un módulo de microfiltración y el perfil de concentración.

La ΔPTM es la caída de presión transmembrana dada por:

$$\Delta PTM = \left(\frac{P_i + P_0}{2} \right) - P_f \quad (4)$$

La resistencia de la torta de biomasa (R_c) en la membrana puede suponerse directamente proporcional a la cantidad de sólidos (peso seco) depositados por unidad de área de filtración. Ésta varía conforme la concentración de biomasa cambia con el tiempo en el biorreactor, por tanto:

$$R_c = \alpha \omega = \alpha \rho_0 \left(\frac{V}{A} \right) = \alpha \frac{m_X}{A} \quad (5)$$

Debido a que la mayoría de las tortas de material biológico son compresibles, la resistencia específica de la membrana (α) se correlaciona con el gradiente de presión transmembrana mediante la siguiente ecuación empírica:

$$\alpha = \alpha' \left(\frac{\Delta PTM}{\Delta PTM_R} \right)^n \quad (6)$$

El índice de compresibilidad (n) aporta información de la morfología de la célula, clasificando las tortas como moderadamente y extremadamente compresibles y puede variar desde 0.5 hasta 1.2. Como regla general, las células cilíndricas tienden a ser más compresibles que las elípticas (Foley 2006).

Substituyendo las ecuaciones (5) y (6) en la (3) obtenemos:

$$J = \frac{\Delta PTM}{\eta \left(R_m + \frac{m}{A} \alpha' \left(\frac{\Delta PTM}{\Delta PTM_R} \right)^n \right)} \quad (7)$$

$$\Delta PTM = J \eta \left(R_m + \frac{m}{A} \alpha' \left(\frac{\Delta PTM}{\Delta PTM_R} \right)^n \right) \quad (7a)$$

También podemos expresar esta ecuación en forma lineal como:

$$\ln \left[\frac{\Delta PTM}{J} - \eta R_m \right] = n \ln \left(\frac{\Delta PTM}{\Delta PTM_R} \right) + \ln(\eta Z) \quad (7b)$$

Donde:

$$Z = \frac{m}{A} \alpha' \quad (7c)$$

Biomasa Acumulada en Modo Diafiltración o Concentración. Durante la microfiltración, al efectuarse la separación de la biomasa y el medio en la superficie de la membrana, la biomasa retenida provoca que la concentración en la proximidad de la membrana aumente, a este efecto se le conoce como polarización de la concentración. Se crea un perfil de concentración con límites generados por las condiciones hidrodinámicas (Figura 11).

Para determinar la concentración de biomasa en la torta se realiza un balance de masa sobre la membrana (Carrère, 2002),

$$\frac{dm}{dt} = JXA - \frac{D_{AB}}{\delta} (X_C - X)A \quad (8)$$

De acuerdo con la ley de Fick, debido a que la concentración es más alta en la superficie de la membrana, habrá una tendencia de la biomasa a difundirse de nuevo en la solución (Bowen 1995). Basado en lo anterior, consideramos que la concentración de biomasa en la pared de la membrana (X_C) es significativamente mayor que la del caldo en el biorreactor, podemos simplificar la ecuación en:

$$\frac{dm}{dt} = A \left(JX - \frac{D_{AB}}{\delta} X_C \right) \quad (9)$$

Por la misma razón, al realizar graficas de flujo de permeado contra el gradiente de presión transmembrana, el flujo en el permeado alcanzará asintóticamente un valor límite donde al aumentar la presión aplicada, el aumento del flujo de permeado será mínimo. Por lo tanto, podemos simplificar la ecuación anterior utilizando la siguiente igualdad:

$$\frac{D_{AB}}{\delta} X_C = J_{SS} X \quad (10)$$

Considerando retención total de células en la membrana, la concentración de biomasa en el retenido se calcula a partir de:

$$X = \frac{X_0 V_0}{V_0 - A \int_0^t J dt} \quad (11)$$

Integración del Modelo: Acumulación de Biomasa en Modo Perfusivo. Partiendo de las expresiones derivadas de la teoría de filtración y utilizando los parámetros obtenidos de los experimentos de diafiltración y concentración de soluciones modelos, se obtuvo el modelo del funcionamiento del sistema de microfiltración en modo perfusivo.

El sistema perfusivo se desarrolla mediante una alimentación exponencial de medio, de tal manera que para mantener el volumen de operación constante en el biorreactor, el flujo de permeado debe ser igual al flujo de alimentación. El modelo de microfiltración fue acoplado al de crecimiento celular utilizando esta restricción de flujo.

Para describir el comportamiento de la formación de torta o cambio de biomasa en la membrana en un cultivo perfusivo se utilizan dos ecuaciones. La primera es la del cambio de flux de permeado en el tiempo ($F = F_0 e^{\mu t}$) que se obtiene a partir del flujo de alimentación de medio fresco. Esta expresión se substituye en la Ecuación 7. La ecuación resultante fue resuelta mediante la función solver de EXCEL.

El algoritmo empleado consistió en calcular la masa retenida en la membrana a cada tiempo experimental, minimizando el cuadrado de la diferencia entre el gradiente de presión transmembrana experimental y el calculado.

3.5.2 Cinéticas de Crecimiento Celular, Consumo de Sustrato y Formación de Producto

La teoría básica de bioprocesos está bien documentada en la literatura (Shuler y Kargi, 1992; Hernandez *et al.*, 2009). En la Figura 12 se presenta un esquema del sistema experimental que comprende el biorreactor adaptado al módulo de microfiltración.

Durante la operación se alimenta al biorreactor una corriente (F) que contiene la solución de medio con el nutriente limitante (glicerol) a una concentración de entrada (S_{0p}). Durante la proceso se propagan células de *E. coli* en el interior del biorreactor que se describe por una cinética de Monod representada por la Ecuación 12. Continuamente se extrae una corriente del interior del biorreactor que se hace pasar por un módulo de microfiltración con el propósito de retener las células y eliminar el medio agotado. Opcionalmente se puede recircular parte del permeado del módulo.

$$\mu^* = \frac{\mu_{max}S}{K_S + S} \quad (12)$$

El balance de masa de células en el biorreactor está dado por:

$$V \frac{dX}{dt} = FX_0 + \alpha^*CFX - (1 + \alpha^*)FX + \mu^*XV \quad (13)$$

El balance de sustrato en el biorreactor está representado por:

$$V \frac{dS}{dt} = FS_f + \alpha^*FS - (1 + \alpha^*)FS - V \left(\frac{\mu^*X}{Y_{X/S}} \right) \quad (14)$$

Etapas de Crecimiento por Lote. Durante la primera etapa del crecimiento en el biorreactor tendrá un arreglo de lote, por lo que no habrá alimentación ni perfusión ($X_0 = \alpha^* = 0$). El balance de biomasa en el biorreactor se resume a:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{Lote}X \quad (15)$$

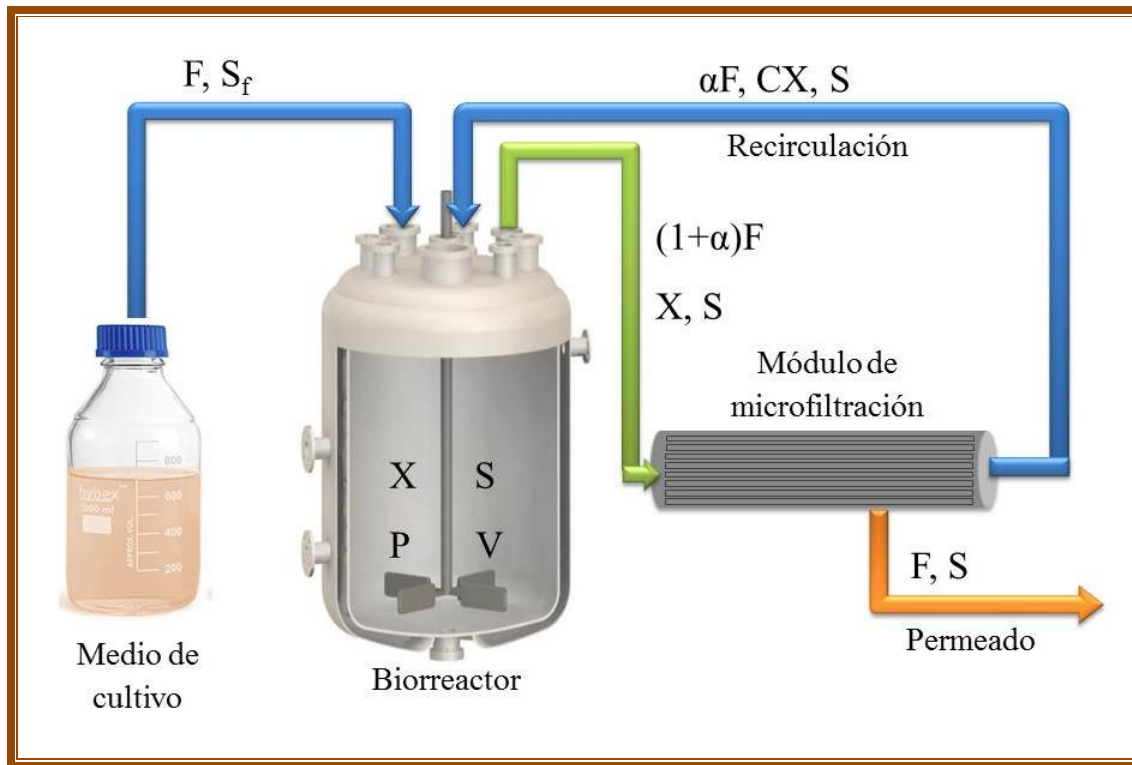


Figura 12. Esquema del sistema de cultivo en perfusión.

