



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

ESTUDIO DE LA RECUPERACIÓN DE ADN PLASMÍDICO A PARTIR DE LISADOS DE *E. coli* POR MEDIO DE MICROFILTRACIÓN

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

ISAÍ ROMERO PÉREZ

Hermosillo, Sonora

Noviembre 2014

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

VOTOS APROBATORIOS

Hermosillo, Sonora, a 30 de Octubre de 2014.

DR. MARTÍN ANTONIO ENCINAS ROMERO
JEFE DEL DEPARTAMENTO
INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional "ESTUDIO DE LA RECUPERACIÓN DE ADN PLASMÍDICO A PARTIR DE LISADOS DE E. COLI POR MEDIO DE MICROFILTRACIÓN", presentada por:

ISAÍ ROMERO PÉREZ

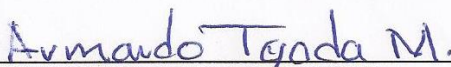
La han revisado y cada uno de los integrantes da su **VOTO APROBATORIO** ya que cumple con los requisitos parciales para la obtención del Título de:

Ingeniero Químico

30 OCT 2014
Fecha


DRA. PATRICIA GUERRERO GERMAN

31 Oct 2014


DR. ARMANDO TEJEDA MANSIR

30-October-2014


DR. ABRAHAM ROGELIO MARTIN GARCIA

30-oct-2014


DR. JESÚS ARMANDO LUCERO ACUÑA

RESUMEN

La posible aplicación de plásmidos en terapia génica y vacunación en seres humanos ha sido estudiada en los últimos años, pero aún no se ha logrado cumplir con la meta debido a las dificultades que representa el producir esta molécula a nivel industrial. El estudio de los diferentes procesos de purificación, así como de los parámetros óptimos, es de vital importancia para llegar al objetivo y cumplir con todas las medidas de control y pureza.

La producción de plásmidos comprende una etapa de fermentación en la cual se promueve el crecimiento celular, después es necesario realizar los procesos que corresponden a la recuperación primaria de plásmidos. Esta etapa de recuperación de plásmidos se compone de cosecha celular, lisis alcalina, filtración convencional, microfiltración en lecho profundo y microfiltración tangencial, específicamente para este trabajo. Se empleó además un proceso de comparación que consiste en realizar una etapa de centrifugación y una de filtración a vacío después de la lisis alcalina.

Se empleó además un proceso de comparación que consiste en realizar una etapa de centrifugación y una de filtración a vacío después de la lisis alcalina.

Con base a las recomendaciones en trabajos previos sobre microfiltración de lecho profundo, se hicieron lavados a los medios filtrantes utilizados en la clarificación, la microfiltración y también a los flóculos obtenidos después en la neutralización del lisado, para determinar la recuperación de plásmidos.

El análisis del comportamiento de cada etapa en los procesos se realizó mediante electroforesis, cromatografía líquida de alto rendimiento y turbidez. En base a estos análisis se logró conocer las características de cada etapa en forma cualitativa y cuantitativa.

Los rendimientos de cada etapa respecto a la purificación de plásmidos, se analizaron basándose en balances de masa. El comportamiento de la presión fue analizado mediante el ajuste de un modelo de recubrimiento de fibras a flujo constante para algunas corridas de microfiltración en lecho profundo.

El proceso propuesto resultó ser más eficiente con respecto al proceso de comparación, basándonos en los porcentajes de plásmidos obtenidos.

DEDICATORIA

A hombros de gigantes es como se logra llegar más alto, por eso dedico esta investigación a mis padres y mi hermana, quienes han estado siempre para apoyarme a lo largo de toda mi vida y me han motivado para culminar esta etapa tan importante, ustedes son mis gigantes, los quiero.

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a mi asesora, Dra. Patricia Guerrero Germán, por todos sus consejos, paciencia y disposición a lo largo del desarrollo de este trabajo. De igual manera a mis sinodales, Dr. Armando Tejeda Mansir, por su apoyo y tiempo dedicado para brindar su mejor consejo, Dr. Abraham Martin y Dr. Armando Lucero, por su contribución y tiempo.

Agradezco al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) y al Departamento de Ingeniería Química y Metalúrgica, por brindar sus instalaciones, los materiales y equipos necesarios para el desarrollo de este trabajo de investigación. A CONACYT por brindarme apoyo económico en el tiempo de mi investigación.

A mis compañeros de laboratorio, Alonso, Adriana, Diana, Cindy, Aurora y Rodolfo, por su compañerismo, tiempo invertido y consejos brindados a lo largo de mi investigación, muchas gracias.

Le agradezco al Ing. Jacobo Gutiérrez y familia, por el apoyo incondicional que han mostrado para conmigo desde mis prácticas profesionales hasta el día de hoy, por sus consejos y tiempo invertidos en mi desarrollo como profesionista.

A mis compañeros de clase Francisco, Gabriela, Luz y Erick, por su amistad y apoyo durante mis estudios profesionales.

Les agradezco en especial a ustedes Manuel, Alicia, Alba y Jaky, por todo su apoyo y darme siempre las fuerzas y motivos para seguir adelante, saben que los amo.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
TABLA DE CONTENIDOS	VI
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABLAS.....	XIII
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 Introducción	1
1.2 Justificación	3
1.3 Objetivos	3
1.3.1. Objetivo General	3
1.3.2. Objetivos Específicos	3

CAPÍTULO II	4
ANTECEDENTES	4
2.1 Antecedentes	4
2.1.1. Terapia génica y vacunación.....	4
2.1.2. Características del ADN bacteriano	6
2.1.3. El plásmido pVAX1-NH36 y sus características.....	10
2.1.4. Producción de plásmidos.....	10
2.1.5. Fundamentos de Filtración.....	17
2.1.6. Microfiltración de Lecho Profundo.....	19
2.1.7. Microfiltración de Flujo Tangencial	23
CAPÍTULO III	24
MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 Materiales	24
3.2 Equipos	25
3.3 Metodología	31
3.3.1. Fermentación	33
3.3.2. Recuperación primaria	33
3.3.3. Análisis de turbidez	37
3.3.4. Análisis electroforético.....	37
3.3.5. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-HIC)	38

CAPÍTULO IV	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1 Fermentación	40
4.2 Recuperación primaria en el Proceso 1	43
4.2.1. Lisis Celular	43
4.2.2. Filtración convencional.....	44
4.2.3. Microfiltración de Lecho Profundo.....	49
4.2.4. Microfiltración Tangencial.....	59
4.3 Recuperación primaria en el Proceso 2	62
4.3.1. Clarificación por centrifugación.....	62
4.3.2. Filtración al vacío.....	64
CAPÍTULO V	66
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	66
5.1 Conclusiones	66
5.2 Recomendaciones	67
CAPÍTULO VI	68
BIBLIOGRAFÍA	68
ANEXOS	72
Anexo A: Acondicionamiento de la Membrana de Fibra hueca.	72

Anexo B: Turbidímetro portable TN-100/T-100, Manual de Instrucciones	73
Anexo C: Curva estándar para análisis de Cromatografía Líquida de Alta Resolución con columna de interacción hidrofóbica (HPLC-HIC).....	77
Anexo D: Datos experimentales utilizados en el ajuste del modelo de MFLP a flujo constante.....	78

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Etapas del procesos de obtención del plásmido pVAX1-NH36.	2
Fig. 2 Número de patentes en Vacunas de DNA.....	5
Fig.3 Esquema de una célula procariota y sus principales componentes.....	6
Fig. 4 Estructura del ADN	8
Fig. 5 Esquema de la transformación bacteriana.....	10
Fig. 6 Principales operaciones de separación por Membranas.	18
Fig. 7 Clasificación general de filtración. (McCabe, 2007)	19
Fig. 8 Bioreactor Applikon ez-control.	25
Fig. 9 Incubadora VWR.....	26
Fig. 10 Centrífuga Allegra X-22R	26
Fig. 11 Sistema de filtración a vacío.....	27
Fig. 12 Microfiltro tipo Cápsula, Sartoclear P.	27
Fig. 13 Sistema de Microfiltración a Lecho Profundo.....	28
Fig. 14 Transductor de Presión	28
Fig. 15 Sistema de Microfiltración Tangencial	29
Fig. 16 Desmineralizador de agua, Direct Q, Millipore.	29
Fig. 17 Turbidímetro Oakton T-100.....	30
Fig. 18 MultiDoc Digital System	30
Fig. 19 Esquema principal de metodología en la clarificación del plásmido pVAX-NH36	31
Fig. 20 Esquema de etapas de recuperación de plásmidos en la Fermentación 1.	32
Fig. 21 Esquemas de etapas de recuperación de plásmidos en la Fermentación 2 y Fermentación 3.....	32

Fig. 22 Procedimiento en la etapa de FC.	34
Fig. 23 Esquema de la etapa de MFLP	35
Fig. 24 Esquema de la etapa de MFFT	37
Fig. 25 Curva de crecimiento para la Fermentación 1	40
Fig. 26 Curva de crecimiento para la Fermentación 2	41
Fig. 27 Curva de crecimiento para la Fermentación 3.	41
Fig. 28 Electroforesis de las etapas de FC 1-A y 1-B.....	44
Fig. 29 Comparación de cromatogramas de la FC 1-A.....	46
Fig. 30 Electroforesis a muestras de la FC 2.....	47
Fig. 31 Electroforesis de la etapa de MFLP 1-A.....	49
Fig. 32 Cromatogramas realizados en la etapa MFLP 1-A.....	50
Fig. 33 Electroforesis de la etapa de MFLP 1-B1.....	51
Fig. 34 Cromatogramas realizados en la etapa MFLP 1-B1.....	52
Fig. 35 Electroforesis de la etapa MFLP 1-B2.....	53
Fig. 36 Cromatogramas realizados en la etapa MFLP 1-B2.....	54
Fig. 37 Electroforesis de la etapa MFLP 2.....	55
Fig. 38 Cromatogramas realizados en la etapa MFLP 2.....	56
Fig. 39 Comportamiento del diferencial de presión relativo y ajuste del modelo a flujo constante.	59
Fig. 40 Electroforesis realizada a la etapa MFFT.....	60
Fig. 41 Cromatogramas realizados a la etapa MFFT.....	61
Fig. 42 Electroforesis realizada a la clarificación por centrifugación.....	62

Fig. 43 Comparativos cromatográficos entre Clarificación por Centrifugación y FC.....	63
Fig. 44 Electroforesis realizada a la filtración a vacío.....	64
Fig. 45 Alineación del vial con el turbidímetro.	74
Fig. 46 a) Vial muestreador, b) Aplicación de una delgada película de aceite de silicona.....	76
Fig. 47 Curva estándar para análisis de muestras en HPLC-HIC.....	77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales componentes de una bacteria <i>E.coli</i>	7
Tabla 2 Métodos y principios de rompimiento celular.....	12
Tabla 3. Características de las técnicas cromatográficas más usada en purificación de plásmido.	16
Tabla 4. Clasificación general de la Filtración.	17
Tabla 5. Datos finales de las fermentaciones realizadas	42
Tabla 6 Biomasa obtenida y concentración celular en los cultivos de las fermentaciones 1, 2 y 3.	43
Tabla 7. Resultados generales de las FC 1-A y 1-B.....	44
Tabla 8. Análisis por HPLC-HIC de FC 1-A y 1-B.....	45
Tabla 9. Valores promedio en las FC 1-A y 1-B	46
Tabla 10. Resultados Generales del Clarificado 2.....	47
Tabla 11. Análisis por HPLC-HIC de la FC 2.....	48
Tabla 12. Valores promedio en la FC 2	48
Tabla 13 Resultados Generalizados para Microfiltraciones de Lecho Profundo	57
Tabla 14 Resultados obtenidos a partir del ajuste del modelo a datos de MFLP.....	58
Tabla 15 Resultados para la MFFT	61
Tabla 16 Resultados para la Clarificación por centrifugación.....	63
Tabla 17 Resultados para la Filtración a vacío	65
Tabla 18 Datos experimentales obtenidos en MFLP 1-A.	78
Tabla 19 Datos experimentales obtenidos en MFLP 1-B1.	79

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

En el desarrollo de la ciencia y la tecnología, la biotecnología ha tenido un papel muy importante satisfaciendo principalmente dos de las necesidades básicas de la humanidad a lo largo de la historia: alimentación y salud. A partir de organismos vivos la biotecnología proporciona una gran gama de productos, también llamados bioproductos, los cuales son obtenidos mediante el cultivo celular.

Para satisfacer la creciente demanda de los bioproductos se han desarrollado procesos que comprenden principalmente dos etapas: operaciones previas al cultivo y operaciones posteriores a este (Tejeda y col. 2011).

Uno de los bioproductos que en los últimos años ha despertado el interés de la comunidad científica, es el plásmido, molécula de ADN contenida en todas las bacterias procariotas. Los plásmidos contienen información genética con la cual las bacterias pueden desarrollar resistencia a antibióticos; también están involucrados en la producción de toxinas y pueden contener genes capaces de proporcionar a la bacteria capacidad de utilizar determinadas fuentes de carbono o de nitrógeno.

El desarrollo de este trabajo se centra en las operaciones posteriores al cultivo celular, específicamente en la recuperación primaria del producto de interés. Dicho producto es el plásmido pVAX1-NH36 que está contenido en una cepa de la bacteria *E. coli*.

El plásmido pVAX1-NH36 puede ser empleado en vacunas contra la leishmaniasis, enfermedad que es causada por protozoos del género *Leishmania*, se manifiesta desde lesiones cutáneas (leishmaniasis cutánea, CL) hasta una forma letal de la enfermedad, la cual es conocida como (leishmaniasis visceral, VL). (Modabber, 2010).

El proceso para la obtención del plásmido (descrito más adelante) consta de 4 etapas generales.

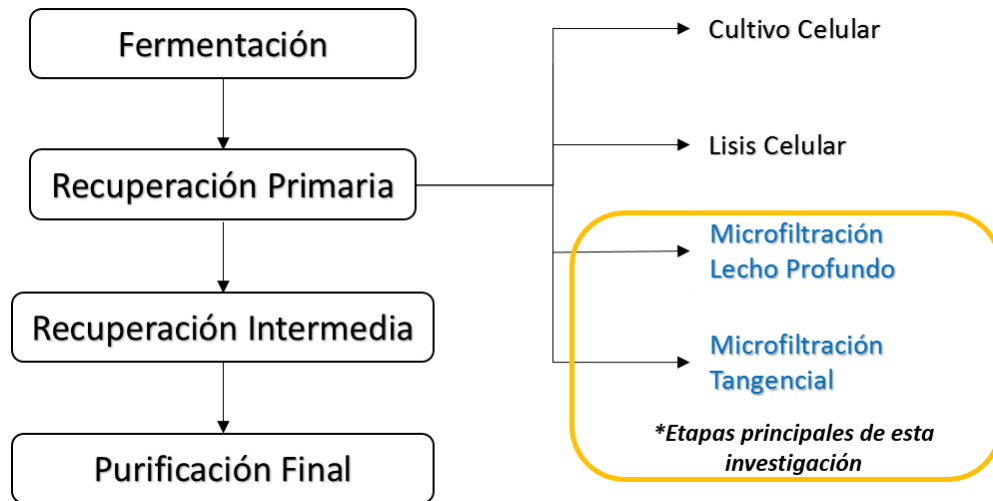


Fig. 1 Etapas del procesos de obtención del plásmido pVAX1-NH36.