El consumo de sustrato puede ser representado por la siguiente ecuación particular:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_{Lote}X}{Y_{X/S}} \quad (16)$$

La formación de producto puede expresarse como

$$\frac{dP}{dt} = \mu_{Lote}XY_{P/X} \quad (17)$$

Etapas de Crecimiento por Lote Alimentado con Perfusión. Antes de concluir la etapa de crecimiento por lote, se iniciara la perfusión utilizando un flujo de permeado F. Se considera que la concentración inicial de biomasa en la alimentación es cero ($X_0 = 0$), que todas las células se retienen y que el medio permea, obtenemos la siguiente ecuación particular para el balance de biomasa en el biorreactor:

$$\frac{dX}{dt} = \left((\alpha^*C - \alpha^* - 1)D + \mu_{Perf} \right) X \quad (18)$$

Al realizar el balance de biomasa en el módulo de microfiltración asumimos que la biomasa en el módulo es mucho menor que la biomasa en el biorreactor, obteniendo el siguiente balance:

$$(1 + \alpha^*)FX = \alpha^*CFX \quad (19)$$

A partir de este balance obtenemos el valor del factor de concentración (C):

$$C = \frac{(1 + \alpha^*)}{\alpha^*} \quad (20)$$

Y combinando estas dos ecuaciones obtenemos el balance de biomasa en el biorreactor:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{Perf}X \quad (21)$$

El balance de sustrato se realiza tomando en cuenta que la alimentación se realiza exponencialmente para lograr que todo el sustrato sea consumido ($dS/dt = 0$) y mantener μ constante:

$$\frac{dX}{dt} = Y_{X/S}D(S_f - S) \quad (22)$$

$$\mu_{Perf}X = Y_{X/S}D(S_f - S) \quad (23)$$

Para calcular el flujo de alimentación inicial, se consideran las condiciones del cultivo en lote al inicio de la alimentación:

$$F_0 = \frac{\mu_{Lote}XV}{(S_f - S)Y_{X/S}} \quad (24)$$

La velocidad de alimentación incrementa exponencialmente de acuerdo a la velocidad de crecimiento específica deseada para la perfusión.

$$F = F_0 e^{\mu_{Perf}(t-t_0)} \quad (25)$$

Por lo que el balance de biomasa en el biorreactor para el arreglo de experimentación exponencial puede ser expresado de la siguiente manera:

$$\frac{dX}{dt} = [Y_{X/S}D(S_0 - S)] \left\{ \frac{F_0 e^{\mu_p(t-t_0)}}{V} \right\} \quad (26)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_0 X F_0 e^{\mu_p(t-t_0)} \quad (27)$$

El consumo de sustrato y la formación de producto durante un cultivo perfusivo puede ser expresado por:

$$\frac{dS}{dt} = D(S_{0P} - S) - \frac{\mu_{Perf}X}{Y_{X/S}} \quad (28)$$

$$\frac{dP}{dt} = \mu_{Perf}X Y_{P/X} \quad (29)$$

3.5.3 Análisis Económico del Proceso

Se realizó un estudio económico de la fermentación perfusiva tomando en cuenta los costos relevantes del sistema. Se consideró la producción marginal de plásmido en el cultivo perfusivo, es decir, la producción total de plásmido en el cultivo perfusivo menos

la producción de un cultivo por lote. El precio de venta del plásmido se fijó en USD\$10.00 por miligramo de plásmido (Heinzle, 2006). Se estimó la inversión adicional requerida respecto a una fermentación por lote y los costos de operación que incluyen las membranas y los transductores de presión.

Si consideró que una fermentación toma aproximadamente 20 horas de trabajo, a esto debemos añadir el tiempo de preparación de medios, y esterilización de equipo. Por lo que para efectos del análisis económico, se consideró que la producción de plásmido se llevaría a cabo a nivel fermentador, y se consideró una corrida por semana.

Los índices económicos calculados en el presente trabajo fueron el retorno de inversión, tasa de descuento, valor presente neto, y periodo de retorno (Tejeda *et al.*, 2011).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de la Resistencia de la Membrana

La resistencia de la membrana de microfiltración fue obtenida mediante experimentos de diafiltración hidráulica.

Tomando en cuenta la Ecuación 3 y considerando que en este experimento no existe resistencia de la torta, la ecuación se simplifica a:

$$J = \frac{1}{\eta R_m} \Delta PTM \quad (30)$$

La Figura 13 muestra los datos experimentales obtenidos. La línea continua representa el ajuste por regresión lineal del modelo dado por la Ecuación 30 a estos datos. La resistencia de la membrana de $1.0 \times 10^{12} \text{ m}^{-1}$ fue obtenida a partir de la pendiente de la recta. Esta resistencia permite verificar la adecuada limpieza de la membrana cuando va a reusarse.

4.2 Microfiltración en Modo Diafiltración y Concentración con Soluciones Modelo

Diafiltración con Soluciones Modelos. Para la determinación de la variación de la resistencia de la torta de *E. coli* se realizaron experimentos de diafiltración con soluciones modelo a diferentes presiones transmembrana y empleando diferentes velocidades de flujo cruzado. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 14. Puede observarse que el flux presenta un comportamiento hiperbólico. Además, para una caída de presión transmembrana dada, el flux de permeado aumenta conforme aumente la velocidad de flujo tangencial.

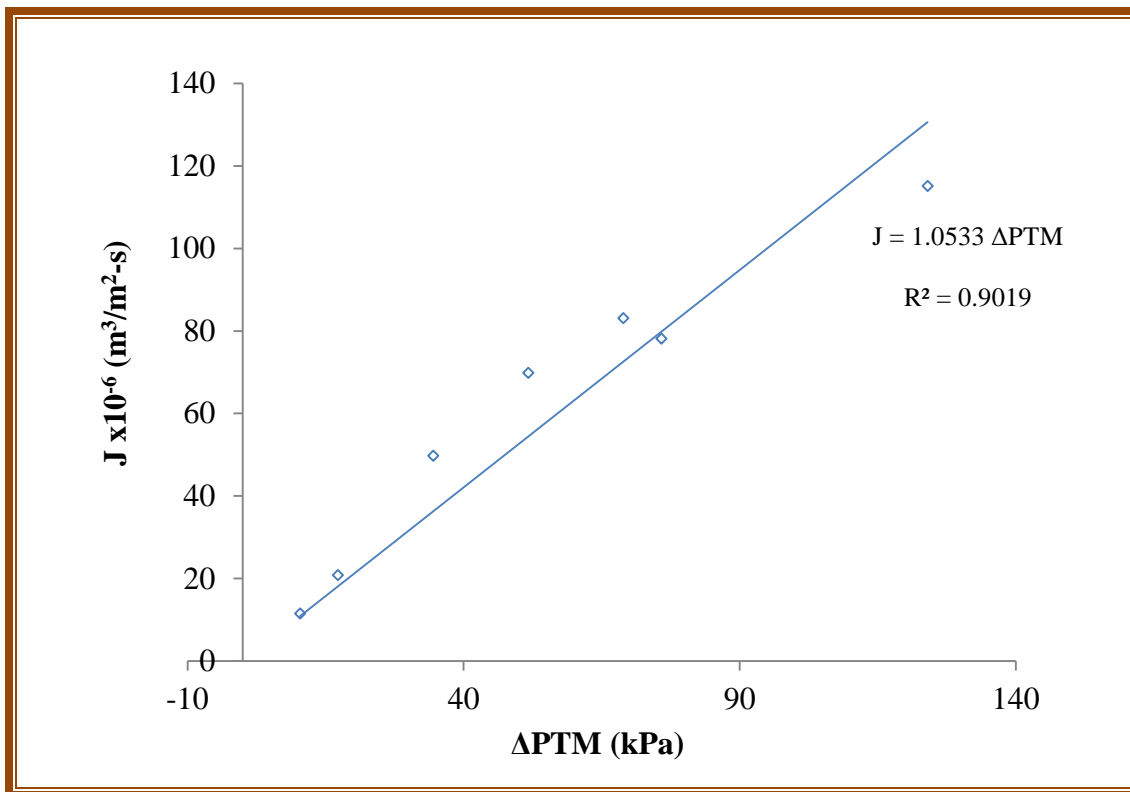


Figura 13. Experimento de microfiltración hidráulica con membrana de 500kDa para determinación de la resistencia de la membrana utilizando un flujo cruzado de 50 mL/min.

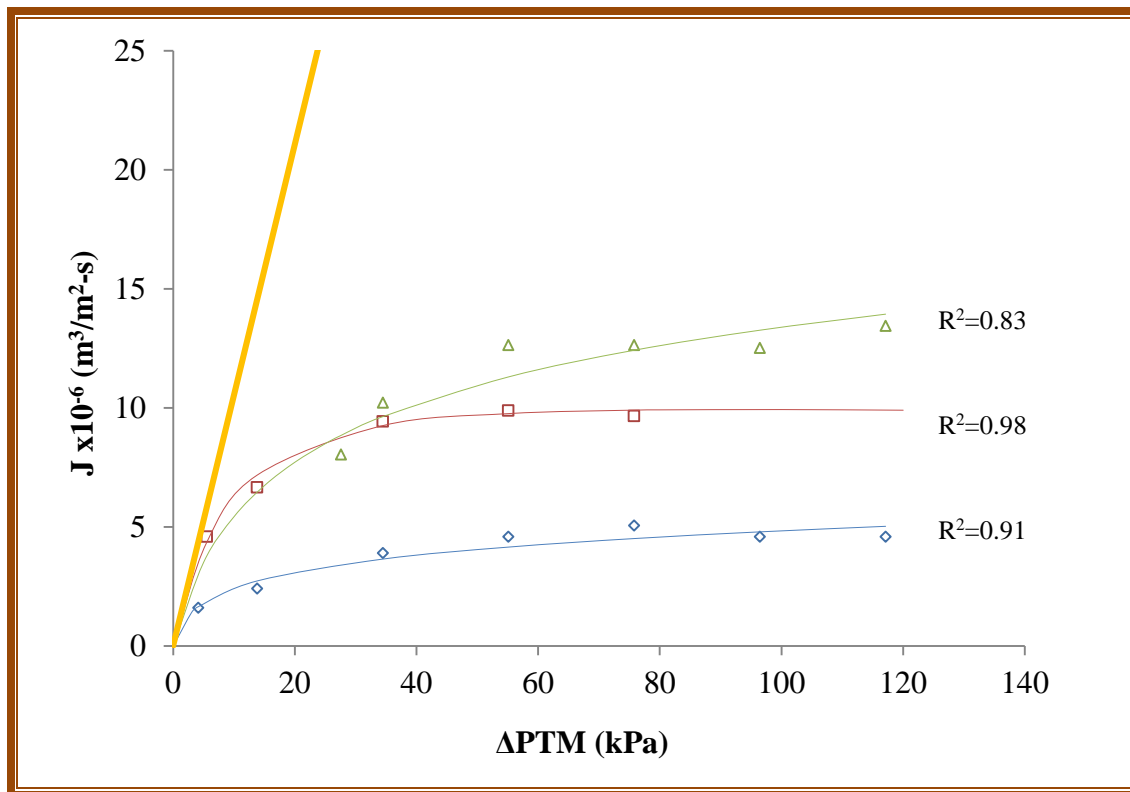


Figura 14. Experimentos de diafiltración de biomasa con concentración celular de 18.15 g/L y flujo cruzado de 100 mL/min (◇); de 150 mL/min (□) y 200 mL/min (△). Agua (—). Las líneas solidas representan el modelo ajustado.

Utilizando la forma de línea recta sugerida por la Ecuación 7b se obtienen los parámetros de índice de compresibilidad y el valor del flux de permeado máximo para cada uno de los flujos cruzados utilizados, mediante la función Solver del programa Excel. Estos valores se utilizan para obtener el parámetro α' . La Tabla 5 muestra un resumen de los parámetros obtenidos en estos experimentos. Se debe considerar que estos resultados son válidos únicamente para la concentración de 18.15 g/L utilizada en este experimento.

Concentración con Soluciones Modelo. Para estimar el valor de la resistencia específica de la torta celular se realizaron experimentos de concentración de biomasa. Se calculó la masa de la torta formada en la membrana, mediante un balance de masa utilizando los valores de concentración y volumen iniciales y los valores de concentración y volumen en el tanque obtenidos en el transcurso del experimento.