Para la purificación de plásmidos existen protocolos y kits comerciales que son utilizados a escala de laboratorio, pero no son adecuados para la purificación a mayor escala de plásmidos con aplicaciones terapéuticas debido a la utilización de materiales tóxicos, además se presentan dificultades en el proceso de escalamiento (Guerrero y col; 2008).

En los procesos de purificación de plásmidos se presentan algunos problemas debidos principalmente a las diferentes formas de estas biomoléculas, y la presencia de impurezas con características similares a ellas (Prazeres, 2004).

Como se puede observar en la Figura 1, las etapas principales en esta investigación son: la microfiltración en lecho profundo y tangencial.

1.2 Justificación

En el proceso de purificación de plásmidos se utilizan tanto procesos químicos como operaciones unitarias. En el presente, se está tomando especial interés en procesos de filtración para la recuperación primaria de plásmido. Esto se debe a que la filtración es una operación económica y de fácil escalamiento, en comparación con la centrifugación, operación ampliamente usada en la recuperación primaria a nivel laboratorio. Es importante conocer el comportamiento de la filtración en la recuperación de plásmidos a pequeña escala, para poder determinar los parámetros principales de operación que deberán ser tomados en cuenta al momento de un escalamiento.

1.3 Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Analizar la recuperación primaria de plásmido pVAX1-NH36, a partir de lisados neutralizados *E. coli* por medio de operaciones de Filtración convencional (FC), microfiltración de lecho profundo (MFLP) y microfiltración de flujo tangencial (MFFT).

1.3.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la FC del lisado alcalino utilizando un filtro con tamaño de poros de 8 a 12 μm , así como el lavado de los mismos y los flóculos retenidos para la recuperación de plásmido.
- Analizar el comportamiento de las operaciones de MFLP por medio de turbidez, electroforesis y cromatografía analítica de interacción hidrofóbica.
- Evaluar el comportamiento de la caída de presión durante la MFLP, por medio de un modelo matemático.
- Analizar el comportamiento de la operación de MFFT por medio de turbidez, electroforesis y cromatografía analítica de interacción hidrofóbica.
- Establecer un punto de comparación entre el proceso propuesto y el ya existente por centrifugación, por medio de los balances de masa.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes

2.1.1. Terapia génica y vacunación

La terapia génica puede ser utilizada en el tratamiento de enfermedades y a lo largo de los últimos años se han desarrollado múltiples estudios que han aportado evidencias experimentales a favor de su aplicación. Se considera que este procedimiento puede dar un gran impulso a la medicina moderna, en tanto que los beneficios sean mayores que los riesgos. Esta terapia básicamente consiste en la introducción de genes a células del cuerpo humano que codifican la síntesis de una proteína, que al expresarse lleva a cabo una acción terapéutica (García y col., 2008).

La terapia génica se puede ver como una forma de producir proteínas usando las propias células del paciente como mini-biorreactores. La terapia génica promete substituir un gen faltante o defectuoso dentro de las células del paciente y complementar el organismo, con la producción de las proteínas que pueden prevenir o tratar la enfermedad (Manthorpe y col., 2005).

Se ha demostrado que las vacunas de ADN plasmídico (ADNp) producen una respuesta inmune similar a la que se produce con las vacunas tradicionales de virus atenuados, además los plásmidos no se replican en el huésped y no se integran en el ADN cromosómico (Ghanem y col., 2013; García y col., 2008; Montesinos y col., 2005; Okuda y col., 2014).

Estos factores han hecho que el ADNp haya ganado un enorme interés en aplicaciones terapéuticas, demostrado por el aumento en el número de patentes en el área de vacunas de ADN. La Figura 2 muestra este comportamiento:

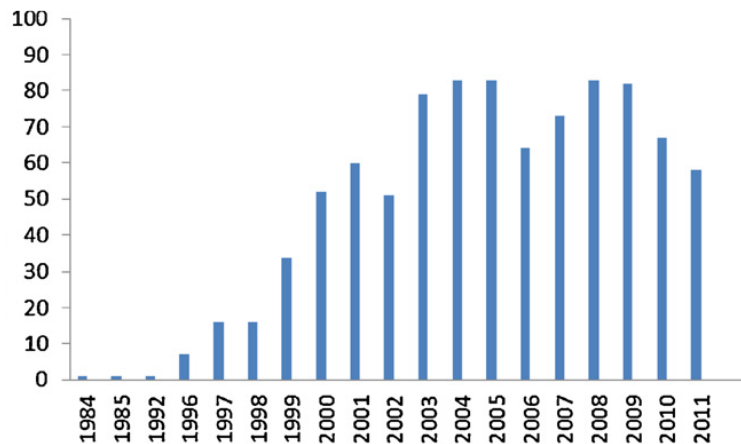


Fig. 2 Número de patentes en Vacunas de DNA (Ghanem y col., 2012).

El número de protocolos de terapia génica aprobados utilizando vectores basados en ADNp se ha incrementado exponencialmente desde 1995, lo que representa aproximadamente el 25% de los ensayos de terapia génica hasta el 2008. (Ferreira y col., 2000)

Por sus características, los plásmidos son la promesa para una nueva generación de vacunas y para la terapia génica. En base a los estudios que se han realizado para conocer las características de los plásmidos y los bioprocesos ya existentes, es posible crear procedimientos eficaces y viables para su purificación.

A pequeña escala, los plásmidos son relativamente fáciles de producir y purificar, ofrecen una buena estabilidad, lo cual les da una ventaja en la vacunación en poblaciones lejanas. Sin embargo, se requiere que se administren cantidades relativamente grandes (hasta varios miligramos por dosis en seres humanos) para lograr una buena respuesta inmune (Prather y col., 2003).

En la actualidad, el reto está en la producción a nivel industrial. Una de las principales limitantes es el tamaño de los plásmidos y sus isoformas (circular, superenrollado y lineal); se sabe que el ADN cromosómico es de mayor tamaño que el plasmídico, pero este último contiene diferentes formas, lo cual implica que aunque que en alguna purificación realizada por alguna serie de bioprocesos, se crea que se ha obtenido el plásmido deseado, puede en realidad obtenerse una mezcla de isoformas de un mismo plásmido. Es por esta razón que deben desarrollarse métodos confiables y eficientes de purificación.

2.1.2. Características del ADN bacteriano

La información genética de una bacteria se encuentra en una única molécula de ADN de doble cadena. Esta molécula de ADN consta de un polímero lineal de desoxirribonucleótidos unidos por grupos fosfodiéster y tiene una forma circular cerrada. En la Figura 3 se muestra la conformación de una bacteria procariota, se puede observar esquemáticamente donde se encuentra el ADN genómico y el plasmídico.

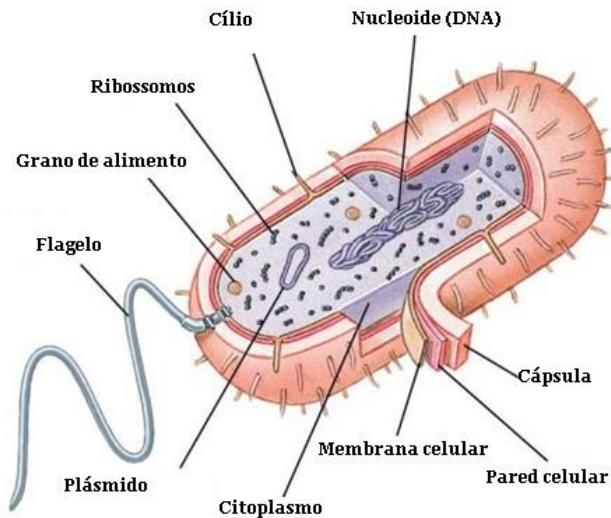


Fig.3 Esquema de una célula procariota y sus principales componentes.
(www.medicinaunsa.edu.pe)

En términos bioquímicos, la composición y estructura de los ácidos nucleicos bacterianos, es la misma que para cualquier célula. Los ácidos nucleicos son macromoléculas compuestas de nucleótidos unidos en forma covalente por medio de enlaces fosfodiéster entre los carbonos de las posiciones 3' y 5' de dos residuos de azúcares adyacentes, que conforman un esqueleto de azúcares y fosfatos que es constante a lo largo de toda la macromolécula.

Tabla 1. Principales componentes de una bacteria *E.coli*; (Adaptado de Prazeres y col., 2004)

Especie	% en peso	Especie/Célula	Peso Molecular (kDa)
Agua	70	1	0.018
Ácidos Nucléicos:			
ADNg	0.5	1	2.8×10^6
ARNt	4.8	40	28
ARNr	0.9	3	500-1000
ARNm	0.3	400-800	660-90
ADNp	<1	1	3300
Proteínas	15	1100	8-200
Lipopolisacarido	5		10
Moléculas pequeñas y iones	3	800-2000	<1

La variación entre los distintos nucleótidos que conforman la cadena de ácido nucleico, está dada por sus bases nitrogenadas, que en el caso del ADN son Adenina (A), Timina (T), Citocina (C) y Guanina (G), y en el caso del ARN en vez de T se encuentra Uracilo (U). El ADN como macromolécula, está compuesto por 2 cadenas nucleotídicas o hebras antiparalelas, que se enlazan entre si conformando una doble hélice. Los enlaces entre las dos hebras de ADN están dados por puentes de hidrógeno entre las purinas de una cadena con las pirimidinas de la otra. De esta forma, la A forma dos puentes de hidrógeno con la T, mientras que la C forma 3 puentes de hidrógeno con la G. Estos enlaces permiten mantener estable la estructura de la doble hélice de ADN en la que pueden distinguirse pares de nucleótidos o mejor dicho pares de bases (pb). Estos pb se utilizan como unidad de tamaño o longitud para las moléculas de ADN (Ghanem y col., 2013).

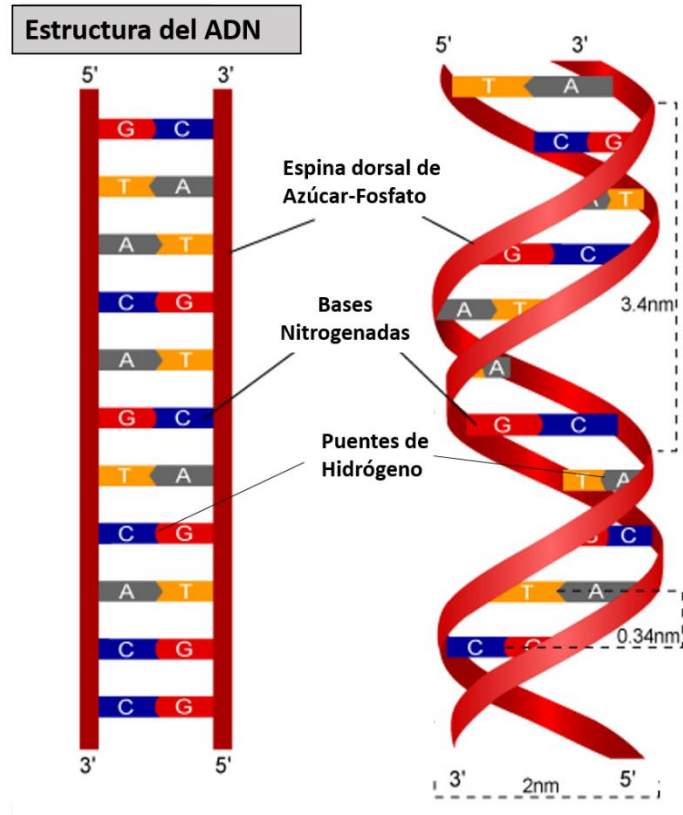


Fig. 4 Estructura del ADN (wikispaces.psu.edu)

Muchas bacterias, poseen además del ADN cromosómico, el denominado ADN plasmídico o plásmidos. Estas moléculas portan información génica útil para una variedad de funciones especiales para la célula, como la resistencia a antibióticos.

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN de doble cadena independiente del cromosoma. Pueden encontrarse más de una copia del mismo plásmido dentro de una misma bacteria. En general los plásmidos de mayor tamaño, se encuentran en pequeñas cantidades dentro de la célula, mientras que los más pequeños pueden estar en hasta 100 copias por célula (plásmidos multicopia).

Además de la forma circular común de los plásmidos, se presentan otras formas tales como la superenrollada y la lineal. El plásmido superenrollado es una molécula de ADN de doble cadena que se enrolla helicoidalmente sobre sí misma y forma su estructura típica. Comúnmente el plásmido superenrollado es el que viaja más rápidamente sobre un gel de agarosa debido a su forma compacta, por el contrario la forma circular abierta lo hace de forma más lenta debido a su forma y diámetro (Iuliano y col., 2002). La Figura 5 muestra las diferentes formas de plásmidos:

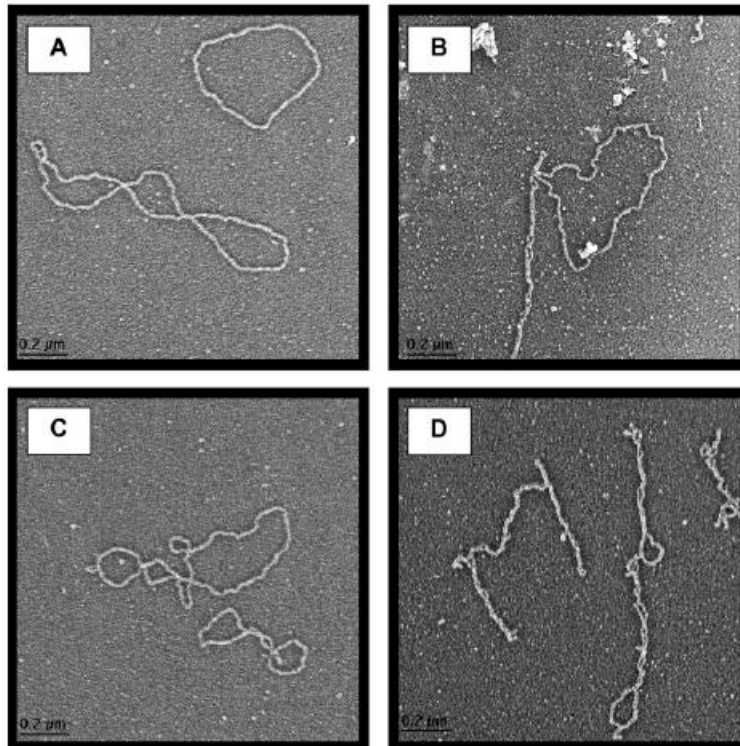


Fig. 5 Plásmidos observados por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, siglas en inglés). (A) Plásmido circular abierto; (B) Plásmido superenrollado y circular abierto; (C) Plásmido relajado; (D) Plásmido superenrollado. (Smith y col., 2007)

Los plásmidos utilizados en terapia génica son producidos comúnmente mediante fermentación de la bacteria *Escherichia coli*. La mayoría de los plásmidos producidos mediante este método son superenrollados que tienen mejores características estructurales para la adaptación, además se obtienen cantidades variables de las isoformas de plásmido circular abierto y lineal. Esta última isoforma se considera indeseable para fines terapéuticos debido a que existe posible riesgo de su integración con el ADN genómico, además que esta forma de plásmido está sujeta a una degradación intracelular más rápida que la del plásmido circular y superenrollado (Prazeres y col., 1998; Smith y col., 2007). La estructura de los plásmidos contiene elementos requeridos para su mantenimiento y propagación en el huésped bacteriano y para la expresión del gen en el huésped humano. (Prather y col., 2003).

2.1.3. El plásmido pVAX1-NH36 y sus características

El plásmido pVAX1 tiene un tamaño de 3 kb, es un vector diseñado para uso en el desarrollo de vacunas de ADN. Fue hecho bajo los requerimientos de la FDA (por sus siglas en inglés, Food and Drug Administration), específicamente en el documento “Puntos a considerar en vacunas de plásmidos de ADN para indicaciones preventivas en enfermedades infecciosas”. Este plásmido contiene un gen de resistencia a la kanamicina para la selección en *E.coli*, además sus características le permiten un alto número de copias en dicha bacteria y una alta expresión de la proteína de interés en las células del huésped (Invitrogen, 2012).

2.1.4. Producción de plásmidos

Para la producción de plásmido de ADN se requiere la transformación bacteriana, proceso que ocurre de forma natural en muchas bacterias, mediante el cual las células captan ADN libre presente en el medio. Bajo determinadas condiciones fisiológicas de la bacteria, se permite la entrada de ácidos nucleicos en ella.

Dichas condiciones fisiológicas son inducidas en laboratorio (en algunos casos) mediante diversos tratamientos químicos o físicos que producen microporos en la célula, permitiendo la introducción de ADN de manera eficiente, un caso común en el que se utilizan este método es en la transformación de *E.Coli* (Iuliano y col., 2002).

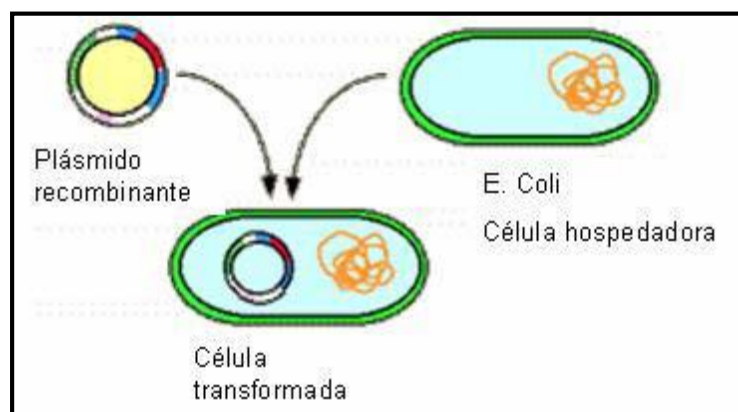


Fig. 5 Esquema de la transformación bacteriana

Fermentación

La selección y diseño del vector de plásmido apropiado para la aplicación deseada, la cepa adecuada para la producción de este vector, determinar las óptimas condiciones de crecimiento de la cepa, al igual que los requisitos de purificación del plásmido posteriores a la fermentación, son algunas de las consideraciones que se deben tomar cuenta en la planificación previa a la producción de un vector como los plásmidos superenrollados (Ferreira y col., 2000).

La etapa de fermentación es muy importante para el proceso de obtención de plásmidos, debido a que es en ella donde se lleva a cabo la propagación celular de la bacteria de interés. La fermentación nos determina la cantidad de bacterias, así como la cantidad y calidad del plásmido que estas contengan según las condiciones a las cuales se lleve a cabo el proceso y las características del medio de cultivo.

Para lograr lo anterior mencionado se debe contar con un balance en los nutrientes requeridos por las células, que les suministrarán el carbono, nitrógeno y sales minerales indispensables para sus funciones metabólicas. Las principales fuentes de carbono son la glucosa y el glicerol, mientras que el nitrógeno es suministrado principalmente por sales de amonio, extracto de levadura y/o triptona (Carnes, 2007).

Para la interpretación de crecimiento celular frecuentemente se utiliza el modelo logístico (Shuler y Kargi, 2001).

$$X(t) = \frac{X_0 e^{\mu t}}{1 - \frac{X_0}{X_\infty} (1 - e^{\mu t})} \quad (1)$$

Donde $X(t)$: Concentración celular, X_0 : Concentración inicial de la biomasa, X_∞ : Concentración de la biomasa cuando “ t ” crece al infinito y μ : Velocidad específica de crecimiento.

Recuperación Primaria

Una vez realizada la fermentación, se procede a la cosecha celular, el rompimiento celular y la clarificación como operaciones de captura del ADN plasmídico. La cosecha celular consiste en separar el medio de cultivo de las células que contienen el producto de interés. Esta etapa puede realizarse por medio de centrifugación o microfiltración convencional. En este paso es eliminada la mayor parte del medio de cultivo que puede ocasionar interferencia para las etapas posteriores (Prather y col., 2003).

Lisis Celular. El rompimiento celular es necesario en muchos procesos en los cuales el producto se encuentra dentro de la célula, existen principalmente dos métodos generales de rompimiento celular, el método químico y el método físico; la Tabla 2 engloba las principales técnicas de lisis y sus principios.

Tabla 2 Métodos y principios de rompimiento celular. (Adaptado de Tejeda y col., 2011)

MÉTODOS	TÉCNICA	PRINCIPIOS
Químicos	Choque Osmótico	Ruptura Osmótica de membrana celular
	Disolución Lipídica	Acción desestabilizadora de solventes orgánicos en pared celular
	Digestión Enzimática	Digestión de la pared celular
	Lisis celular Alcalina	Solubilización de membranas por saponificación de lípidos
	Mecánicos	Molido en perlas
	Homogenización	Rompimiento de células por fuerzas de corte, al pasar por orificios pequeños

Por mucho, la técnica de rompimiento celular más utilizada es el tratamiento alcalino originalmente descrito por Birnboim y Doly (1979). El paso previo a la lisis alcalina, es la resuspensión de la biomasa obtenida del cultivo, con este fin se utiliza un buffer que debe ser capaz de romper los enlaces iónicos o enlaces de hidrógeno entre lípidos y proteínas en la pared celular. La remoción de cationes divalentes (principalmente de Ca y Mg) de la pared celular desestabiliza su estructura, facilitando la ruptura. Típicamente se utiliza EDTA (Ácido Etilendiaminotetra-acético) como agente quelante y se adiciona glucosa con el fin de proteger al plásmido de su ruptura en el proceso de lisis (Prazeres y col., 2001). En la operación de lisis se utiliza una solución de detergentes alcalinos, generalmente Hidróxido de Sodio 0.2M (NaOH) y 1 % de dodecil sulfato de sodio (SDS). Los efectos combinados de ambos compuestos logran romper la membrana celular y producen una cantidad considerable de restos celulares, ADN genómico (ADNg), proteínas y ARN. Enseguida continua la etapa de neutralización con acetato de potasio, en ésta se forman precipitados, materiales altamente gelatinosos por naturaleza que tienden a formar flóculos. Estos flóculos son removidos mediante centrifugación a nivel laboratorio, pero se prefiere la filtración para removerlos en procesos a gran escala (Nunes y col., 2012).

En la actualidad la lisis alcalina ha sido muy utilizada en la producción de plásmidos a pequeña escala, debido a que otros métodos de rompimiento celular pueden dañar la estructura del plásmido (Prather y col., 2003. Diogo y col., 2003).

Clarificación. La solución obtenida en la neutralización del lisado alcalino contiene gran cantidad de flóculos. Para eliminar estos componentes se puede utilizar cualquier operación de separación sólido-líquido. Las operaciones que han sido utilizadas para estos objetivos son la filtración, flotación y centrifugación, ya sea individualmente o en forma combinada. Como se mencionó antes, la centrifugación es la operación más utilizada a nivel laboratorio, sin embargo los sólidos de baja densidad son difíciles de sedimentar aún con una centrifugación prolongada a alta velocidad. (Prazeres y col., 2001).

Como alternativa a la centrifugación, se ha estudiado la filtración con diferentes tipos de materiales. Se han utilizado tierras diatomeas como auxiliares en la filtración, estos materiales tienen la capacidad de adsorber contaminantes tales como proteínas, ADN y ARN, mejorando la pureza del plásmido, pero la co-adsorción del plásmido usualmente representa pérdidas más grandes del 25% (Theodossiou y col., 1997).

Nunes y col., 2012, estudiaron la clarificación de plásmidos mediante microfiltración utilizando membranas con tamaño de poro de 0.2 μm con diafiltración como alternativa a la centrifugación, obteniendo una alta remoción de contaminantes.

En 2007 (Tesis de maestría) Lucero A. estudió la purificación de plásmidos utilizando partículas microporosas y membranas de intercambio iónico, previamente realizó la clarificación de los lisados neutralizados filtración al vacío y una microfiltración en serie con diafiltración utilizando filtros de 5 μm y 0.45 μm respectivamente. Sin embargo, no se analizaron estas etapas de clarificación.

En el año 2013, Padilla A. realizó la clarificación de lisados neutralizados utilizando filtración al vacío con filtros de tamaño de poro de 8-12 μm , seguido de una microfiltración en lecho profundo utilizando filtros cápsula con tamaños de poro de 4 y 8 μm , a flujos de 4 y 6 mL/min. Se obtuvo que para menor tamaño de poro la retención de sólidos en el lecho del filtro es mayor y que utilizando el flujo mayor de operación la retención de sólidos es menor.

En una comparación hecha de MFLP con centrifugación como etapa de clarificación, Padilla concluye que en la MFLP se recupera menor cantidad de plásmido respecto a la centrifugación, posiblemente debido a la retención de esta molécula en los medios filtrantes y recomienda realizar un lavado a estos una vez culminado el proceso.

Recuperación Intermedia

En esta etapa de purificación es donde se elimina la mayor parte de los contaminantes obtenidos en la lisis alcalina, las principales impurezas a remover son el ADNg, proteínas, ARN y endotoxinas. Comúnmente se utilizan procesos de precipitación por solventes y/o sales, extracción en sistemas de dos fases acuosas y ultrafiltración tangencial (Freitas y col., 2009).

En los procesos que conciernen la recuperación intermedia se pretende disminuir no solo los contaminantes producidos en la lisis alcalina, sino también disminuir el volumen a procesar en las siguientes etapas de purificación de plásmidos. El proceso de precipitación consiste en la separación de un soluto soluble de una solución, utilizando agentes precipitantes capaces de producir cambios en las características del soluto, en general la precipitación se puede realizar mediante una disminución de la solubilidad del soluto, por desnaturalización selectiva o por afinidad. Los procesos de precipitación utilizados en la purificación de plásmidos comúnmente utilizan isopropanol, polietilenglicol, bromuro de cetiltrimetilamonio o sales como agentes precipitantes. Los procesos de precipitación usados para la concentración de plásmidos o para la eliminación de impurezas, siempre implican el uso de una etapa posterior de separación sólido-líquido, tales como la centrifugación o filtración (Freitas y col., 2009).

La extracción en sistemas de dos fases acuosas permite separar un soluto de una solución realizando una mezcla de ésta con un solvente. Básicamente esta operación se realiza en dos etapas: 1) mezcla del solvente con la solución a procesar y 2) separación de la mezcla en dos fases inmiscibles. En los procesos de purificación de plásmidos, típicamente se utiliza el polietilenglicol (PEG) (Tejeda y col., 2011; Prazeres, 2004).

La ultrafiltración tangencial es otra opción para la recuperación intermedia de plásmidos, se ha demostrado que el uso de membranas de ultrafiltración tangencial de polietersulfona de 300 kDa a 1,000 kDa, eliminan un 99% de RNA y un 95% de proteínas de lisados clarificados. Es un proceso que puede ser usado en la concentración o purificación de plásmidos, (Eon-Duval y col., 2003; Ager, 2009).

Purificación Final

Las técnicas cromatográficas se utilizan, en general, para realizar la purificación final, ya que se conoce que son eficientes, reproducibles y completamente escalables en el contexto de purificación de plásmidos. Su papel es remover impurezas como ARN, fragmentos de ADNg, endotoxinas y variantes de plásmido no-superenrollado.

El proceso debe generar un producto pDNA que cumpla con las especificaciones de calidad recomendadas por las agencias reguladoras, como son la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA por sus siglas en inglés) y la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA por sus siglas en inglés). Las especificaciones del ADN plasmídico para aplicaciones terapéuticas son las siguientes: apariencia clara (sin color); proteínas no detectable, < 5 µg/mL por el ensayo de Ácido Bicinconínico, (BCA, por sus siglas en inglés); ARN no detectable por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%; ADNg < 5 µg/µg de ADNp, por el ensayo de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y endotoxinas < 0.1 EU/µg pDNA, por el ensayo para detectar endotoxinas asociadas con bacterias gram-negativas, (LAL, Limulus Amebocyte Lysate) (Prazeres et al., 2001). Asimismo, más del 95% del ADNp deberá estar en forma súperenrollada ya que ésta isoforma es más efectiva para la expresión del gen de interés (Smith et al., 2007; Prazeres et al., 2004). Particularmente, es importante la remoción de endotoxinas de la solución, ya que pueden producir síntomas como el del síndrome de choque tóxico si están presente en cantidades nocivas en las dosis aplicadas (Stadler et al., 2004).

Las modalidades cromatográficas tales como exclusión por tamaño (SEC), interacción hidrofóbica (HIC), fase reversa (RPLC) y afinidad (AC), se utilizan solas o combinadas para la purificación de ADN plasmídico (Diogo y col. 2005). Cada una de estas modalidades de la cromatografía presenta ventajas y desventajas, y para hacer una buena elección para un proceso específico se debe tomar en consideración sus principales características (Tabla 3) y la integración de ellas al proceso de purificación específico.

Tabla 3. Características de las técnicas cromatográficas más usada en purificación de plásmido. Adaptado de Diogo y col. (2005)

	Fuerza de separación	Molécula capturada	Condición de recuperación	Etapas del proceso	Selectividad por SC-pDNA
AEC	electrostática	pDNA	Alta concentración de sal	Recuperación intermedia o después de pre-purificación	+++
HIC	Hidrofóbica	RNA y Endotoxinas	Alta concentración de sal aglutinante	después de pre-purificación	+
AC	Secuencia de nucleótidos	pDNA	Baja concentración de sal, pH alcalino	Después de desalar el lisado	++
SEC	Diferencia de tamaño	Depende de la aplicación		Acabado, intercambio de buffer	++

Abreviaturas: AEC = Cromatografía de intercambio iónico; HIC = Cromatografía de interacción hidrofóbica; AC = Cromatografía de afinidad; SEC = Cromatografía de exclusión de tamaño.