Los datos de masa, concentración y flux de permeado se utilizaron para calcular la resistencia específica utilizando el modelo integrado por las ecuaciones 7, 10 y 11. Este sistema fue resuelto utilizando como factor de ajuste la resistencia específica de la membrana en una plataforma MATLAB. En la Figura 15 se muestran los datos experimentales de la variación del flux de permeado y la concentración celular con el tiempo y las líneas continuas de los modelos obtenidos con MATLAB utilizando una resistencia específica de la membrana de $11.7 \times 10^{12} \text{ m kg}^{-1}$. Este valor se ajustó al ejecutar el programa de MATLAB con diferentes valores de resistencia específica, se calculó la suma del cuadrado de los errores de las tres variables y se utilizó el valor con menos error.

Tabla 5. Resumen de parámetros obtenidos mediante experimentos de diafiltración de biomasa.

Flujo Cruzado (mL/min)	100	150	200
Factor de compresibilidad (n)	0.788	1.104	0.841
$\frac{D_{AB}}{\delta} X_C = J_{SS} X$ (Eq. 7)	8.34×10^{-5}	1.71×10^{-4}	2.29×10^{-4}
$Z = \frac{m}{A} \alpha'$ (Eq. 9b)	9.61×10^{12}	3.18×10^{12}	3.02×10^{12}
Resistencia de la torta (R_c)	$9.61 \times 10^{12} \left(\frac{\Delta PTM}{\Delta PTM_R} \right)^{0.788}$	$3.18 \times 10^{12} \left(\frac{\Delta PTM}{\Delta PTM_R} \right)^{1.104}$	$3.02 \times 10^{12} \left(\frac{\Delta PTM}{\Delta PTM_R} \right)^{0.841}$

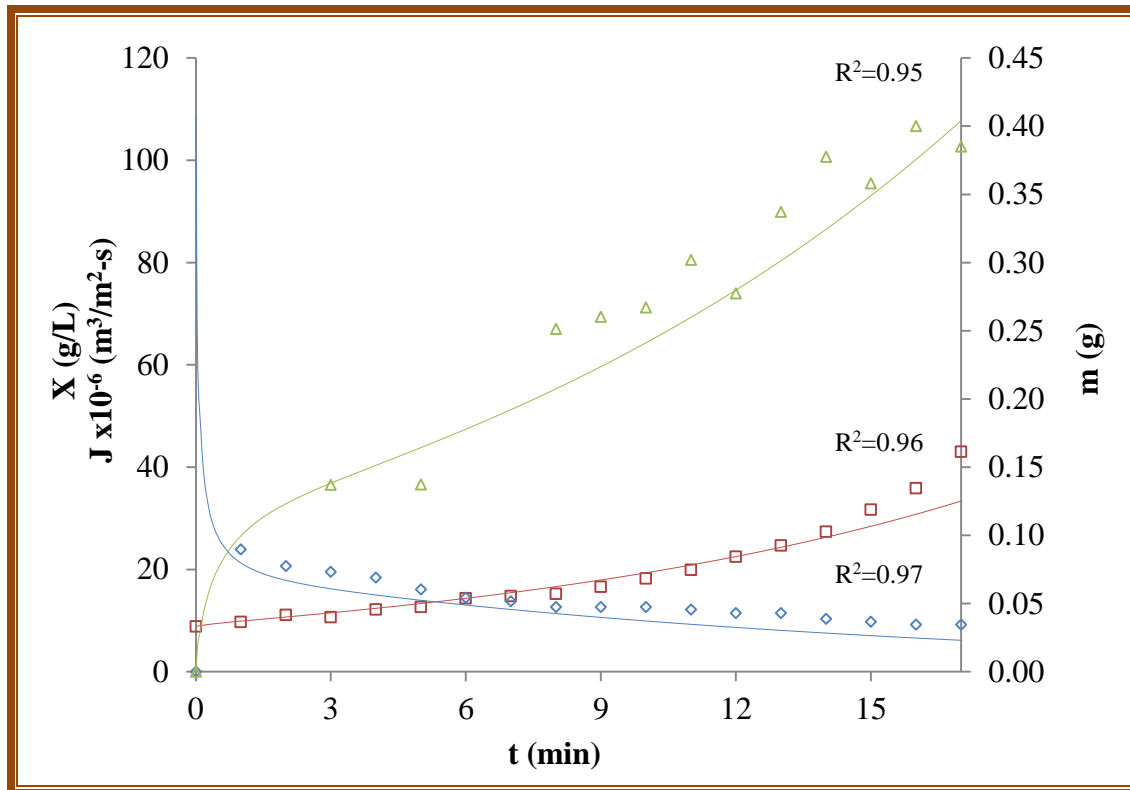


Figura 15. Gráfica del cambio del flux de permeado (◇), la concentración celular (□) y la masa de torta en la membrana (Δ) en el tiempo durante una concentración a presión transmembrana constante de 34.5kPa. Las líneas solidas representan el modelo obtenido en la plataforma MATLAB.

4.3 Cinéticas de Crecimiento Celular, Consumo de Sustrato y Formación de Producto

Las velocidad específica de crecimiento máximo en los diferentes cultivos utilizando una concentración inicial de glicerol de $S_0 = 13 \text{ g/L}$ varió entre 0.33 h^{-1} de un cultivo a 30°C y 0.69 h^{-1} en un cultivo creciendo a 37°C . Carnes *et al.*, 2006 reportan una velocidad específica de crecimiento máxima para un cultivo de *E. coli* DH5 α a 30°C de 0.26 h^{-1} y, Bohle en 2011 reporta 0.65 h^{-1} para un cultivo a 37°C .

Cultivo por Lote a Nivel Fermentador. Los datos experimentales de concentración celular, de sustrato y de plásmido obtenidos en el cultivo por lote a nivel fermentador se muestran en la Figura 16. Las líneas continuas representan el modelo dado por las ecuaciones 12, 15, 16 y 17.

Los parámetros de ajuste empleados en el modelo fueron $\mu_{\text{máx}} = 0.23 \text{ h}^{-1}$, $Y_{X/S} = 0.4 \text{ g/g}$ y $Y_{P/X} = 5.31 \text{ mg/g}$. Estos valores son típicos de cultivos por lotes para la producción de plásmidos en *E. coli* (Paalme *et al.*, 1990; Silva, 2009).

Cultivo Perfusivo a Nivel Fermentador. Los datos experimentales de concentración celular, de sustrato y de plásmido obtenidos en el cultivo perfusivo a nivel fermentador, tanto para la fase por lote como para la fase perfusiva se muestran en la Figura 17. En el experimento se alimentó medio de cultivo para obtener una velocidad de crecimiento de 0.2 h^{-1} durante la etapa perfusiva del cultivo, es decir, a partir de la cuarta hora de cultivo.

Las líneas continuas representan el modelo dado por las ecuaciones 12, 15, 16 y 17 para la fase lote y por las ecuaciones 27, 28 y 29 de la fase perfusiva. Los parámetros de ajuste empleados en el modelo para la fase por lotes fueron $\mu_{\text{máx}} = 0.41 \text{ h}^{-1}$, $Y_{X/S} = 0.51 \text{ g/g}$ y $Y_{P/X} = 1.76 \text{ mg/g}$. En el caso de la fase perfusiva los parámetros fueron $\mu_{\text{Perf}} = 0.2 \text{ h}^{-1}$, $Y_{X/S} = 0.51 \text{ g/g}$ y $Y_{P/X} = 3.5 \text{ mg/g}$.

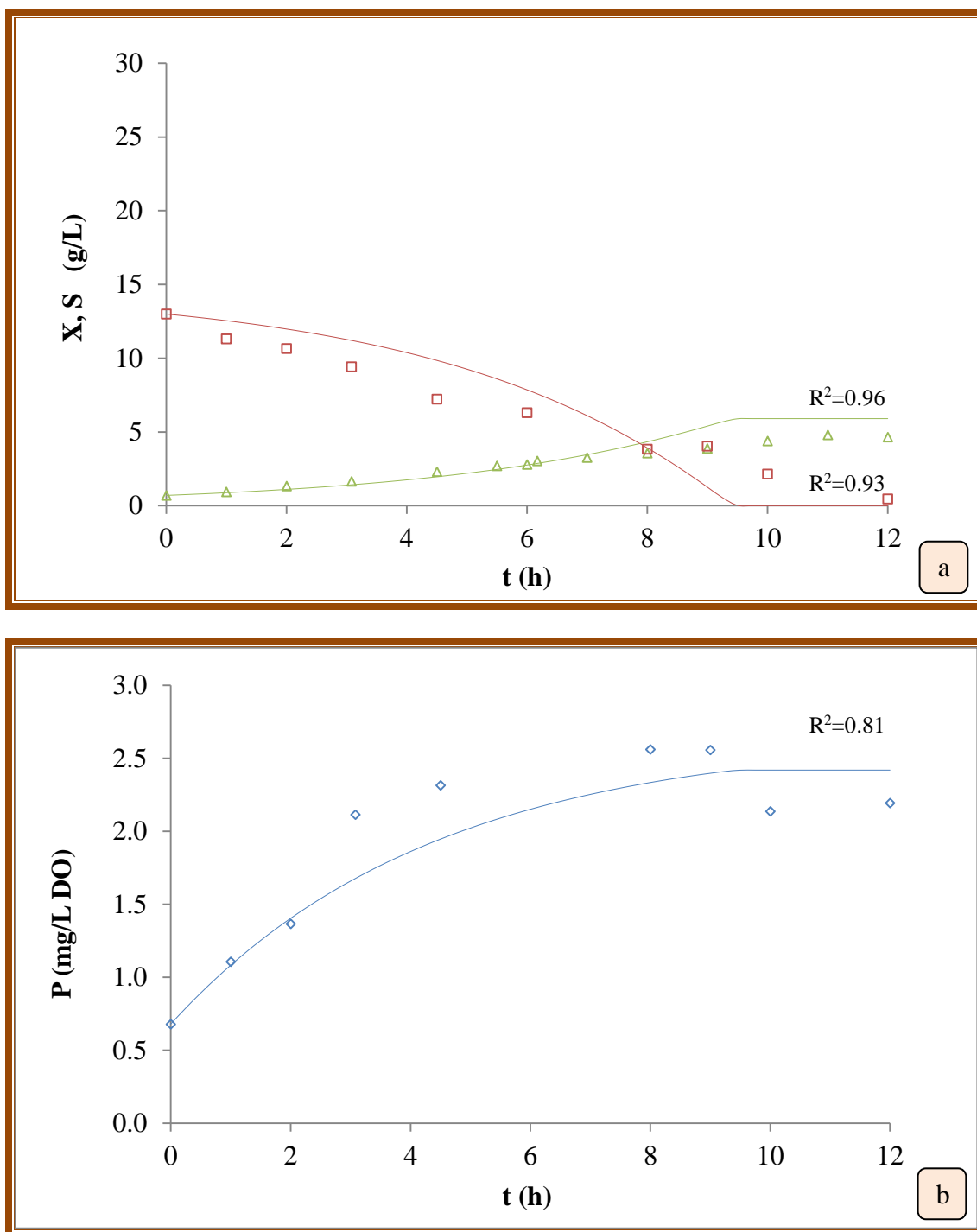


Figura 16. (a) Crecimiento celular (Δ), consumo de sustrato (\square) y (b) producción de plásmido (\diamond) en un cultivo a nivel fermentador en modo de lote. Las líneas solidas representan el modelo obtenido con la plataforma MATLAB .

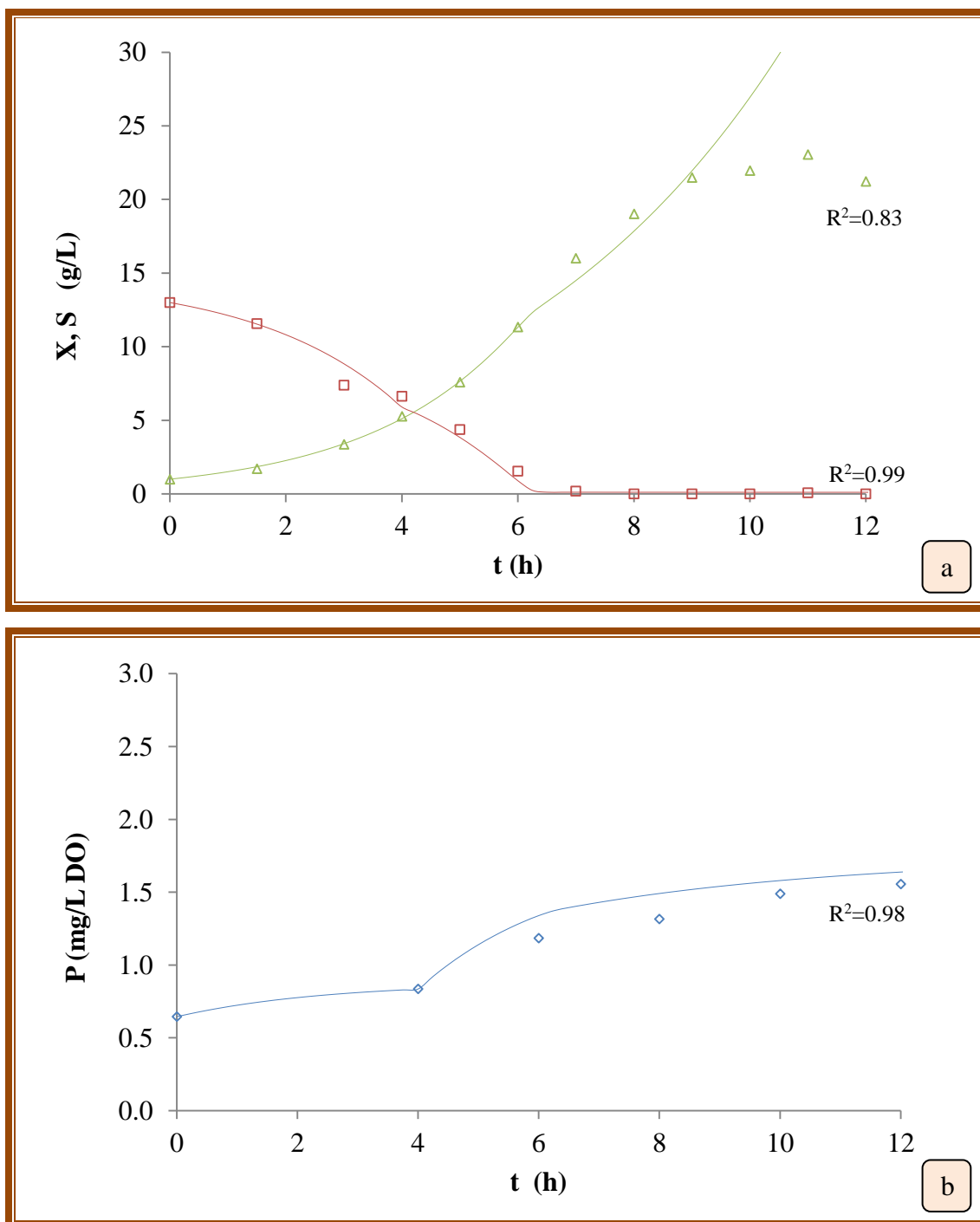


Figura 17. (a) Crecimiento celular (Δ), consumo de sustrato (\square) y (b) producción de plásmido (\diamond) en cultivo perfusivo con una velocidad de crecimiento de 0.2 h^{-1} . Las líneas solidas representan el modelo obtenido por la plataforma MATLAB.

Estos resultados muestran un muy buen ajuste durante las primeras 9 horas de crecimiento, donde crece a la velocidad de crecimiento máxima de $0.4 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ por 7 horas, para después comenzar a decaer hasta 0.02 h^{-1} a entrar a estado estacionario a la décima hora. La Tabla 6 muestra los parámetros utilizados para realizar las simulaciones en la plataforma MATLAB.

En cuanto a la concentración de glicerol en la fase perfusiva, este se consume por completo permitiendo a las células consumir el glicerol que se va alimentando, esto según el diseño del experimento. La Figura 18 muestra la coloración resultante del procedimiento de determinación de glicerol para las muestras de perfusión.

Además del buen ajuste en la producción de producto, en el análisis del plásmido producido durante este cultivo, se obtuvieron rangos de pureza mediante la relación DO260/280 con valores entre 1.871 y 1.955 con una desviación estándar de 0.038. El gel de electroforesis realizado a partir de estas muestras se muestra en la Figura 19. Se puede observar que el plásmido es puro y del tamaño e isoforma deseado.

4.4 Integridad Celular

Durante los estudios de citometría de flujo se realizaron controles de células vivas y células muertas para después compararlos con las muestras tomadas durante diferentes tiempos de cultivo perfusivo. Los resultados de la citometría de estos controles se muestran en la Figura 20. El eje y es una medida de la complejidad de las partículas y el eje x de sus tamaño. Se puede observar en la figura que existen diferencias de tamaño y complejidad entre los controles.

Las células vivas caen dentro de una región muy limitada, sugiriendo uniformidad de tamaño y complejidad. Las células muertas muestran una mayor dispersión, desplazadas hacia una mayor complejidad y tamaño, este comportamiento se atribuye a que puede haber conglomerados de células y detritos en las muestras.

Tabla 6. Parámetros utilizados en las simulaciones realizadas en la plataforma MATLAB

		Lote		Perfusión	
		Fase lote			
X_0	0.70	$g L^{-1}$	1.00	$g L^{-1}$	
S_0	13.00	$g L^{-1}$	13.00	$g L^{-1}$	
P_0	1.36	$mg L^{-1}$	1.29	$mg L^{-1}$	
V_0	1.00	L	1.00	L	
K_s	0.10	$g L^{-1}$	0.10	$g L^{-1}$	
$\mu_{m\acute{a}x}$	0.23	h^{-1}	0.41	h^{-1}	
$Y_{X/S}$	0.40	$g_x g_s^{-1}$	0.51	$g_x g_s^{-1}$	
$Y_{P/XLote}$	5.31	mg / g	1.76	mg / g	
t_{Lote}			4.00	h	
		Fase perfusiva			
X_{0Perf}			5.27	$g L^{-1}$	
S_{0Perf}			6.64	$g L^{-1}$	
S_F			18.00	$g L^{-1}$	
μ_{Perf}			0.20	h^{-1}	
$Y_{P/XPerf}$			3.50	mg / g	

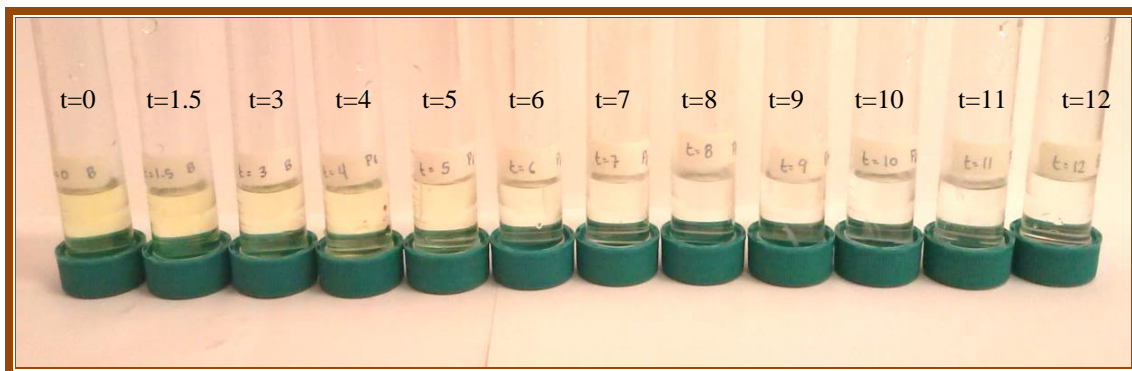


Figura 18. Determinación de contenido de glicerol en muestras de perfusión a diferentes tiempos.

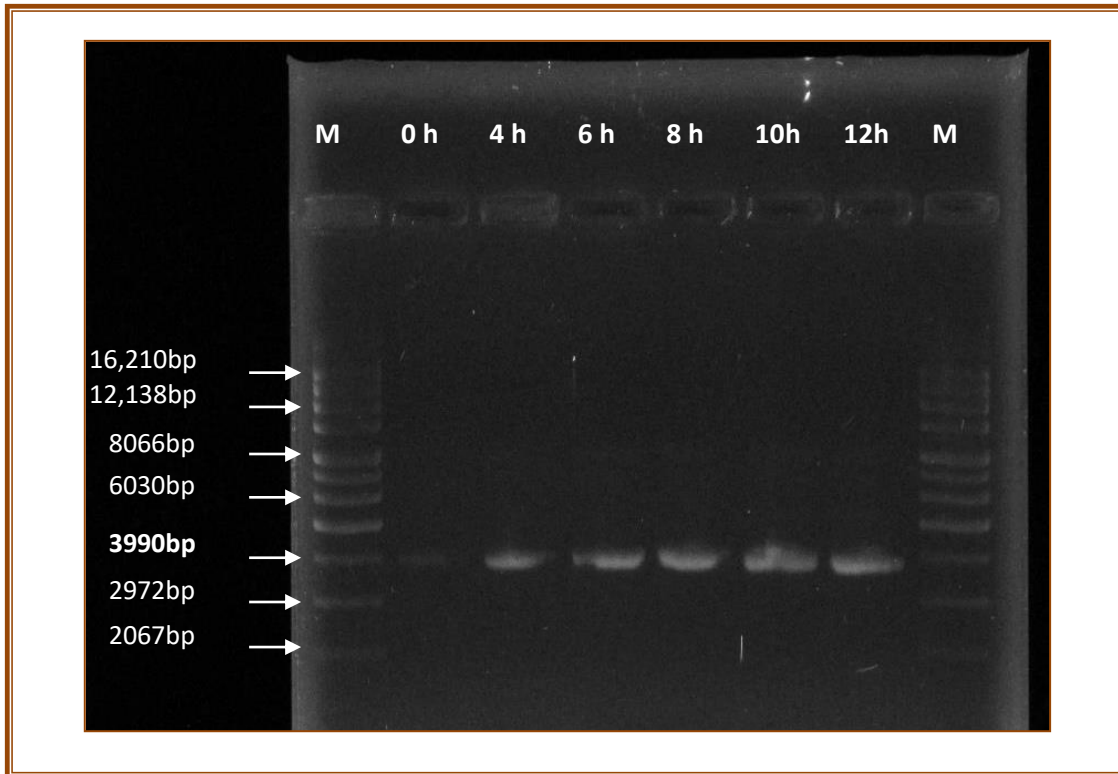


Figura 19. Gel de electroforesis mostrando la pureza del plásmido producido a diferentes tiempos durante la perfusión. El carril 1 y 8 corresponden al marcador de peso molecular, los carriles del 2 al 7 muestran las bandas de pDNA de las muestras tomadas a los tiempos de fermentación mostrados en la parte superior del gel.