2.1.5. Fundamentos de Filtración

La filtración es la operación de separación de sólidos a partir de un fluido mediante el uso de un medio filtrante o pared, bajo el efecto de una fuerza impulsora. En general, la filtración se puede clasificar según la Tabla 4.

Tabla 4. Clasificación general de la Filtración, (Geankoplis, 1998; Harrison, 2003)

Clasificación para Filtración, según:			
Tipo de Operación	Dirección de Flujo	Medio Filtrante	Fuerza Impulsora
-Por lotes	-Perpendicular	-Torta	-Gravedad
-Continua	-Paralelo	-Lecho Profundo	-Diferencial de Presión
		-Membrana	-Centrífuga
			-Diferencial de Concentración

En los procesos biotecnológicos, comúnmente se utiliza la clasificación siguiente: a) Filtración convencional en la cual hay formación de torta, b) filtración de lecho profundo y c) filtración con membranas, en la Figura 7 se muestra esta clasificación. En la filtración convencional los sólidos se depositan sobre el medio filtrante formando una pasta, en la filtración de lecho profundo los sólidos se depositan dentro del medio filtrante y en la filtración por membranas o de flujo cruzado no hay un depósito de sólidos sobre la membrana sino una concentración del caldo (Tejeda y col., 2011).

El tamaño de poro juega un papel muy importante en cualquier tipo de filtración, debido a que con base a este podemos determinar el uso que se le dará. La Figura 6 muestra la clasificación de los diferentes procesos de filtración por membranas y las partículas que retiene.

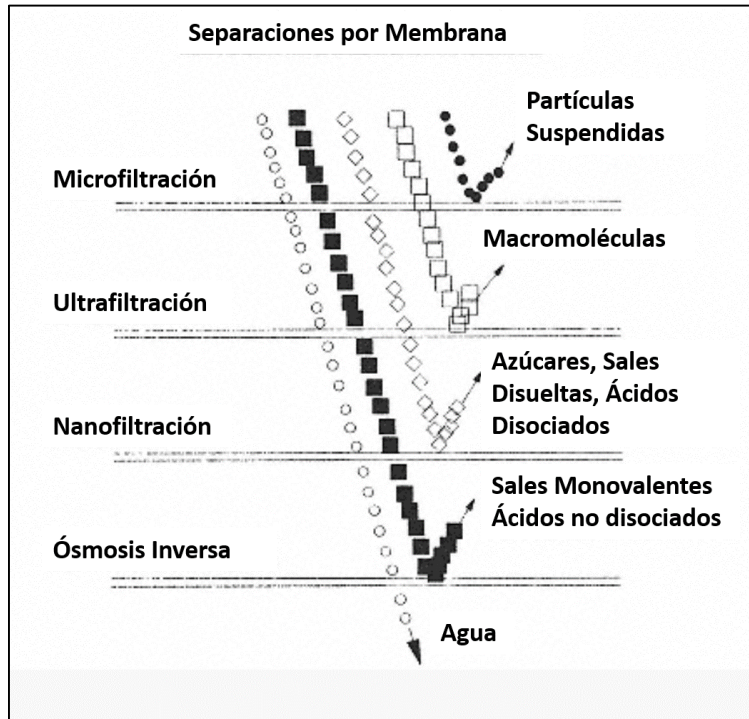


Fig. 6 Principales operaciones de separación por Membranas

Los procesos de filtración con membranas se originan inicialmente ante la necesidad de producir tecnologías más económicas y eficientes. La microfiltración, al igual que todo proceso de separación que usa membranas, permite concentrar un líquido por retención de los componentes de mayor tamaño (retenido) respecto al diámetro del poro de la membrana. El líquido que atraviesa la membrana, denominado permeado, contiene los componentes o partículas de menor diámetro (Coronel, 2012).

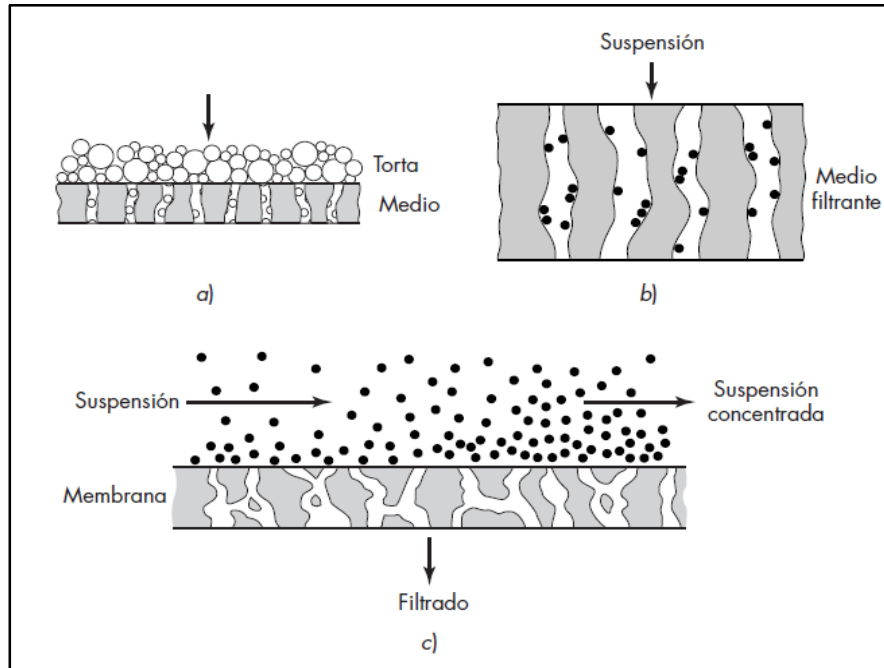


Fig.7 Clasificación general de filtración. (McCabe, 2007)

Cualquier medio filtrante debe cumplir con los siguientes requerimientos para su uso efectivo en un proceso de filtración (McCabe, 2007):

1. Retención de sólidos
2. No obstruirse
3. Contar con resistencia física para soportar las condiciones del proceso
4. Ser químicamente resistente
5. No ser excesivamente caro

2.1.6. Microfiltración de Lecho Profundo

Los procesos de microfiltración se basan comúnmente en la separación de partículas suspendidas en un rango de $0.1 \mu\text{m}$ a $10 \mu\text{m}$ (Jornitz, 2008). En el proceso de microfiltración de lecho profundo, las partículas se eliminan durante el flujo de una solución a través de un lecho granular o medio fibroso. Las pequeñas partículas en suspensión, son retenidas a diferentes profundidades dentro de los poros del lecho. En este proceso las partículas retenidas pueden formar una torta, que desempeña un papel importante en la eliminación adicional de las partículas (Zamani, 2009).

Los filtros de lecho profundo son utilizados en la clarificación de partículas coloides insolubles, además son frecuentemente utilizados en serie con filtro de microfiltración para alcanzar una mayor clarificación del producto de interés en procesos biotecnológicos (Van Reis, 2001).

Los filtros de profundidad, retienen las partículas a lo largo del medio poroso que permite la retención de las partículas más grandes y más pequeñas que el tamaño de los poros. Se cree que la retención de partículas involucra tanto la exclusión por tamaños y adsorción mediante interacción hidrofóbica, iónica entre otras.

Existen filtros de profundidad compuestos de estructuras multicapa con tamaño de poros diferentes que permiten la eliminación de partículas de diferentes tamaños, lo cual conduce a un aumento de la capacidad de filtración y mejora la eficiencia del proceso (Roush y Lu, 2008).

En los procesos de filtración se presentan taponamientos del medio filtrante, un indicador de cuanto volumen se puede filtrar antes de que ocurra dicho taponamiento es la capacidad del medio filtrante. La capacidad durante una operación a presión constante es definida como la cantidad de fluido por área de filtro que puede ser procesada hasta que el caudal disminuya a una fracción establecida del flujo inicial. La capacidad bajo condiciones de caudal fijo se determina cuando la presión aumenta hasta cierto rango del valor inicial (Hermia, 1982).

Los filtros de lecho profundo son frecuentemente usados en procesos biotecnológicos para remover restos celulares y otras partículas. La capacidad del filtro indica cuanto volumen puede ser filtrada por este hasta que llegue al taponamiento. La capacidad del filtro bajo condiciones de flujo constante es determinada cuando la presión incrementa a un determinado múltiplo del valor inicial.

El ensuciamiento de un filtro puede ocurrir por deposición de partículas dentro del filtro o la parte superior. En el ensuciamiento dentro del filtro se asume que las partículas son acumuladas en las paredes de los poros, conforme las partículas son depositadas en las paredes, el espacio vacío del filtro es reducido, provocando de igual manera disminución en la permeabilidad del filtro. Para este mecanismo de taponamiento de filtros, Bolton (2005) ha desarrollado un modelo alternativo que considera la estructura de los filtros de lecho profundo como una matriz de fibras acomodadas al azar.

Este modelo asume que los sólidos recubren la superficie de las fibras, haciéndolos más gruesos y reduciendo la permeabilidad del filtro. Para desarrollar este modelo primeramente se relaciona el radio de la fibra al volumen de sólidos removidos:

$$L_F 2\pi r_f dr_f = \left(\frac{c}{1-\varepsilon}\right) AdV \quad (2)$$

Integrando la Ec. 1:

$$\pi L_F (r_f^2 - r_{f0}^2) = \left(\frac{c}{1-\varepsilon}\right) AV \quad (3)$$

Donde r_f es el radio de las fibras, L_F es la longitud total de todas las fibras, c es el volumen de sólidos por unidad de volumen filtrado, ε es la porosidad de los sólidos cuando son depositados en las fibras, y V es el volumen procesado, normalizado por unidad de área del filtro, A .

La fracción sólida del filtro ϕ_0 está relacionada con el radio de la fibra y el espesor del filtro L_M , y otros parámetros.

$$\phi_0 = \frac{\pi r_{f0}^2 L_F}{L_M A} \quad (4)$$

El subíndice "0" indica valores iniciales. Después de que ocurre el recubrimiento de las fibras, la nueva fracción sólida del filtro puede ser relacionada al nuevo radio de las fibras como lo muestra la ecuación 4:

$$\phi = \frac{\pi r_f^2 L_F}{L_M A} = \phi_0 \left(\frac{r_f}{r_{f0}}\right)^2 \quad (5)$$

Aunque se asume que los sólidos depositados en las fibras son porosos en la Ec. 2, en la Ec. 4 se asume que los sólidos son no porosos.

El término V_{max} describe la cantidad de solución que puede ser filtrada hasta que el volumen vacío del filtro sea llenado completamente con sólidos. La constante de recubrimiento de fibra K_f es igual a la inversa de V_{max} . Mediante un balance de materia de sólidos en el volumen del filtro, V_{max} se calcula:

$$V_{max} = \frac{1}{K_f} = L_M \left(\frac{1-\varepsilon}{c} \right) (1 - \phi_0) \quad (6)$$

Adecuando la Ec. 3 en una expresión para L_F y sustituyendo en la Ec. 2, se obtiene la Ec. 6, donde se permite el cálculo de r_f y ϕ a partir de V y otras constantes: $L_M, c, \varepsilon, \text{ y } \phi_0$. La combinación con la Ec. 5 lo reduce a dos constantes físicas, K_f y ϕ_0 .

$$\frac{r_f^2}{r_{f0}^2} = \frac{\phi}{\phi_0} = \left[1 + \left(\frac{c}{1-\varepsilon} \right) \frac{V}{L_M \phi_0} \right] = \left[1 + \frac{(1-\phi_0)}{\phi_0} K_f V \right] \quad (7)$$

Combinando la Ec. 6 con un modelo teórico que relaciona la permeabilidad hidráulica con el radio de la fibra se puede derivar un modelo de recubrimiento de filtro que relacione la permeabilidad con el volumen filtrado. El modelo de Carman-Kozeny:

$$\frac{\kappa}{r_f^2} = \frac{(1-\phi)^3}{20\phi^2} \quad (8)$$

Donde κ es la permeabilidad del filtro Darcy, que fue desarrollada por extensión de una correlación entre el número de Reynolds y el factor de fricción para flujo laminar a través de tuberías que fluye por medio poroso. También se ha utilizado para describir el flujo a través de medio fibroso. El flujo a través del filtro (dV/dt) puede ser calculado a través de la ley de Darcy como:

$$\frac{dV}{dt} = \kappa \frac{\Delta P}{\mu L_M} \quad (9)$$

Donde ΔP es la presión transmembrana y μ es la viscosidad de la solución. Para obtener las ecuaciones del modelo de recubrimiento de fibras, la Ec. 6 puede ser sustituida en las Ec. 7 y 8 para determinar el flux como una función del volumen para experimentos de filtración a presión constante.

$$\frac{dV}{dt} = \left(\frac{\Delta P}{\mu L_M} \right) \frac{r_f^2 (1-\phi)^3}{20\phi^2} = \frac{J_0 (1-K_f V)^3}{\left[1 + \frac{(1-\phi_0)}{\phi_0} K_f V \right]} \quad (10)$$

Donde J_0 es el flux inicial. Para experimentos a flujo constante la Ec. 9 puede ser rearrreglada para obtener la Ec. 10, con la cual se puede determinar la presión como función del tiempo. En esta ecuación $V = J_0 t$.

$$\frac{\Delta P}{\Delta P_0} = \frac{\left[1 + \frac{(1-\phi_0)K_f V}{\phi_0}\right]}{(1-K_f V)^3} \quad (11)$$

2.1.7. Microfiltración de Flujo Tangencial

La filtración tangencial, al igual que la filtración convencional, es un proceso de separación cuya fuerza impulsora es la presión. Como se muestra en la Figura 7(c), la solución a procesar fluye por la superficie de la membrana y solamente una pequeña fracción del solvente y soluto pasan a través de ella. Esto implica que el fluido que no se filtró por la membrana sea recirculado, ocasionando así una menor deposición de sólidos en la membrana y se mantiene el flujo constante sin incremento en la presión.

La filtración tangencial puede ser dividida en microfiltración y ultrafiltración según el tamaño de poro de la membrana. La microfiltración tangencial comúnmente es utilizada en tamaños de poro que van desde los 0.05 μm a 1.0 μm , mientras que en la ultrafiltración se utilizan membranas que van desde 1 a 1000 kDa.

En estos sistemas se utiliza el término presión transmembrana (TMP, por sus siglas en inglés), que corresponde al promedio de las presiones de entrada y salida del sistema menos la presión en el permeado:

$$TMP = \frac{P_i + P_o}{2} - P_p \quad (12)$$

El flux está en función de este parámetro y de la velocidad del flujo cruzado. Teóricamente el flux puede incrementarse tanto como sean incrementados estos parámetros. (Tejeda y col., 2011; Shukla y col., 2007).

Típicamente este proceso se opera bajo una presión transmembrana constante (Li y col, 1998). La MFLP es usada comúnmente para aplicaciones en el laboratorio para pequeños volúmenes, mientras que la MFFT es recomendada para aplicaciones a mayor escala (Rayat y col., 2014).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se describen primeramente los materiales utilizados en cada etapa, se presentan los equipos que se utilizaron y se establecen los procedimientos seguidos en el transcurso de la experimentación.