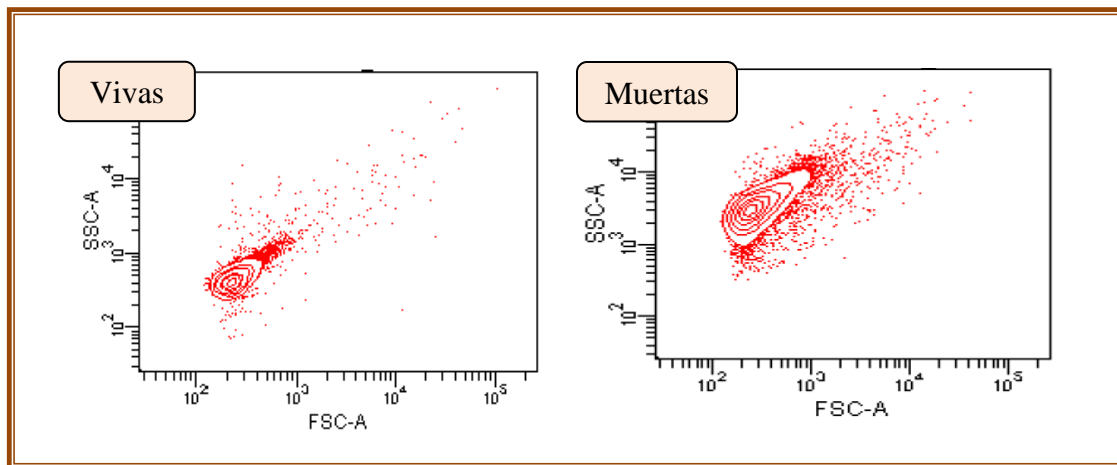


Figura 20. Gráficas obtenidas por el citómetro de flujo para los controles de células vivas (izquierda) y muertas (derecha).

La Figura 21 muestra los resultados citométricos de las muestras tomadas durante la fermentación. La etapa perfusiva se inició a partir de la tercera hora del cultivo. Podemos apreciar en estas gráficas que durante la etapa perfusiva (3-7.5 h) las células muestran un ligero incremento en su complejidad, lo cual sugiere que se encuentran en una diferente etapa en el ciclo celular, a un real incremento en complejidad que se puede atribuir a la replicación de plásmido o a que pueden llegar a filamentarse, es decir, la célula continúa su crecimiento sin dividirse. Esta filamentación se puede dar debido a la temperatura de crecimiento (Carnes *et al*, 2006) o debido a la carga metabólica impuesta por la replicación del plásmido (Silva, 2009).

4.5 Simulación de la Microfiltración

Utilizando los parámetros obtenidos de los experimentos de diafiltración y concentración de soluciones modelo, se obtuvo el modelo de funcionamiento del sistema de microfiltración. Estos parámetros se encuentran resumidos en la Tabla 7, donde también se encuentra una comparación de estos parámetros con los reportados en la bibliografía.

Para predecir la caída de presión transmembrana a través del tiempo, partiendo de la Ecuación 7a, el modelo toma la forma:

$$\Delta PTM = (6.92 \times 10^{-7})(J) \left(1 \times 10^{12} + \left(\frac{m}{0.0145} \right) (11.7 \times 10^{12}) \left(\frac{\Delta PTM}{34.5} \right)^{0.911} \right) \quad (31)$$

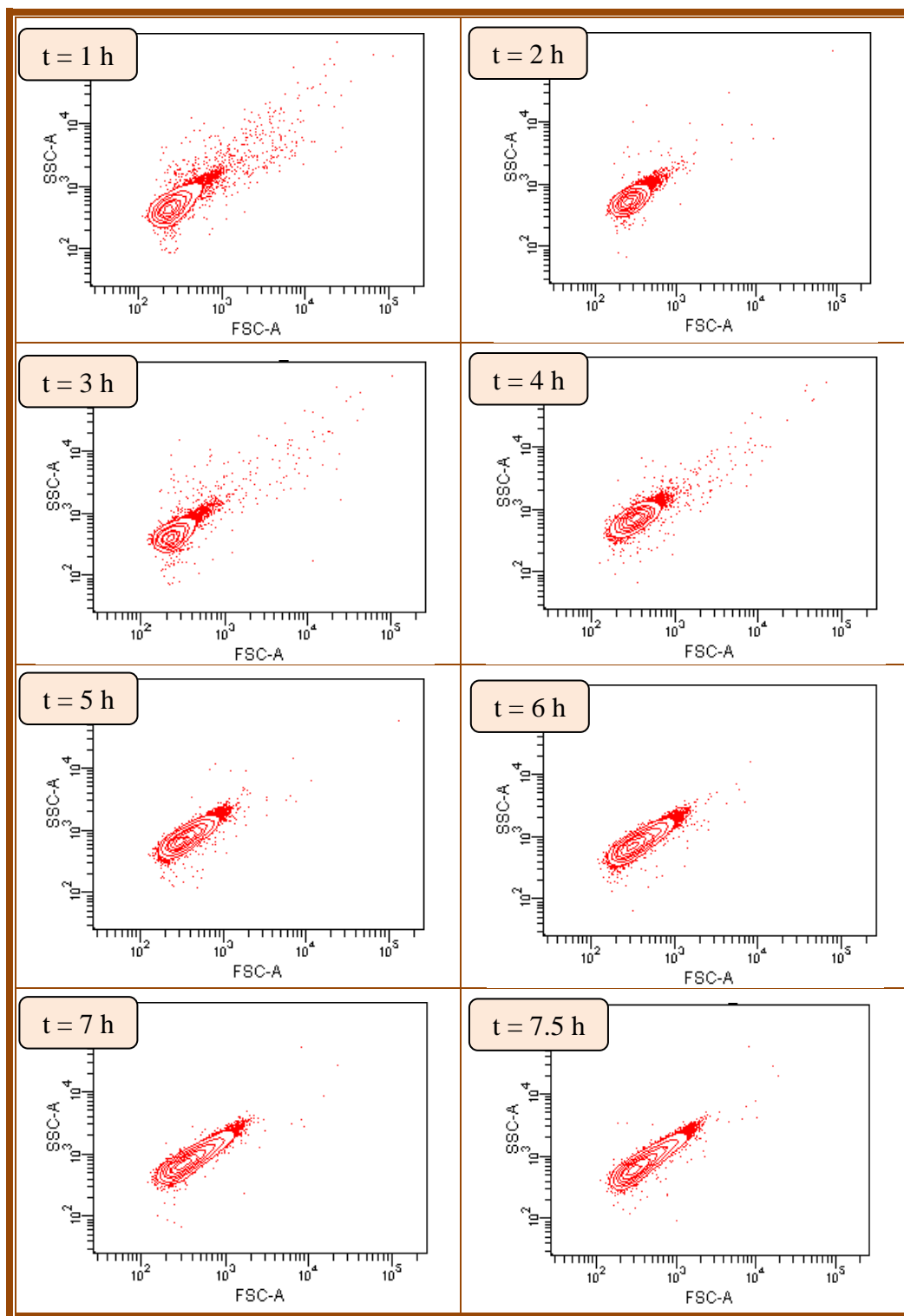


Figura 21. Gráficas obtenidas por el citómetro de flujo para las muestras tomadas a los tiempos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 7.5 horas durante la fermentación.

Tabla 7. Resumen de parámetros obtenidos experimentalmente y comparación con los parámetros de referencia.

	Parámetro		Referencia	
A	0.0145	m ²	0.014	m ²
R _m	1x10 ¹²	m ⁻¹	1.26x10 ¹²	m ⁻¹
η	6.92x10 ⁻⁷	kPa-s	1x10 ⁻⁶	kPa-s
n	0.911		0.5	
α'	11.7x10 ¹²	m kg ⁻¹	10.2x10 ¹²	m kg ⁻¹
ΔPTM _R	34.5	kPa	49	kPa
$\frac{D_{AB}}{\delta} C_w$	8.34x10 ⁻⁵	kg m ⁻² s ⁻¹		

*Fuente: Cuellar *et al*, 2009

Este modelo se acopla al de la cinética de crecimiento mediante la ecuación utilizada para calcular la alimentación de medio durante la perfusión (Ecuación 25), la cual parte de las condiciones iniciales de la etapa perfusiva. El flux de permeado del sistema está dado por la siguiente ecuación:

$$J = 0.011e^{0.20t} \quad (32)$$

Donde t es el tiempo de perfusión en horas.

La ecuación resultante de combinar las Ecuaciones (31) y (32) fue resuelta mediante la función solver de EXCEL, tal y como se describe en la sección de Marco Teórico.

Los resultados de los cálculos de masa acumulada se muestran en la Figura 22. Se observan dos inconsistencias del modelo teórico. La primera es que la cantidad de masa acumulada en la membrana disminuye exponencialmente con el tiempo. La segunda es que los altos valores de masa son imposibles. Este análisis se apoya en los resultados experimentales de masa acumulada obtenidos en los experimentos de microfiltración modo concentración, donde la masa acumulada se incrementa linealmente y es del orden de 0.0004 kg.

Cuellar *et al*, 2009 reportan resultados también irrealistas, en sistemas de microfiltración en membranas con caldos de *E coli*, ellos atribuyen a que su modelo no toma en cuenta la geometría del módulo de membrana y a que la resistencia adicional a la de la membrana no es únicamente la de la torta de biomasa.