3.1 Materiales

Se utilizó la bacteria *E. coli*, conteniendo al plásmido pVAX1-NH36. Esta bacteria fue suministrada por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).

En cada una de las tres fermentaciones realizadas se usó el medio TB (Terrific Broth) que está constituido por 12 g/L de triptona, 24 g/L de extracto de levadura y 37.86 g/L de glicerol y las sales KH_2PO_4 (0.17 M) y K_2HPO_4 (0.72 M).

La lisis se efectuó en todos los casos por medio del método alcalino, utilizando tres buffers: de resuspensión de biomasa, de lisis y de neutralización. El Buffer de Resuspensión está compuesto por Tris base 25 mM, EDTA 1 mM y Glucosa 50 mM, a un pH=8. El buffer de Lisis contiene NaOH 0.2 M y SDS al 1%. Por último el buffer de Neutralización se compone por Acetato de Potasio 3M y Ácido Acético Glacial para regular el pH a 5.5. En los lavados de las filtro, el microfiltro y la membrana de fibra hueca, se utilizó el buffer Tris base 10 mM con un pH=8. Todas las soluciones pasaron por una etapa de microfiltración al vacío con microfiltros de 0.45 μm de tamaño de poro, con el objetivo de eliminar la presencia de cualquier contaminante que pudiese afectar en el análisis de las muestras.

Los análisis electroforéticos se realizaron en un gel de Agarosa al 0.8 % en el cual se agregaron las muestras previamente preparadas con 5 μL de muestras y 5 μL de buffer de carga (colorante). En el caso de la cuantificación del plásmido por cromatografía se utilizó sulfato de amonio 1.5 M en Tris 10 mM/ HCl pH 8 y una solución Tris 10mM/ HCl pH 8.

3.2 Equipos

Los equipos utilizados en esta investigación se encuentran en el laboratorio de Bioprocesos en el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) y en el Laboratorio de Biotecnología en el Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia. Se presentan los equipos y una breve descripción de su uso.

La primera fermentación se realizó en un biorreactor Applikon ez-control con una temperatura de 37°C, una agitación al medio de 610 rpm, un pH de 7.0 y una operación por lotes. El inóculo se preparó anteriormente en matraz, en el cual se obtuvo un volumen de 200 mL, este volumen se introdujo al biorreactor en condiciones estériles, el cual previamente contenía el medio TB (Terrific Broth) esterilizado en conjunto con todas las conexiones y componentes.



Fig. 8 Bioreactor Applikon ez-control.

Las fermentaciones posteriores se realizaron en matraz, con el mismo medio de cultivo. La agitación para los cultivos en matraz se realizó en una incubadora VWR a 260 rpm y una temperatura controlada de 37°C.



Fig. 9 Incubadora VWR.

La cosecha celular se llevó a cabo mediante centrifugación, en una centrífuga refrigerada de marca Allegra X 22-R de Beckman Coulter® perteneciente al Laboratorio de Biotecnología en el DIQyM.



Fig. 10 Centrífuga Allegra X-22R

Después de esto se realizó una clarificación por filtración al vacío. En un embudo Büchner se colocaron filtro de tamaño de poro de 8 a 12 μm de la marca Hach y bajo este arreglo se colocó herméticamente un matraz kitasato conectado a una bomba de vacío de la marca Millipore.



Fig. 11 Sistema de filtración a vacío.

La operación de microfiltración se realizó en un microfiltro de la marca Sartoclear P, con 25 cm^2 de área de filtración y tamaño de poro de 8 μm . La alimentación para la microfiltración en lecho profundo y tangencial fue suministrada por una bomba peristáltica de la marca Masterflex Cole-Parmer modelo 7553-70 y cabezal modelo 7014-21.



Fig. 12 Microfiltro tipo Cápsula, Sartoclear P.



Fig. 13 Sistema de Microfiltración a Lecho Profundo, Bomba peristáltica (izquierda), soporte universal con microfiltro cápsula (centro), probeta para filtrado y controlador de velocidad (derecha).

Con la finalidad de conocer el comportamiento de la presión en cada microfiltración, se colocaron sensores de presión en la entrada y salida del sistema, mientras que el transductor de presión PRT-DPM-3T de la marca General Electric mostraba la presión en pantalla.



Fig. 14 Transductor de Presión

En el caso de la clarificación mediante microfiltración tangencial se utilizó una membrana de fibra hueca de polisulfona con tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ y 16 cm^2 de área de filtración compartida entre las 2 fibras que componen el cartucho. El sistema utilizado en este caso es similar al utilizado en la microfiltración a lecho profundo, pero se adiciona al sistema una salida para el permeado.



Fig. 15 Sistema de Microfiltración Tangencial

Enseguida se muestran los equipos utilizados en los métodos de análisis por electroforesis, además de otros equipos e instrumentos diversos de gran utilidad.

En este tipo de investigación es requerida una alta calidad del agua, la cual era suministrada por el equipo de la marca Millipore, Direct Q.



Fig. 16 Desmineralizador de agua, Direct Q, Millipore.

En el análisis de muestras mediante turbidez de algunas etapas del proceso, se utilizó el turbidímetro Oakton T-100.



Fig. 17 Turbidímetro Oakton T-100

Los análisis electroforéticos se realizaron en una cámara horizontal de electroforesis GT Minigel Casting System, se utilizó el equipo MultiDoc Digital Imaging System, Trans UV de Biorad, para tomar la fotografía al gel en estudio.

La cromatografía se llevó a cabo en un cromatografo Aktapurifier 10-UPC, con una columna HIC-Source 15 PHE.



Fig. 18 MultiDoc Digital System

3.3 Metodología

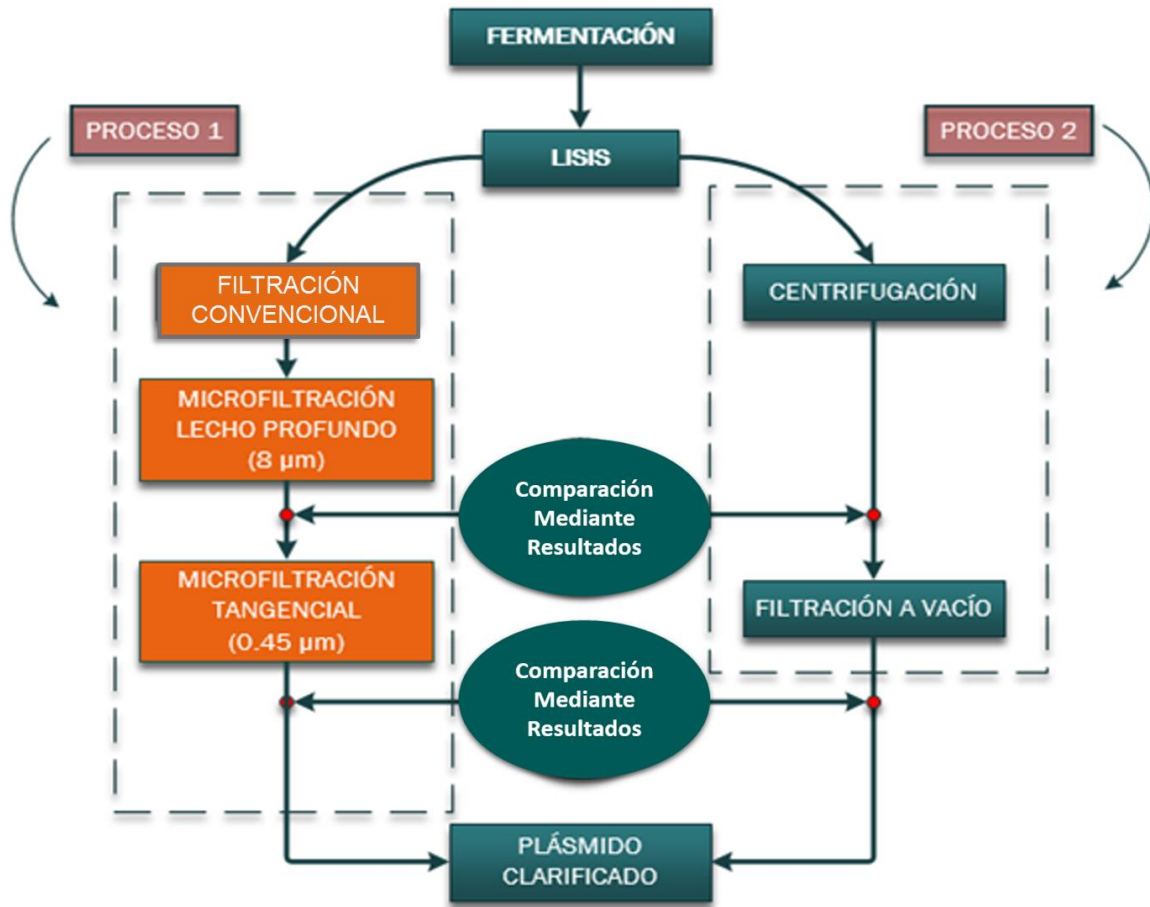


Fig. 19 Esquema principal de metodología en la clarificación del plásmido pVAX-NH36

En este apartado se establecen los procedimientos seguidos para cada una de las etapas que componen a este proyecto. En la Figura 19 se muestra la metodología utilizada, a partir de la lisis celular se siguieron dos procesos. Los recuadros naranja corresponde al Proceso 1 propuesto y los recuadros oscuros al Proceso 2 o convencional.

Debido a que los procedimientos seguidos en el trabajo realizado en laboratorio involucran más de una corrida, es preciso especificar los pasos seguidos en las etapas de los procesos. Los siguientes esquemas representan la metodología específica en cada una de las fermentaciones, estos procedimientos están basados en la metodología principal mostrada en la Figura 19.

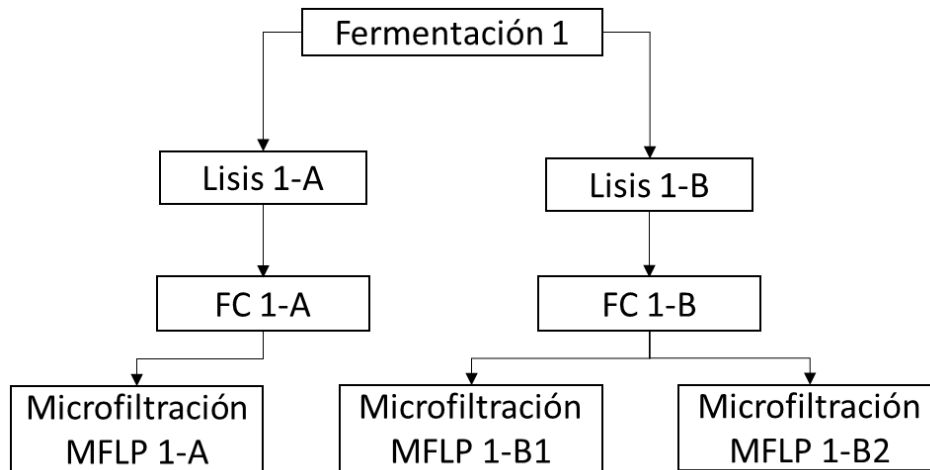


Fig. 20 Esquema de etapas de recuperación de plásmidos en la Fermentación 1.

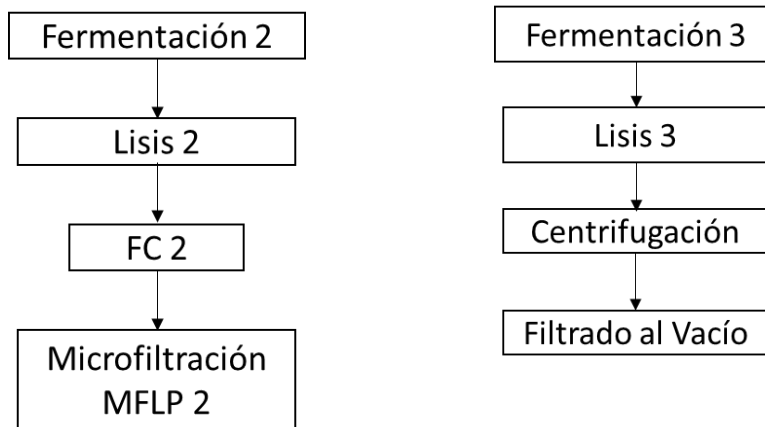


Fig. 21 Esquemas de etapas de recuperación de plásmidos en la Fermentación 2 y en la Fermentación 3.

3.3.1. Fermentación

En total se desarrollan tres fermentaciones, la primera y segunda se utilizan en el Proceso 1, mientras que la tercera fermentación en el Proceso 2. Como ya se mencionó anteriormente la primera fermentación se realizó en un biorreactor y las otras se hicieron en matraz.

En cada una de las fermentaciones primero se realizó una inoculación de la bacteria introduciendo 2 mL de inóculo en 18 mL de medio TB (contenidos en un matraz de 200 mL), con el objetivo de promover el crecimiento celular. Una vez hecha esta inoculación se procedía con la fermentación.

Para la fermentación en matraz, el inóculo de 20 mL se colocaba en un matraz de 2 L con un volumen de medio de 180 mL, este medio ya se encontraba previamente esterilizado, se adicionó kanamicina al medio para inhibir el crecimiento de colonias de otras bacterias no pertenecientes a la especie *E.coli*.

El procedimiento anteriormente mencionado se efectuó para cada una de las fermentaciones, en el caso de la fermentación en biorreactor el fermentado de 200 mL fue el inóculo para 1 800 mL de medio de cultivo TB.

3.3.2. Recuperación primaria

La recuperación primaria consiste comúnmente en 3 operaciones: cosecha celular, lisis (o ruptura celular) y clarificación. La cosecha celular se realiza por centrifugación con el fin de separar la biomasa del medio de cultivo. En la centrifugación realizada para la cosecha fue a 12000 g por 40 minutos.

Lisis

La ruptura celular (alcalina) consta de 3 pasos: resuspensión, lisis y neutralización. La biomasa cosechada se resuspendió en buffer Tris 25 mM, EDTA 10 mM y glucosa 50 mM, pH 8.0 (proporción 8 mL/g de biomasa). Para realizar la lisis alcalina se agregó un volumen igual de buffer de lisis (NaOH 0.2 M y 1% SDS). Posteriormente se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se neutralizó el lisado con un volumen igual de una solución de acetato de potasio 3.0 M a pH 5.5 y 4 C, se agita suavemente y se incubó en hielo por 10 minutos.

Filtración Convencional (FC)

La filtración convencional es la etapa del proceso para eliminar los flóculos y precipitados resultantes de la lisis celular, realizada en el Proceso 1. Se lleva a cabo al vacío, utilizando un sistema como se muestra en la Figura 11, consta de un matraz kitasato conectado directamente a una bomba de vacío, un embudo Büchner que contiene un arreglo de filtros con tamaño de poro variable de 8 a 12 μm . Cada arreglo de filtros consta de 3, formando un lecho de filtración. Estos arreglos de 3 filtro se utilizaron para las primeras 3 filtraciones, en el caso de la FC 2 se utilizó un arreglo de 9 filtro.

De acuerdo a la Fig.22, el lisado neutralizado obtenido en la etapa anterior se colocó sobre el arreglo de clarificación, se espera que el lisado sea separado en dos fases, una fase líquida y una fase con flóculos retenida en el filtro. Los flóculos son apartados en un vaso de precipitados donde se les mide el volumen húmedo; después se colocan sobre un nuevo arreglo de filtro y se lavan con buffer Tris 10 mM. El volumen de buffer de lavado es igual al volumen ocupado por los flóculos. De igual forma se lavan los filtros. Estos lavados son con el fin de recuperar la mayor cantidad de plásmido del lisado. Los lavados de flóculos y filtros se analizan en gel de electroforesis y cromatografía, para determinar la pertinencia de agregar el volumen de lavado al volumen de filtrado.

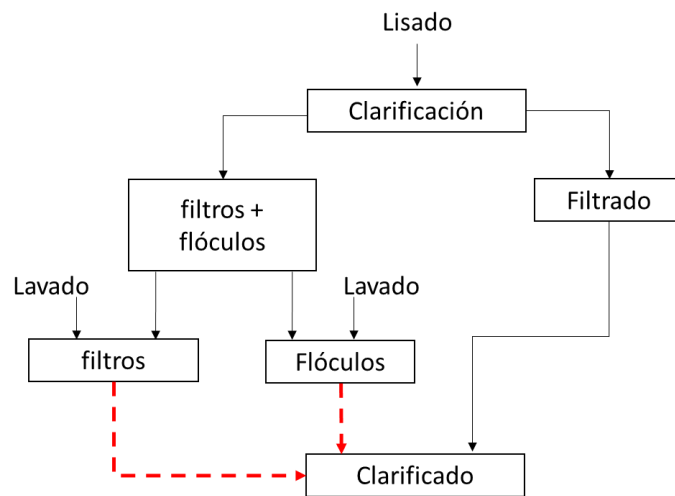


Fig. 22 Procedimiento en la etapa de FC.

Microfiltración de lecho profundo (MFLP)

En esta etapa se utiliza el clarificado obtenido en la etapa anterior, el procedimiento es el siguiente. Se coloca en un vaso de precipitados la cantidad de solución a procesar, se hace pasar por un microfiltro tipo cápsula de tamaño de poro de 8 µm a un flujo constante de 6 mL/min. A diferentes tiempos se toma una muestra del filtrado para su posterior análisis. El proceso se termina al agotarse totalmente el volumen de alimentación.

En esta etapa también se realizaron lavados de los microfiltros y se analiza la solución obtenida con el fin de determinar la conveniencia de incorporar el volumen de lavado al de filtrado para recuperar la cantidad de plásmido retenido en el microfiltro. El volumen de lavado del microfiltro fue proporcional al volumen total filtrado por este. Se utilizaron diferentes presiones en los proceso de MFLP.

El lavado previo del microfiltro consiste en hacer pasar agua desionizada por este a un flujo de 10 mL/min y un volumen de 250 mL.

En la Figura 23 se observa el esquema del proceso de microfiltración de lecho profundo:

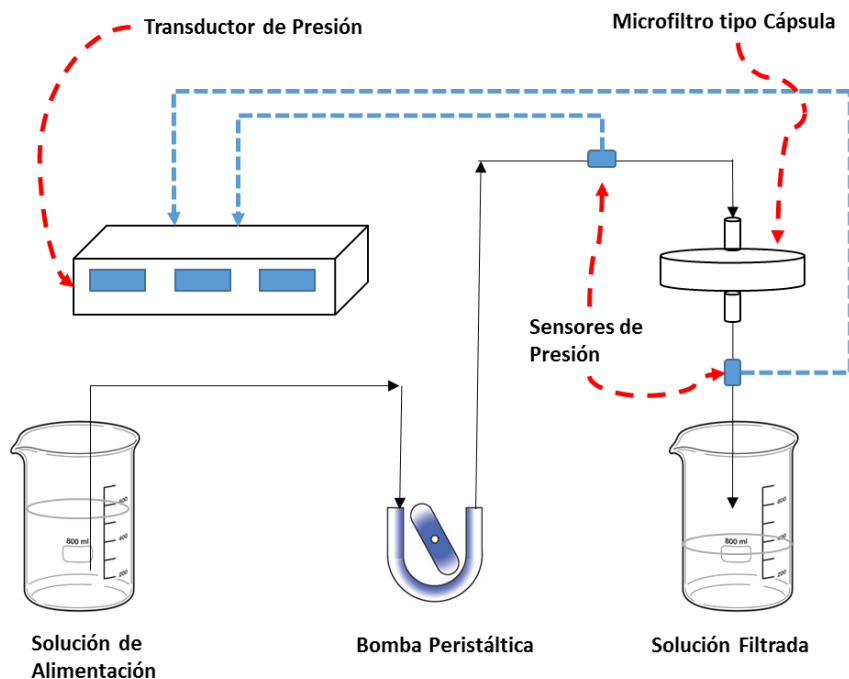


Fig. 23 Esquema de la etapa de MFLP

En las corridas de MFLP se toman datos de presión a diferentes tiempos. Se utiliza el modelo realizado por Bolton (2005) en la Ec. 11 para ajustarlo a los datos obtenidos en la experimentación y se calcula el coeficiente de correlación R^2 del ajuste, Ec. 13, (Motulsky y Christopoulos 2004).

$$R^2 = 1.0 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{cal})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (13)$$

Donde y_i son los datos experimentales a cada tiempo i , \bar{y} es su promedio y y_{cal} son los valores calculados en cada caso.

Microfiltración de flujo tangencial (MFFT)

Este proceso solo se realiza con todo el volumen mezclado obtenido en las microfiltraciones anteriores y el procedimiento es el siguiente. Al igual que en la microfiltración a lecho profundo, se dispone del volumen a procesar en un vaso de precipitados, se hace pasar por una membrana de microfiltración de fibra hueca de tamaño de poro de 0.45 μm con la ayuda de una bomba peristáltica. El flujo de alimentación es de 40 mL/min, las presiones se mantienen constantes en la alimentación, permeado y en la recirculación. El acondicionamiento de la membrana de microfiltración tangencial se muestra en el Anexo A.

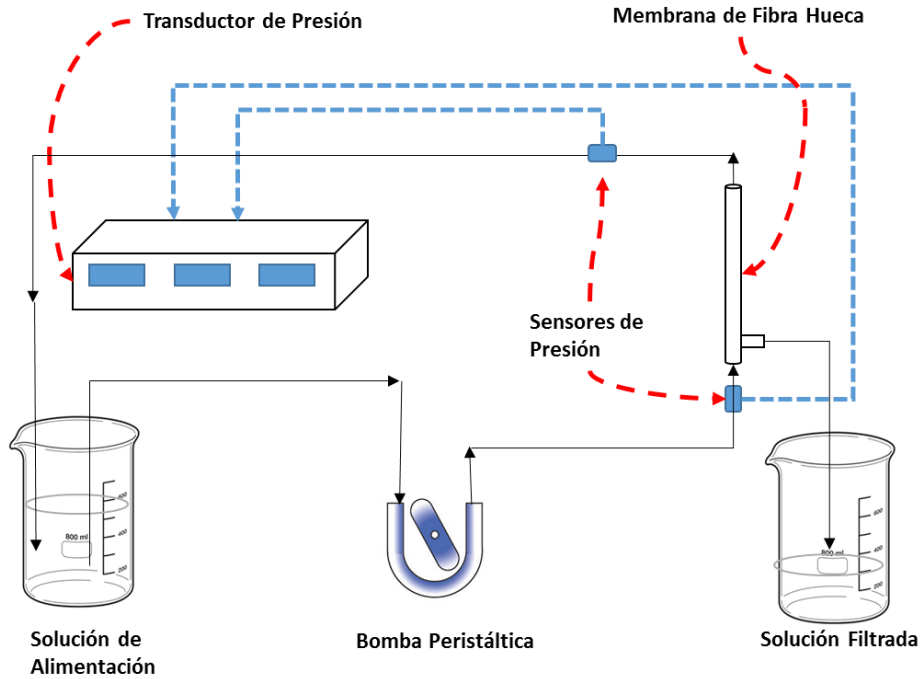


Fig. 24 Esquema de la etapa de MFFT

3.3.3. Análisis de turbidez

Los análisis de turbidez se realizan a muestras tomadas en el inicio y final de los procesos de MF y MT. Para todas las microfiltraciones de lecho profundo se realizaron diluciones excepto para la microfiltración 3 y microfiltración tangencial, en las cuales se utilizaron 10 mL de solución filtrada en cada muestra para análisis de turbidez.

El procedimiento respecto a este análisis se efectuó siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante del turbidímetro Oakton T-100, se encuentra en el Anexo B.

3.3.4. Análisis electroforético

Este análisis se efectúa con el fin de confirmar la presencia del plásmido en las muestras tomadas en las operaciones del proceso. El análisis electroforético se llevó a cabo en gel de agarosa al 0.8 %, el procedimiento es el siguiente:

1.- Preparación del gel de agarosa: En este paso se preparara el medio en el cual se coloca la muestra a analizar, se compone por 0.8 g de agarosa en 100 mL de buffer TAE. Es necesario elevar la

temperatura para lograr una mejor disolución, después se coloca en la placa y se deja enfriar para formar el gel.

2.-Preparación de muestras: En un papel parafilm se agregan 2 μL de colorante de carga blue/Orange 6x, a esto se le adicionan 10 μL de muestra y se homogeniza esta mezcla. En cada prueba de electroforesis se coloca en el primer pozo el marcador de peso molecular (supercoiled DNA Ladder) con el mismo colorante de carga. El segundo pozo contiene plásmido purificado y en los pozos restantes se colocan las muestras a analizar. Para esto es necesario, colocar con anticipación, la placa de gel en el equipo y adicionar buffer TAE 1X hasta que sobrepase la superficie.

3.-Puesta en marcha y fotografía: Después de esto se tapa al mismo tiempo que se conectan los electrodos (negativo arriba, en el lado cercano a los pozos). Se ajusta el voltaje a 80 V, se enciende el equipo para que trabaje por un lapso aproximado de 1 hora con 15 minutos, hasta que las bandas se vean cerca de la salida.

En este momento se apaga el equipo y se procede a colocar la placa de gel en un baño de bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 20 minutos y después en un baño de agua desionizada por 20 min para lavar. Después se procede a tomar la fotografía en el equipo MultiDoc Digital System.

3.3.5. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-HIC)

Este análisis permite conocer la concentración de plásmido en cualquier muestra obtenida en el proceso. Se utilizó una columna de interacción hidrofóbica de la marca HIC Source 15 PHE de 0.46 x 10 cm acoplada al sistema Äkta Purifier. Primeramente se preparan las muestras en un Eppendorf, 100 μL de muestra en 400 μL de buffer de equilibrio (sulfato de amonio 1.5 M en tris 10 mM/HCl pH=8), se homogeniza la mezcla y se carga 100 μL al equipo manualmente, por medio del loop de inyección. Realizado lo anterior la columna se equilibra utilizando el buffer de equilibrio por un lapso aprox. de 1.7 min con un flujo de 1 mL/min.

Las isoformas del plásmido son eluidas primeramente y forman parte de un solo pico. Obtenido este pico la concentración del buffer de equilibrio es llevada a cero, para dar paso a la inyección del buffer Tris 10 mM/HCl pH=8, durante un minuto, para eluir las especies absorbidas. Después de esto se vuelve a equilibrar la columna haciendo pasar de nuevo sulfato de amonio durante 5.5 min y se deja la columna lista para el siguiente análisis.

En este tipo de análisis, se obtienen por lo regular 4 picos, el pico observado a los 0.68 min (aprox.) corresponde a pDNA total; el pico a los 3.58 min corresponde a RNA de alto peso molecular y gDNA y los otros picos (1.28 y 1.75 min) se atribuyen a RNA de bajo peso molecular y proteínas remanentes, de acuerdo al estudio hecho por Diogo y col., (2003).

Para determinar la concentración del plásmido es necesario contar con una curva estándar (Anexo C), que relaciona concentración de plásmido con área del pico los 0.68 min, de la cual se obtiene una ecuación lineal. Esta curva se prepara realizando el método mencionado para HPLC-HIC a soluciones con concentraciones conocidas de plásmido purificado por medio de un kit comercial. Para cada solución inyectada, se asocia el área del pico de ADNp obtenido en el cromatograma a la concentración conocida.

El área total en los cromatogramas de las muestras se corrige restando el área total del área total del blanco. El blanco de los lisados neutralizados se obtiene mezclando en proporciones iguales los buffers de resuspensión, lisis y neutralización, el blanco de las soluciones filtradas es el buffer Tris 10 mM.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Fermentación

Las fermentaciones realizadas en esta investigación se efectuaron en biorreactor y matraz. Para la primera fermentación, la cual se efectuó en el biorreactor Applikon, se obtuvo la siguiente curva de crecimiento con lecturas hechas a diferentes tiempos del proceso, a una densidad óptica de 600nm (DO_{600}). Los datos de velocidad específica de crecimiento, μ y X_{∞} se calcularon utilizando la ecuación logística, Ec.(1), por medio de la función *nlinfit* de Matlab.

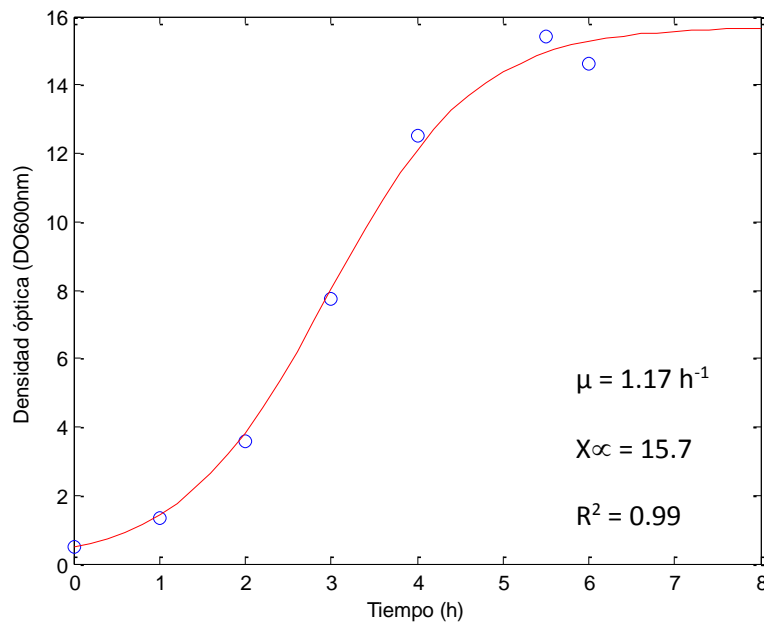


Fig. 25 Curva de crecimiento para la Fermentación 1, efectuada en el biorreactor Applikon.