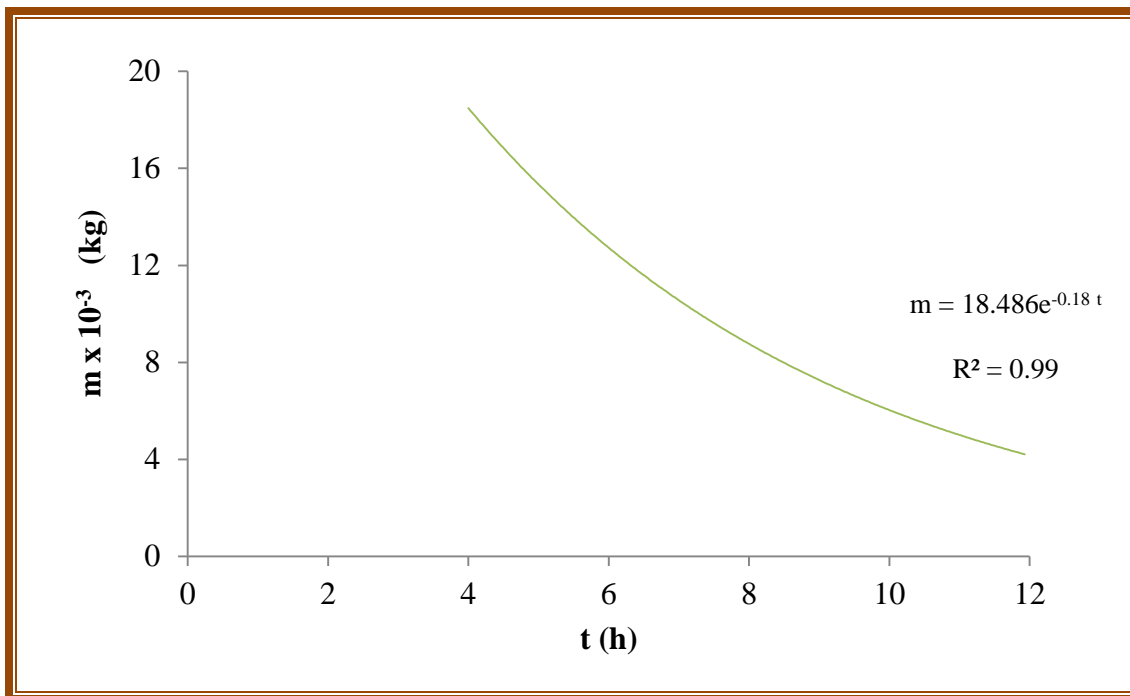


Figura 22. Masa acumulada en la superficie de la membrana calculada de acuerdo al modelo integrado.

4.6 Análisis Económico del Proceso

El análisis económico se realizó considerando solamente los gastos marginales de un sistema perfusivo. Todos los precios se encuentran en dólares americanos. La Tabla 8 muestra las consideraciones generales para el análisis, donde se consideró que en una perfusión se utilizan 3 litros de medio adicionales a una fermentación en lote, también que una membrana se puede utilizar para 2 perfusiones y que se requiere cambiar un transductor cada 10 fermentaciones. La tasa de interés utilizada fue del 29% y una depreciación del equipo de 5 años según la Ley del Impuesto sobre la Renta del 2013.

Entre los gastos marginales que se realizan en una perfusión incluimos la diferencia en la producción como ingresos y en el costo de inversión se tomó en cuenta el equipo, los ingresos anuales, costo de inversión y los costos de operación directos se encuentran en la Tabla 9.

La evaluación económica se muestra en la Tabla 10, podemos ver que el flujo de efectivo anual es de \$12,453 dólares, lo que nos lleva a un retorno sobre la inversión de 74% y un periodo de retorno de 1.35 años.

Estos resultados indican la factibilidad del proceso. Aunque esta evaluación se realiza a nivel laboratorio y solamente sobre la etapa de fermentación, se considera que al momento de su escalamiento, el proceso mantendrá su viabilidad. Esto coincide con los autores que mencionan que la producción de cualquier vacuna de ADNp podrá lograrse de forma estandarizada, masiva y más económica que las vacunas de primera y segunda generación (Gonzalez-Valdez, 2013).

Tabla 8. Bases para la evaluación económica del sistema de microfiltración.

	Costo individual	Consumo anual
A. Medio de cultivo	\$8	150 L
B. Módulos de microfiltración	\$187	50 módulos
C. Transductores de presión	\$60	5 piezas
Tasa de ISR	29%	
Depreciación	5 años	

Tabla 9. Análisis económico del sistema perfusivo tomando en cuenta gastos y producción marginal a partir de la perfusión en lote.

Ingresos Anuales	
Producción	Concentración 44.7 mg/ciclo
	Ciclos 50 por año
Mercado	Precio (USD) \$ 10 \$/mg
Total	\$ 22,330.00

Costos de Inversión	
Equipo	Costo (USD)
KrosFlo Research Ili TFF System	\$9,100
Válvula Automática de Contrapresión	\$3,460
Bomba Masterflex L/S	\$3,800
Cabezal Masterflex Easy-load3	\$430
Total	\$16,790

Costos de Operación Directos	Costo (USD)
A. Medio de cultivo	\$1,188
B. Módulos de microfiltración	\$4,675
C. Transductores de presión	\$300
Costos de Operación Fijos	
Depreciación	\$3,358
Total	\$9,521

Tabla 10. Cálculos y evaluación económica del sistema perfusivo

Flujo de Efectivo	
Ingreso anual	\$22,330
- Costo de operación	\$9,521
Utilidad Bruta	\$12,809
- ISR (29 %)	\$3,715
Utilidad Neta	\$9,095
+ Depreciación	\$3,358
Flujo de efectivo anual	\$12,453
Evaluación económica	
Retorno sobre la inversión (ROI)	74%
Periodo de Retorno	1.35 años
Tasa interna de rendimiento (TIR)	69%
TREMA	30%
Valor presente neto (VPN)	\$30,330

4.7 Espacio de Diseño

El espacio de diseño del sistema se fue estableciendo con base a los resultados experimentales obtenidos y a las observaciones recabadas. Particularmente, se enfocó el análisis en la estrategia de alimentación del medio de cultivo en la etapa perfusiva.

4.7.1 Tasas de Alimentación

Análisis de los efectos del flujo. Los resultados del experimento de concentración de biomasa realizado a un flujo de permeado constante de 3.3 mL/min (flux de $3.79 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{m}^2\text{-s}$) se presentan en la Figura 23. Se observa en la figura que conforme aumenta la concentración de biomasa en el lote, el gradiente de presión transmembrana aumenta. Al final del experimento la concentración celular fue ligeramente mayor a los 40 g/L y la presión transmembrana fue menor a 25 kPa. Estos resultados muestran que a bajos flux de permeado la membrana opera adecuadamente, incluso con altas concentraciones.

La Figura 24 muestra el flux de permeado, la presión transmembrana y la concentración celular del primer experimento de perfusión con alimentación exponencial de medio enriquecido con glicerol.

El sistema mostró un poco de inestabilidad alrededor de la hora 6 de cultivo, a este tiempo la presión transmembrana alcanzó 60 kPa, con un flujo de permeado de 4 mL/min (flux de $4.61 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{m}^2\text{-s}$) y una concentración celular de 11.3 g/L. Posteriormente, se experimentó otro problema de taponamiento a las 12 horas antes de finalizar el cultivo, donde la concentración celular fue de 21.23 g/L y la presión transmembrana alcanzo los 98 kPa.

En dos cultivos perfusivos siguientes, se observó que conforme el flux de permeado y la concentración celular aumentan con el tiempo el problema de taponamiento empeora, aumentando la presión transmembrana. Se requirió realizar retroflujos durante los cultivos para contrarrestar estos problemas. Estos cambios deben ser evitados ya afectan los componentes del sistema como transductores y membranas.

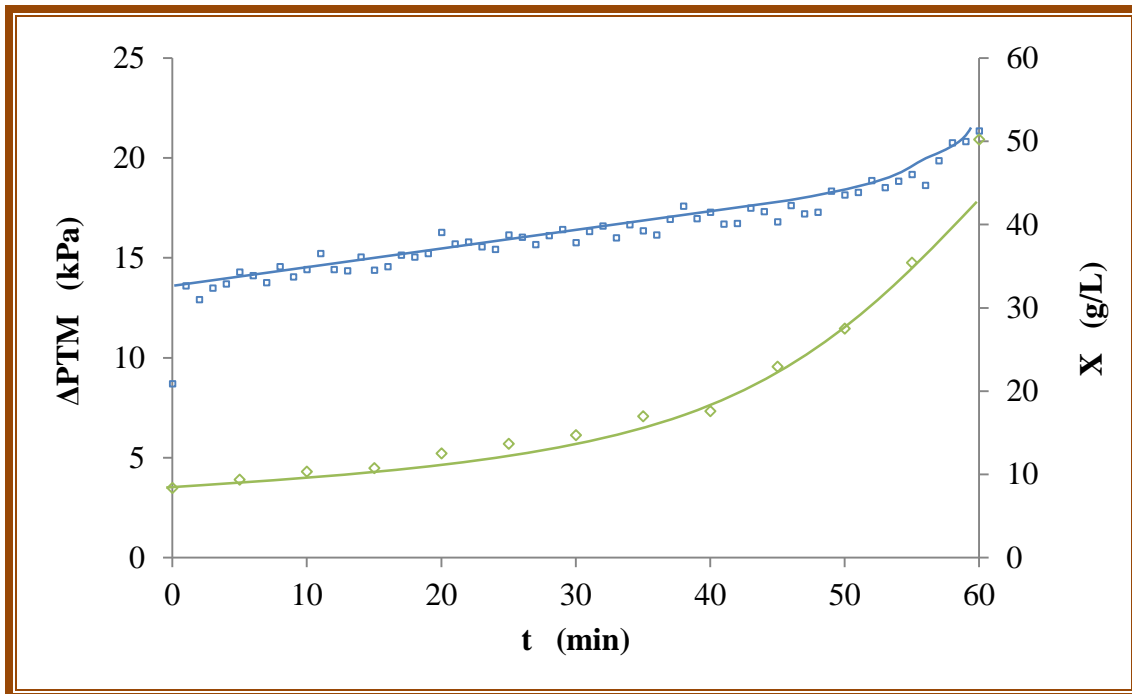


Figura 23. Gráfica del cambio de la presión transmembrana (\square) y la concentración celular (\diamond) en el tiempo durante una concentración a flujo constante de $3.79 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{m}^2\text{s}$.

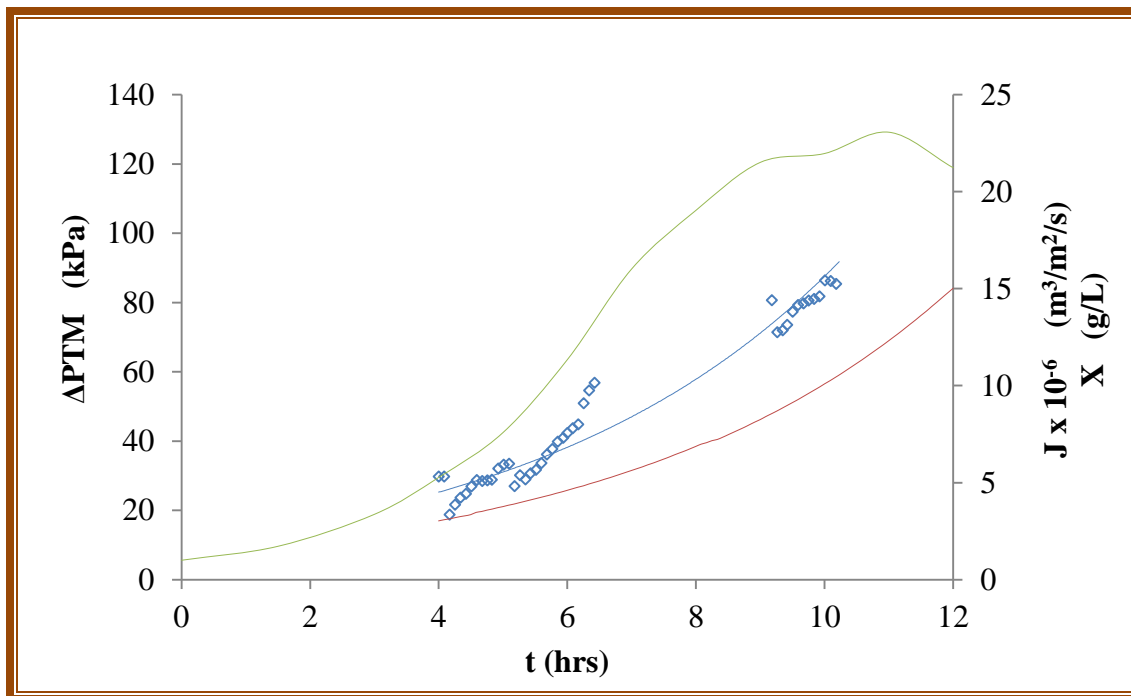


Figura 24. Cambio de presión transmembrana experimental (\diamond) y su con línea de ajuste (—), flux de permeado (—) y concentración celular (—) durante una perfusión.