Las siguientes figuras representan el crecimiento celular para cultivos en matraz:

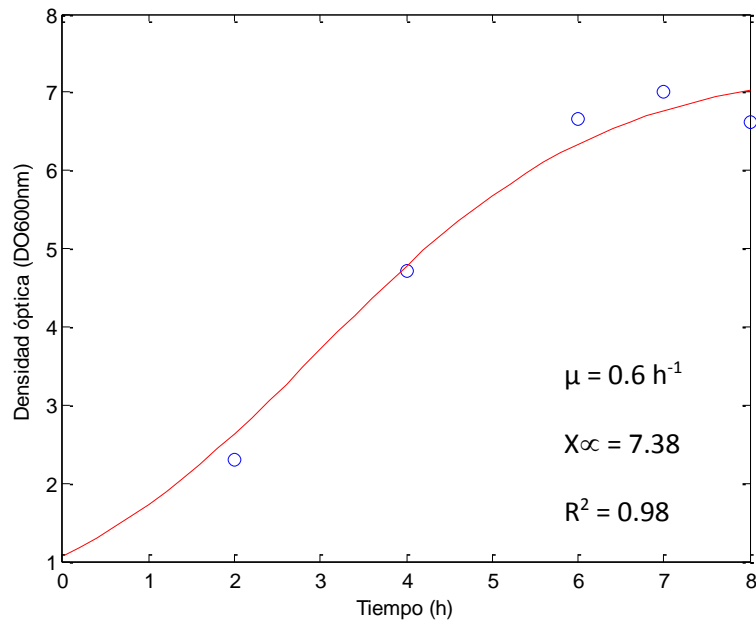


Fig. 26 Curva de crecimiento para la Fermentación 2, efectuada en matraz.

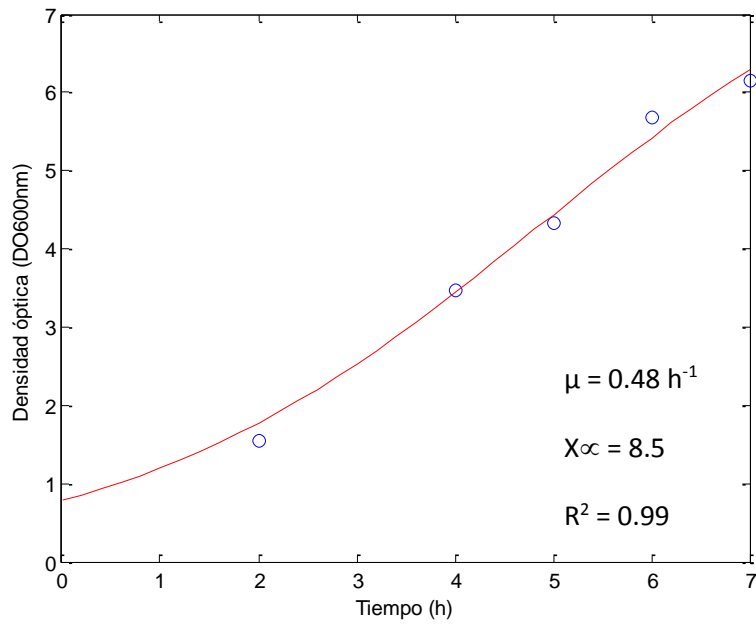


Fig. 27 Curva de crecimiento para la Fermentación 3, efectuada en matraz.

Cada fermentación fue detenida una vez que se llegó a la fase estacionaria, en ese punto se sometía el cultivo a refrigeración, para después ser utilizado. Se puede observar que en estas curvas de crecimiento, el cultivo realizado en biorreactor (Fermentación 1), tuvo una mayor DO que los cultivos en matraz, lo cual significa que hay mayor crecimiento bacteriano debido a que en un biorreactor se tiene la ventaja de poder controlar con mayor precisión las condiciones a las cual se efectúa el proceso.

En la Fermentación 1 se utilizaron 480 mL del cultivo para el Proceso 1. En la Tabla 5 se especifican los volúmenes obtenidos en cada fermentación, la densidad óptica alcanzada y en qué proceso fue utilizado.

Tabla 5. Datos finales de las fermentaciones realizadas

FERMENTACIÓN	Vol. de cultivo (mL)	DO₆₀₀	Indice de masa (mL)(DO)	Utilizados en:
1	480	14.64	7027.20	Proceso 1
2	850	6.15	5227.50	Proceso 1
3	545	6.61	3602.45	Proceso 2

4.2 Recuperación primaria en el Proceso 1

Las fermentaciones 1 y 2 se procesaron por separado hasta la MFLP, en total se realizaron cuatro microfiltraciones de lecho profundo. Los volúmenes de cada una de estas MFLP se colectaron en un matraz para utilizar el volumen total en la MFFT, etapa final para el Proceso 1. La Fermentación 3 se utilizó solo para el Proceso 2 mencionado en la metodología.

4.2.1. Lisis Celular

Lisis Celular (Lotes 1-A y 1-B) para biomasa de la fermentación 1

De la Fermentación 1 se obtuvieron 480 mL de cultivo, se prosiguió con la cosecha celular, mediante centrifugación a 12000 g por 40 min y 4°C. Se pesaron los recipientes vacíos. Después de centrifugar y eliminar el sobrenadante se pesó cada recipiente y por diferencia con el peso inicial se obtuvo peso de la biomasa.

Con la biomasa obtenida se procedió a hacer la lisis celular de acuerdo a la metodología. Los resultados se muestran en la Tabla 6. El lisado recuperado se utilizó en las filtraciones convencionales 1-A y 1-B.

De la Fermentación 2 se utilizaron 850 mL de cultivo, se continuó con la cosecha celular, de forma semejante como se procesó el lote anterior, el resultado se muestra en la Tabla 6. El lisado obtenido en esta etapa se utilizó para la FC 2.

La biomasa obtenida en la Fermentación 3, una vez realizada la cosecha celular, se procesó en la lisis alcalina, los resultados de este lote se observan en la Tabla 6. El lisado obtenido de esta biomasa fue utilizado en la clarificación por centrifugación.

Tabla 6 Biomasa obtenida y concentración celular en los cultivos de las fermentaciones 1, 2 y 3.

Lote	Volumen de cultivo	Peso Biomasa	Concentración	Volumen de lisado
	(mL)	(g)	(g células/mL Cultivo)	(mL)
1-A	240	7.462	0.0311	179
1-B	240	7.128	0.0297	171
2	850	10.653	0.0124	255
3	545	8.03	0.0147	193.2

4.2.2. Filtración convencional

Filtración convencional 1-A y 1-B

Las FC 1-A y 1-B se realizaron cada una con 3 arreglos de 3 filtros de microfiltración con tamaño de poro de 8-12 μm cada uno, de acuerdo al procedimiento descrito en la Figura 22. La filtración transcurría hasta que los flóculos impedían el paso del lisado, en ese momento se apagaba la bomba y se apartaban los flóculos restantes para su posterior lavado. Una vez liberados los filtros de la mayor cantidad posible de flóculos se lavaban con el mismo volumen de filtrado. Los resultados obtenidos en cuanto a volúmenes de filtrado, de lavado de flóculos y lavado de filtros, se resume en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados generales de las FC 1-A y 1-B

Clarificado	Filtrado	Lavado de Filtros	Lavado de Flóculos
	(mL)	(mL)	(mL)
1-A	131	130	30
1-B	165	150	40

Se realizaron análisis de electroforesis a muestras de los volúmenes de filtrado, de lavado de filtros y lavado de flóculos de las etapas FC 1-A y 1-B. El gel de electroforesis se muestra en la Figura 28.

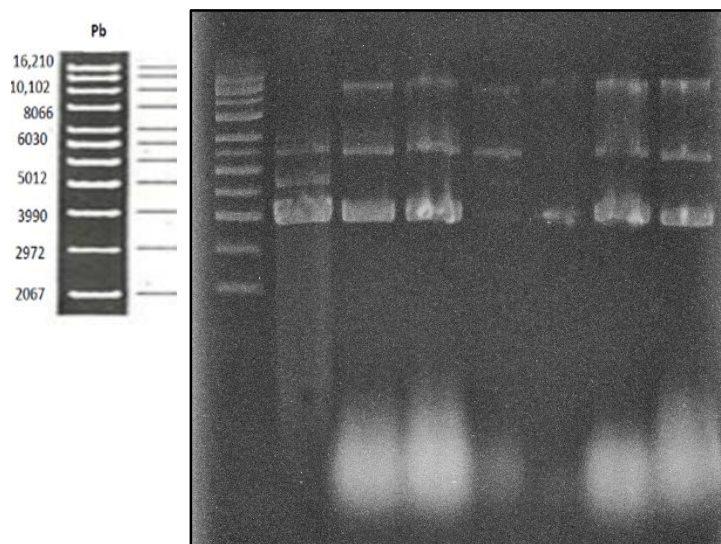


Fig. 28 Electroforesis de las etapas de FC 1-A y 1-B. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Plásmido pVAX1-NH36 purificado, Carril 3: FC 1-A, Carril 4: FC 1-B, Carril 5: Lavado de filtros usados en FC 1-A, Carril 6: Lavado de filtros usados en FC 1-B, Carril 7: Lavado de flóculos obtenidos en FC 1-A, Carril 8: Lavado de flóculos obtenidos en FC 1-B.

Con base al estudio por electroforesis, se confirma la presencia del plásmido superenrollado en los carriles 3 y 4, correspondiente a las FC 1-A y 1-B. En los carriles 5 y 6 se encuentra la solución de lavado de los filtros utilizados en ambas filtraciones, dichos lavados no contienen ADNp superenrollado según lo mostrado en la imagen. Esto dio la pauta para descartar el uso del lavado de filtros usados como una opción alternativa de recuperación de plásmido. En los carriles 7 y 8 del mismo gel se encuentra el lavado a la solución de flóculos retenidos en la filtración en ambas corridas de FC, se observa claramente la presencia de ADNp al igual que ARN.

Ya que se conoce cualitativamente el avance del proceso en la etapa de filtración convencional se hace la cuantificación de plásmidos por HPLC-HIC. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Análisis por HPLC-HIC de FC 1-A y 1-B

FC	Filtrado		Filtros		Flóculos	
	Vol.	Conc.	Vol.	Conc.	Vol.	Conc.
	(mL)	(μg ADNp /mL)	(mL)	(μg ADNp /mL)	(mL)	(μg ADNp /mL)
1-A	131	46.41	130	3.25	30	33.99
1-B	125	80.17	150	4.08	40	40.48

En la Tabla 8 se demuestra la baja concentración de plásmidos en los lavados de filtros, confirmando lo observado en la electroforesis. Haciendo una revisión de los cromatogramas hechos para la FC 1-A en la Figura 29, se puede observar este mismo comportamiento, la concentración de plásmidos y contaminantes en los lavados de filtros es mínima.

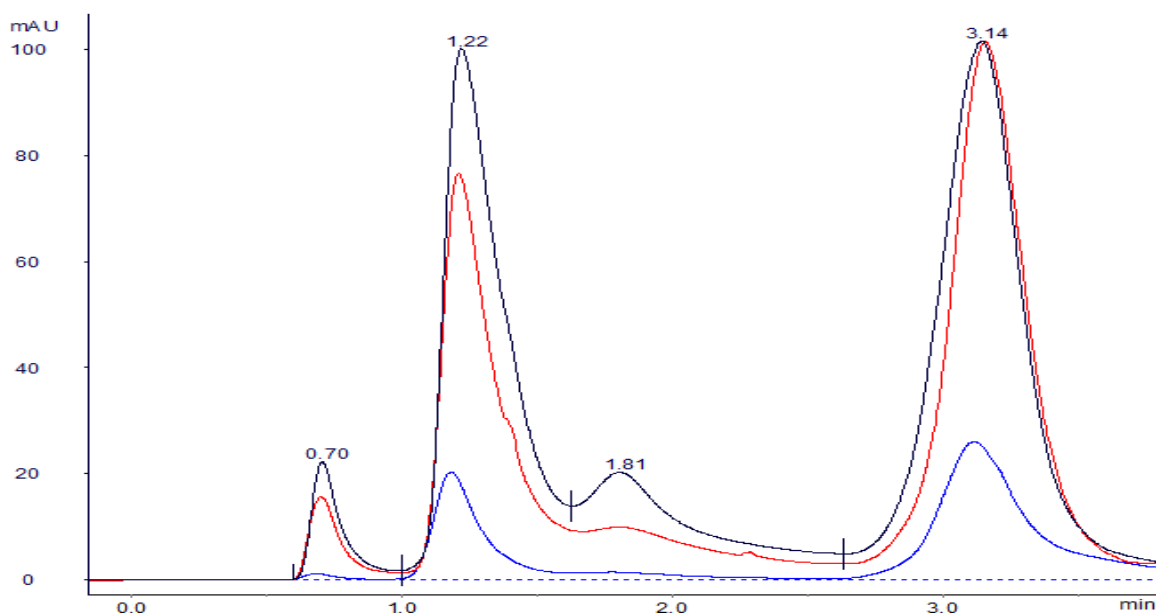


Fig. 29 Comparación de cromatogramas de la FC 1-A. Negro: Filtrado Final, Rojo: Lavado de Flóculos, Azul: Lavado de Filtros.

Tomando en cuenta estos resultados se decide incorporar la solución de lavado de flóculos al filtrado, en cada filtración, los resultados para las FC 1-A y 1-B se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores promedio en las FC 1-A y 1-B

FC	Vol.	Conc. promedio	Masa de ADNp	Conc. másica	Turbidez
	(mL)	($\mu\text{g ADNp / mL}$)	(μg)	($\mu\text{g ADNp / g}$ biomasa)	(NTU)
1-A	161	44.1	7 099.8	951.46	124.2
1-B	165	70.55	11 640.91	1 633.12	No reportada

Filtración convencional 2

En esta etapa se utilizaron los 255 mL de lisado, pero a diferencia de las otras FC, en ésta no se realizó lavado de filtros, debido a que en otros lavados, por medio de la electroforesis, se mostró que el plásmido estaba ausente.

Tabla 10. Resultados Generales del Clarificado 2

Clarificado	Filtrado	Lavado de Flóculos
	(mL)	(mL)
2	211	30

La cantidad de flóculos obtenidos en esta etapa de filtración fue de 30 mL, se realizó un lavado de estos con un volumen similar de buffer. La solución obtenida en el lavado de flóculos se incorporó con el filtrado final y la solución resultante fue utilizada en la MF2. La Figura 30 muestra el gel de electroforesis efectuado a muestras del proceso FC 2. En el carril 3 se encuentra la solución clarificada en el proceso, se puede observar claramente que hay ADNp y ARN, mientras que el carril 4 muestra el análisis realizado al lavado de flóculos, se observa que contiene ADNg, ADNp y ARN.