El retroflujo ayuda a remover una porción de la torta formada en la membrana, manifestándose con grandes agregados celulares en la salida del retenido. Si bien la presión transmembrana baja a valores adecuados nuevamente, a partir del primer retroflujo, conforme el flux de permeado y la concentración celular aumenta durante el cultivo, también se incrementa la frecuencia de la necesidad de retroflujo.

Estrategias. La estrategia seguida para evitar el taponamiento de las membranas fue aumentar la concentración del medio de alimentación. En segundo experimento se inició con una concentración de glicerol de 25 g/L. A las 6.8 horas de cultivo de perfusión se aumentó la concentración de glicerol a la entrada a 50 g/L. La Figura 25a muestra el cambio de presión transmembrana, el flux de permeado y la concentración celular con el tiempo en este experimento. El cambio en la alimentación provocó que la membrana regresara a un flux de permeado menor sin afectar las necesidades de glicerol del cultivo. La necesidad de retroflujo disminuyó en una hora aproximadamente.

En el tercer experimento, se utilizó un medio perfusivo con 18 g/L de glicerol y adicionado en sales, con el propósito de evitar una posible limitación de estos elementos. En la Figura 25b, se muestra el cambio de presión transmembrana, el flux de permeado y la concentración celular con el tiempo en este experimento. Durante esta perfusión, la sedimentación de sales provocó que las líneas de alimentación de medio, tanto al nivel de la bomba como en la entrada al biorreactor, se colapsaran, por esta razón, este cultivo terminó a las 7 horas.

Esta estrategia funciona para medio concentrado solamente en glicerol, ya que al aumentar la concentración de células, las sales que contiene el medio tienden a sedimentarse y a colapsar el sistema. Se requiere analizar otros componentes durante el cultivo como N y probar estrategias de agregar sales al medio como la adición de pulsos escalonados.

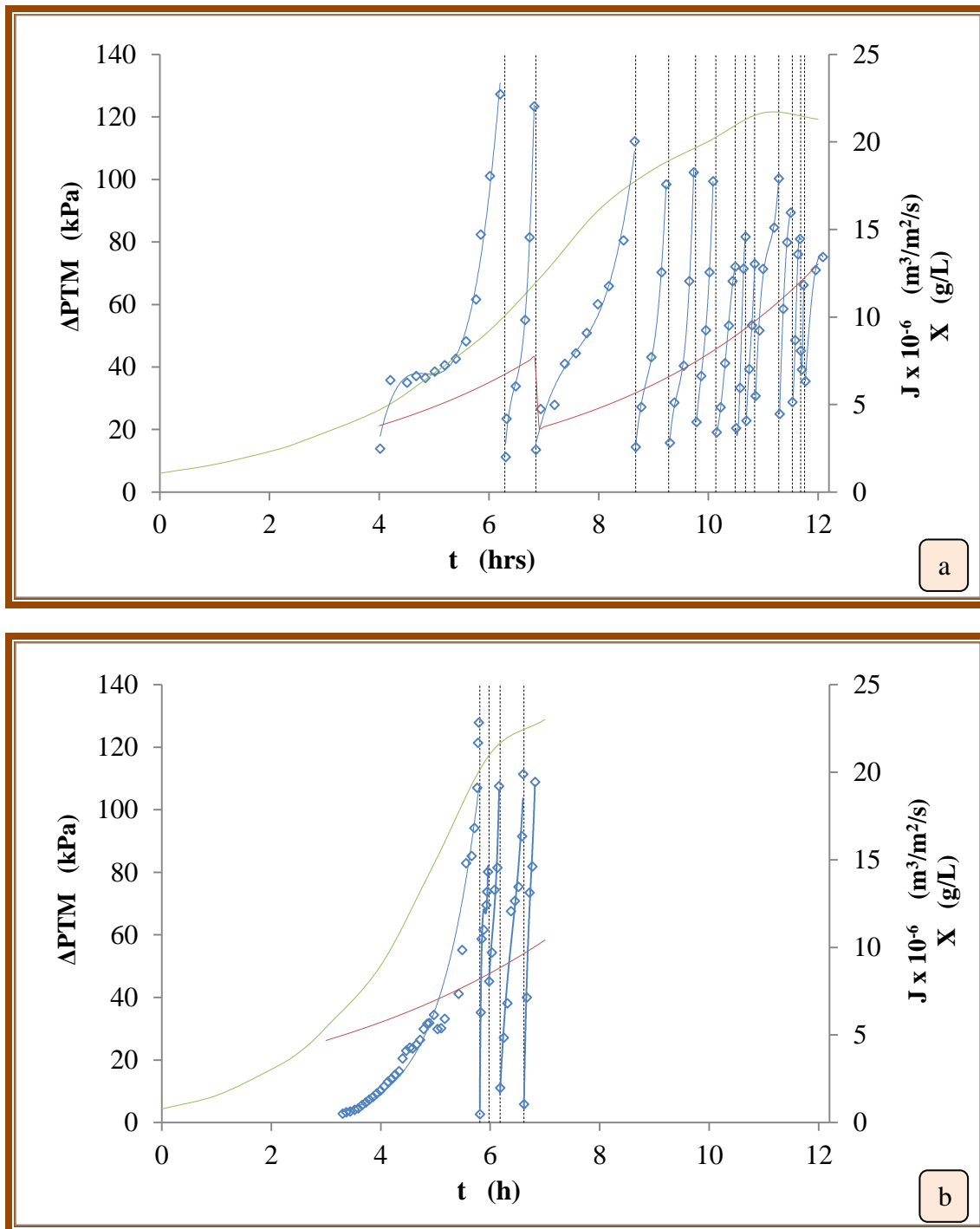


Figura 25. Cambio de presión transmembrana (—), flujo de permeado (—) y concentración celular (—) durante (a) el segundo y (b) tercer experimento perfusivo con diferente arreglo de alimentación.

La segunda estrategia, no excluyente de la primera, consiste en aumentar el área microfiltración, ya sea durante el cultivo o desde su inicio.

Espacio definido. En este sistema se recomienda no exceder el flujo de 6 mL/min (flux de $7.0 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{m}^2\text{-s}$), a este flujo el módulo de microfiltración comienza a presentar problemas, considerando una concentración celular típica de 17 g/L y valores de presión transmembrana del orden de 60 kPa.

La Figura 26 muestra los valores simulados de la primera perfusión. El área de permeado debe aumentar para lograr el flujo de alimentación necesario para el crecimiento del cultivo hasta llegar a una concentración celular de 50 g/L que corresponde a una densidad óptica de 100 OD₆₀₀. Para mantener el flujo de permeado dentro del límite recomendado, se muestra como debe ir incrementado el número de membranas. En esta figura, cada sección corresponde a una membrana.

4.7.2 Recirculación

Al inicio de esta investigación, se consideró la posibilidad de recircular parte del permeado al biorreactor. Los resultados muestran que debido al bajo contenido de glicerol y la apariencia del permeado es poco recomendable esta opción. En la Figura 27 se presenta un fotografía de un cultivo perfusivo donde se aprecia el diferente color del el medio usado, del caldo de cultivo y el medio de alimentación. Podemos apreciar una diferencia remarcable que muestra el contenido de productos extracelulares.

4.7.3 Otros Factores Determinantes para el Diseño

Se presentó la ruptura de varias membranas, las cuales fueron ocasionadas después de 12 a 16 horas de uso, contando cada lavada como una hora de uso. También el rompimiento de dos transductores de presión en la alimentación a la membrana, éstos ocurrieron al alcanzar una presión de entrada de 25 psi.

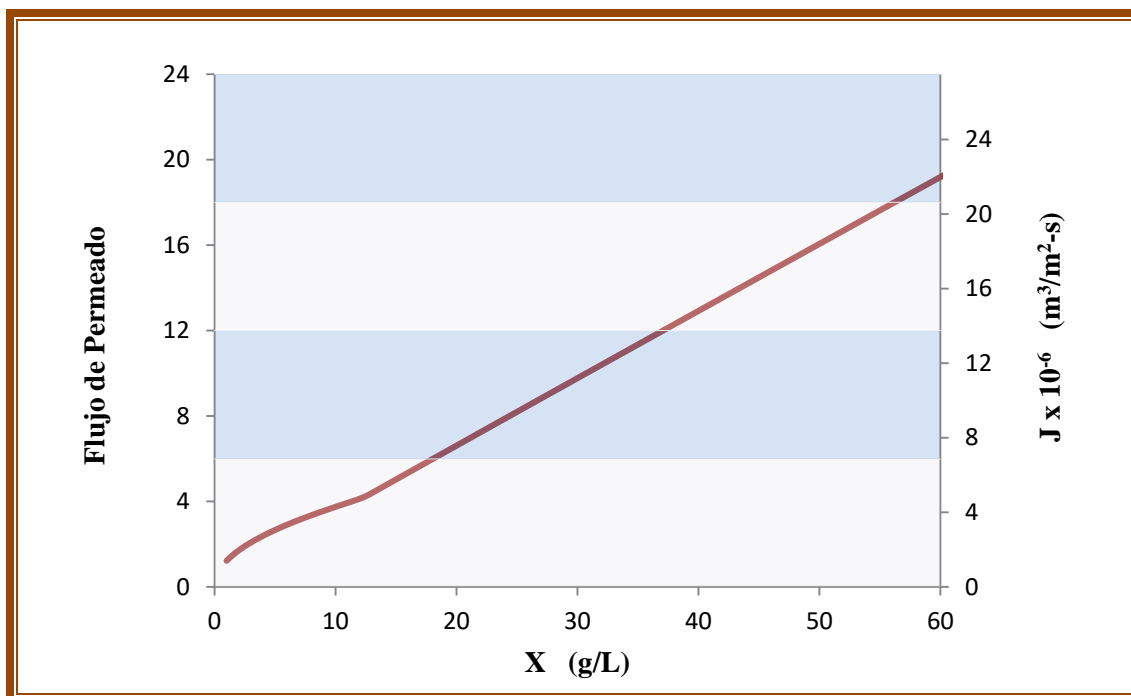


Figura 26. Requerimiento de flujo de permeado según el incremento de concentración celular.



Figura 27. Fermentador con caldo biológico (a), medio de cultivo definido para alimentar (b) y permeado del sistema (c).

En la Figura 28 se muestra una comparación entre el permeado de una membrana en buen funcionamiento y una membrana rota. El color rojizo a comparación del permeado de la Figura 25 es que el medio permeado en la fotografía se debe a que proviene de un cultivo crecido en medio TB.

Durante los experimentos de perfusión a nivel fermentador se utilizó antiespumante libre de silicón. La selección de este antiespumante fue con el fin de prevenir la formación de una capa de silicón en la superficie de la membrana. Cuellar *et al*, 2009 suponen en un proceso de microfiltración, algunos componentes del medio como el antiespumante pueden ocasionar obstrucción adicional a la producida por la biomasa.



Figura 28. Comparación de permeado cuando la membrana está rota (izq.) y en buenas condiciones (der).

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se logró el análisis de un sistema de microfiltración para la producción de plásmidos de uso médico en un biorreactor de alta densidad, empleando un enfoque teórico y experimental

Los estudios de microfiltración utilizando soluciones modelo en modo diafiltración y concentración permitieron determinar los parámetros del modelo del módulo de microfiltración. Todos los valores obtenidos se situaron dentro del rango esperado conforme a la literatura.

Mediante estudios cinéticos a nivel matraz y fermentador se obtuvieron los parámetros del modelo que describen el crecimiento celular, el consumo de sustrato y la formación de producto, en el cultivo perfusivo con alimentación exponencial.

Se estableció un modelo integrado para describir el acoplamiento del sistema de membrana con el biorreactor. Este modelo pudo ser utilizado para describir el aumento del gradiente de presión transmembrana, sin embargo los valores de masa acumulada resultaron muy grandes.

El análisis económico del proceso perfusivo a nivel fermentador mediante un enfoque de costos marginales reporta índices económicos considerablemente favorables.

Se constituyó el espacio de diseño para el sistema a nivel fermentador que establece el rango de valores adecuados para el buen funcionamiento del sistema perfusivo.

Esta investigación apoya la factibilidad técnica y económica de un sistema para la producción de plásmidos de uso médico utilizando una técnica novedosa de consistente

en un cultivo perfusivo con alimentación exponencial. La realización de más investigación contribuirá en el avance de estos indicadores.

5.2 Recomendaciones

Los problemas más comunes de las perfusiones realizadas fueron primordialmente por el taponamiento de la membrana que se genera por la succión que es resultado del incremento exponencial de permeado requerido para mantener el volumen constante en el biorreactor. Por lo que se proponen modificaciones en el arreglo del sistema como utilizar otra membrana colocada en paralelo a la actual, esto permitirá tener flujos más altos de permeado, por lo que permitirá mayor volumen de alimentación.

Otra alternativa para solucionar esto es aumentar el flujo cruzado del sistema de microfiltración, con el propósito de barrer la biomasa incrustada en la membrana.

Se puede considerar realizar experimentos con una membrana con mayor tamaño de poro con el fin de que la membrana permita el paso no solo del medio gastado sino de cualquier detrito celular que pueda haber en el sistema. Esto mantendrá las células en crecimiento en un ambiente limpio y con medio más fresco.

En cuanto al crecimiento celular, se llegó exactamente a la misma concentración celular en tres perfusiones. Por el momento se asume que existe algún limitante para el crecimiento, mas no se ha determinado si es algún nutriente o alguna razón de funcionamiento del sistema. Se propone análisis del contenido del permeado y más investigación en el área.

Del estudio de citometría de flujo se obtienen resultados donde se observa que las células se encuentran de tamaño y complejidad similar en los diferentes tiempos analizados, sin embargo, se pueden utilizar diferentes tintes para etiquetar células de interés y obtener mayor información del crecimiento celular. Se recomienda analizar las

etapas de crecimiento celular y viabilidad a lo largo de la fermentación y perfusión utilizando esta técnica. También, investigar algún método de etiquetar plásmido para su análisis con citometría de flujo de manera que este análisis proporcione más información de la formación de plásmido dentro de la célula.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, W.F. (1998). Human gene therapy. *Nature*, 392, 25-30.
- Bohle, K. y Ross, A. (2011). Plasmid DNA production for pharmaceutical use: role of specific growth rate and impact on process design. *Biotechnology and bioengineering*, 108, 2099-2106.
- Bondioli, P. y Della Bella, L. (2005). An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107, 153-157.
- Bowen, W. R., y Jenner, F. (1995). Theoretical descriptions of membrane filtration of colloids and fine particles: An assessment and review. *Advances In Colloid And Interface Science*, 56, 141.
- Boye, E. y Løbner-Olesen, A. (1991). Bacterial growth control studied by flow cytometry. *Research in Microbiology*, 142, 131-135.
- Calcott, P.H. (2011). How QbD and the FDA Process Validation Guidance Affect Product Development and Operations. *Bioprocess International*, 9, 12-17.
- Carnes, A.E., Hodgson, C.P. y Williams, J.A. (2006). Inducible Escherichia coli fermentation for increased plasmid DNA production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 45, 155-166.
- Carnes, A.E. y Williams, J.A. (2007). Plasmid DNA Manufacturing Technology. *Recent Patents on Biotechnology*, 1, 151-166.
- Carrère, H., Blaszkowa, F., y Roux, . B. H. (2002). Modelling the microfiltration of lactic acid fermentation broths and comparison of operating modes. *Desalination*, 145, 201-206.
- Clark, D.P. (1989). The fermentation pathways of Escherichia coli. *FEMS Microbiology Reviews*, 5, 223-234.
- Cuellar, M.C., Zijlmans, T.W., Straathof, A.J.J., Heijnen, J.J. y van der Wielen, L.A.M. (2009). Model-based evaluation of cell retention by crossflow ultrafiltration during fed-batch fermentations with Escherichia coli. *Biochemical Engineering Journal*, 44, 280-288.
- Foley, G. (2006). A review of factors affecting filter cake properties in dead-end microfiltration of microbial suspensions. *Journal of Membrane Science*, 274, 38-46.

Gonzalez-Valdez J (2013). DNA based vaccines offer improved vaccination supply for the developing world. *J. Chem. Technol. Biotechnol. Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88, 979-982.

Heinzle, E (2006). Development of sustainable bioprocesses modeling and assessment.

Hernandez, L.Y., Castro, D., Viton, P., Perez, O. y Rodriguez, M. (2009). Modelación de la cinética de crecimiento del cultivo en perfusión de células de mamíferos. *Biotechnol. Apl. Biotecnología Aplicada*, 26, 226-236.

Hernandez-Flores, J, Morales-Aguirre, J. J., y Zamora-Chavez, A. (2007). Visceral leishmaniasis treated with amphotericin B. *Boletín Medico- Hospital Infantil De Mexico*, 64, 43-48.

Hewitt, C.J., Nebe-Von Caron, G., Axelsson, B., McFarlane, C.M. y Nienow, A.W. (2000). Studies related to the scale-up of high-cell-density E. coli fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: Effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. *Biotechnology and Bioengineering*, 70, 381-390.

Hwang, S.-T. (2011). Fundamentals of membrane transport. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28, 1-15.

Knorre, W.A., Deckwer, W.D., Korz, D., Pohl, H.D., Riesenberger, D., y Ross, A. (1991). High cell density fermentation of recombinant Escherichia coli with computer-controlled optimal growth rate. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 646, 300-306.

Lederberg, J. (1998). Plasmid (19521997). *Plasmid Plasmid*, 39, 1-9.

Logist, F., Saucez, P., Van Impe, J. y Wouwer, A.V. (2009). Simulation of (bio) chemical processes with distributed parameters using Matlab (R). *Chemical Engineering Journal*, 155, 603-616.

MacLean, A. (1991). Questions, Options, and Criteria: Elements of Design Space Analysis. *Human-Computer Interaction*, 6, 201-250.

Ongkudon, P.(2011). Cultivation of E. coli carrying a plasmid-based Measles vaccine construct (4.2 kbp pcDNA3F) employing medium optimisation and pH-temperature induction techniques. *Microbial Cell Factories*, 10.

Paalme, T., Tiisma, K., Kahru, A., Vanatalu, K. y Vilu, R. (1990). Glucose-Limited fed-batch cultivation of Escherichia coli with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 312-319.

Palatnik-de-Sousa, C.B. (2008). Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*, 26, 1709-1724.

- Prazeres, D.M., Ferreira, G.N., Monteiro, G.A., Cooney, C.L. y Cabral, J.M. (1999). Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. *Trends in Biotechnology*, 17, 169-174.
- Prazeres D. (2001). Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Biotechnology Annual Review*, 7, 1-30.
- Prescott, L. (2005). *Microbiology*. McGraw-Hill Higher Education, Dubuque, IA.
- Rathore, A.S. y Shirke, A. (2011). Recent Developments In Membrane-Based Separations In Biotechnology Processes: Review. *Preparative Biochemistry y Biotechnology*, 41, 398-421.
- Restaino, O., Cimini, D., De Rosa, M., Catapano, A. y Schiraldi, C. (2011). High cell density cultivation of *Escherichia coli* K4 in a microfiltration bioreactor: a step towards improvement of chondroitin precursor production. *Microbial Cell Factories*, 10, 1-10.
- Rodriguez-Dominguez, J. (2002). Las Enfermedades Transmitidas por Vector en Mexico. *Revista de la Facultad de Medicina. UNAM*, 45, 126-141.
- Rubanyi, G.M. (2001). The future of human gene therapy. *Molecular aspects of Medicine*, 22, 113-142.
- Sang Yup, L. (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 14, 98.
- Sevella, B. y Bertalan, G. (2000). Development of a MATLAB based bioprocess simulation tool. *Bioprocess Engineering*, 23, 621-626.
- Shuler, M.L. y Kargi, F. (1992). *Bioprocess engineering : basic concepts*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- Silva, F., Passarinha, L., Sousa, F., Queiroz, J. A., y Domingues, F. C. (2009). Influence of growth conditions on plasmid DNA production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 1408-1414.
- Silva, F., Lourenço, O., Maia, C., Queiroz, J. A., y Domingues, F. C. (2011). Impact of plasmid induction strategy on overall plasmid DNA yield and *E. coli* physiology using flow cytometry and real-time PCR. *Process Biochemistry*, 46, 174-181.
- Tejeda, A. y Montesinos, R.M. (2008). Upstream processing of plasmid DNA for vaccine and gene therapy applications. *Recent Pat. Biotechnol. Recent Patents on Biotechnology*, 2, 156-172.

Tejeda M, A., Montesinos C, R.M. y Guzmán Z, R. (2011). *Bioseparaciones*. Unison, Hermosillo, Sonora.

Urthaler, J., Schuchnigg, H., Garidel, P. y Huber, H. (2012). Industrial Manufacturing of Plasmid-DNA Products for Gene Vaccination and Therapy. In: *Gene Vaccines* (eds. Thalhamer, J, Weiss, R y Scheiblhofer, S). Springer, pp. 311-330.

Voisard, D., Meuwly, F., Ruffieux, P.A., Baer, G. y Kadouri, A. (2003). Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 82, 751-765.

Yakhchali, B., Karami, A., Aflaki, E. y Ahmadi, A. (2007). Plasmid DNA Production for Genetic Immunization in Fed-Batch Fermentation with Feed Back Controls Based on Dissolved Oxygen (DO) and pH. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 18, 129-133.