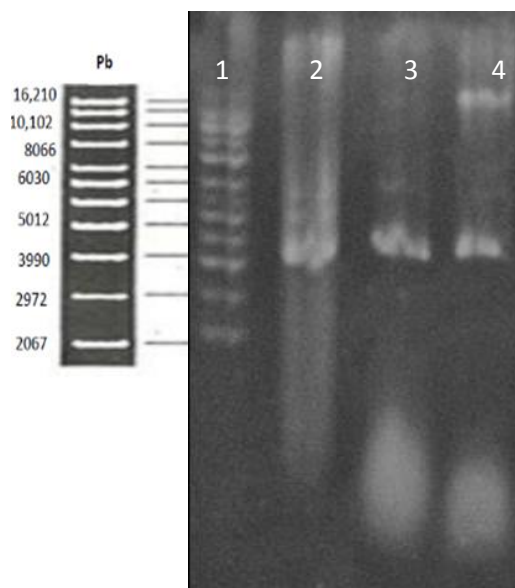


Fig. 30 Electroforesis a muestras de la FC 2. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Plásmido pVAX1-NH36 purificado; Carril 3: Solución filtrada FC 2; Carril 4: Lavado de Flóculos en FC 2.

Una vez realizados estos análisis de electroforesis se analizaron muestras mediante HPLC-HIC, con los resultados mostrados en la siguiente tabla:

Tabla 11. Análisis por HPLC-HIC de la FC 2

Clarificación	Filtrado		Flóculos	
	Vol.	Conc.	Vol.	Conc.
	(mL)	($\mu\text{g ADNp /mL}$)	(mL)	($\mu\text{g ADNp /mL}$)
2	211	36.3	30	38.1

Con base a los análisis de electroforesis y HPLC-HIC, se incorporó el volumen de lavado de flóculos con el de filtrado en esta etapa, esto resultó en una solución con las características siguientes:

Tabla 12. Valores promedio en la FC 2

Clarificación	Vol.	Conc. promedio	Masa de ADNp	Conc. másica	Turbidez
	(mL)	($\mu\text{g ADNp /mL}$)	(μg)	($\mu\text{g ADNp /g biomasa}$)	(NTU)
2	241	36.5	8,795.1	825.6	25.6

4.2.3. Microfiltración de Lecho Profundo

Microfiltración de lecho profundo 1-A

Cada una de las operaciones de microfiltración se realizó con un flujo de alimentación de 6 mL/min. En la microfiltración MFLP 1-A, inicialmente se realizó una calibración de presión en el sistema con agua desionizada, con una presión de entrada de 0.9 psi. Se utilizaron 140 mL de clarificado 1-A, se recuperan 99 mL de filtrado. Al final de la operación se realizaron dos lavados al microfiltro con 100 mL cada uno con buffer Tris, con el fin de recuperar plásmido. En la Figura 31 se observa el gel de electroforesis realizada a la MFLP 1-A.

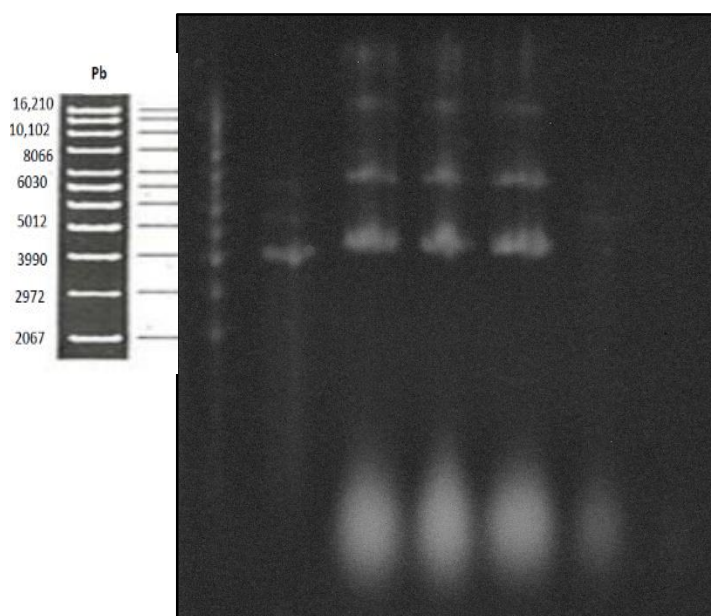


Fig. 31 Electroforesis de la etapa de MFLP 1-A. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Plásmido purificado, Carril 3: FC 1-A, Carril 4: Muestra tomada durante la operación, Carril 5: Permeado de la MFLP 1-A, Carril 6: Primer lavado de filtro cápsula usado en MFLP 1-A, Carril 7: Segundo lavado de filtro cápsula usado en MFLP 1-A.

En los carriles 3, 4 y 5 de la Figura 31 se muestran las características de la solución de alimentación al proceso, una muestra durante la operación y el filtrado obtenido respectivamente. En todas se observa la presencia de ADN superenrollado y ARN. En el carril 6 de la figura se puede observar la ausencia del plásmido de interés (superenrollado), en el carril 7 se muestra poca presencia de este. Con base a este resultado se tomó la decisión de no incluir los volúmenes de lavado de microfiltro para agregarlos a la solución del filtrado final.

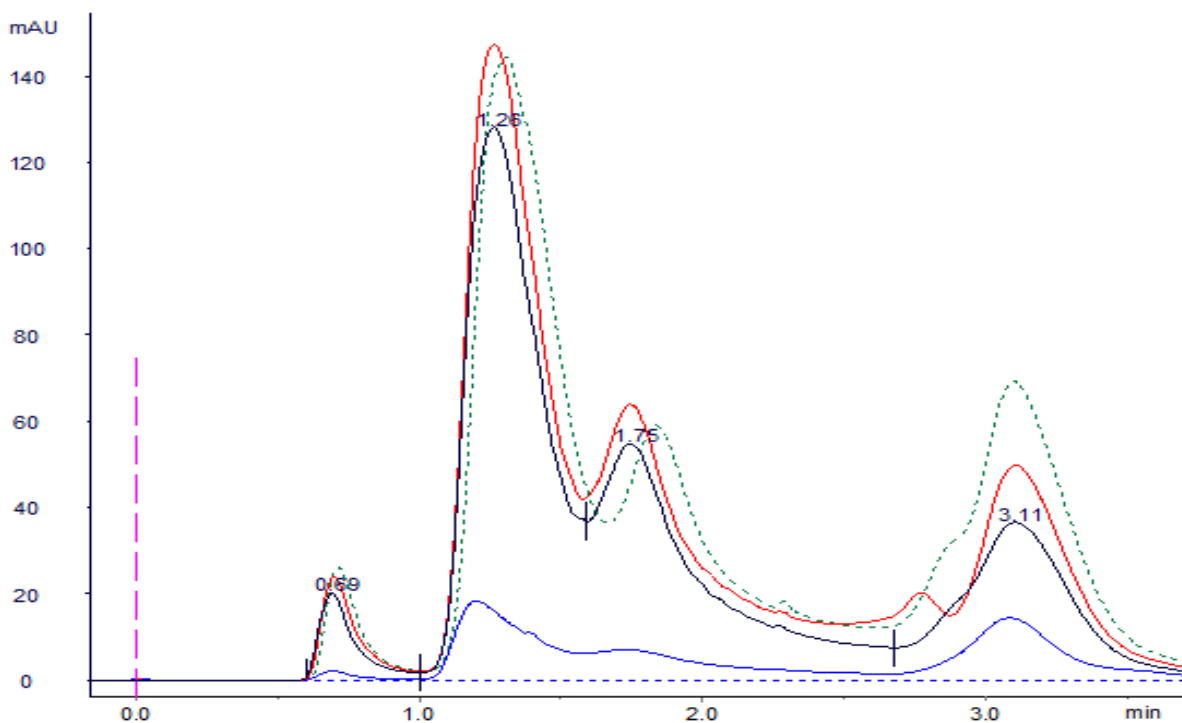


Fig. 32 Cromatogramas realizados en la etapa MFLP 1-A. Negro: MFLP 1-A; Rojo: Muestra tomada durante la operación; Azul: Lavados de Microfiltro; Verde (punteada): FC 1-A.

En la Figura 32 se presenta el análisis por HPLC-HIC a las muestras de la MFLP 1-A. Comparando la solución alimentada en microfiltración con muestras durante el proceso y la solución filtrada MFLP 1-A, se puede deducir que conservan la concentración de plásmido, (se observa en el pico a los 0.69 min), mientras que la solución de lavado contiene una concentración muy baja de esta biomolécula. Esto reafirma la decisión de que los lavados de microfiltro no se deben incluir a la solución de filtrado para la siguiente etapa. La turbidez obtenida al final de esta corrida fue de 1.3 NTU.

Microfiltración de lecho profundo 1-B1

En esta etapa se utilizaron 50 mL de FC 1-B. La calibración de presión se realizó también para este proceso con agua desionizada, con una presión de entrada inicial de 0.3 psi. El análisis de electroforesis realizado a esta etapa se muestra en la Figura 33.

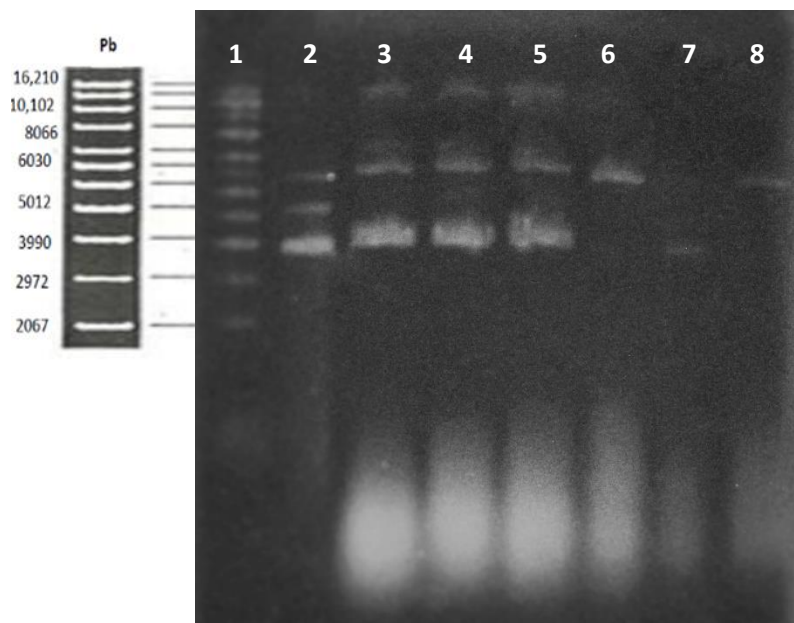


Fig. 33 Electroforesis de la etapa de MFLP 1-B1. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Plásmido purificado, Carril 3: FC 1-B, Carril 4: Muestra durante el proceso, Carril 5: Permeado de la MFLP 1-B1, Carril 6: Primer lavado de microfiltro usado en MFLP 1-B1, Carril 7: Segundo lavado de microfiltro, Carril 8: Tercer lavado de microfiltro.

En los carriles 3, 4 y 5 de la Figura 33 se muestran los resultados de la solución de alimentación, una muestra durante el proceso y el filtrado obtenido. En estas se observa la presencia de ADNp superenrollado y ARN, además de otras isoformas del plásmido. En los carriles 6, 7 y 8, correspondientes a muestras de lavado del microfiltro, se puede observar poca presencia del plásmido de interés (superenrollado). Con base a este resultado se tomó la decisión de no incluir los volúmenes de lavado de microfiltro para agregarlos a la solución del filtrado final.

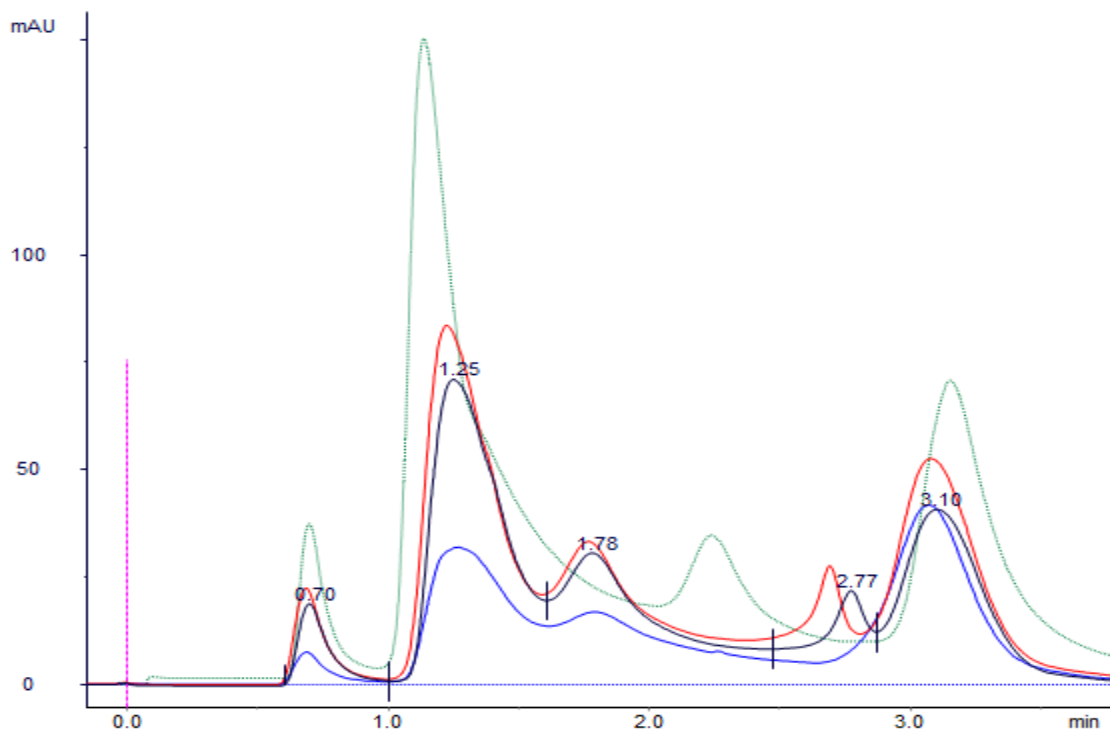


Fig. 34 Cromatogramas realizados en la etapa MFLP 1-B1. Verde (punteada): FC 1-B; Negro: MFLP 1-B1 final; Rojo: Muestra durante el proceso; Azul: Lavados de Microfiltro.

En la Figura 34 se presenta el análisis por HPLC-HIC a las muestras de la MFLP 1-B1. Comparando la solución alimentada en microfiltración con muestras durante el proceso y la solución filtrada MFLP 1-B1, se observa que baja la concentración de plásmido, (en el pico a los 0.70 min), al realizar el proceso de microfiltración. Mientras que la solución de lavado contiene una concentración menor de ADNp, sin embargo, el análisis de electroforesis no muestra que este sea plásmido superenrollado. Esto reafirma la decisión de que los lavados de microfiltro no se deben incluir a la solución de filtrado para la siguiente etapa. La turbidez al final de esta corrida fue de 1.91 NTU.

Microfiltración de lecho profundo 1-B2

El procedimiento para esta microfiltración es el mismo seguido en las dos primeras. En esta corrida se calibró el sistema con agua desionizada a una presión de entrada de 4.0 psi y se procesaron 54 mL de FC 1-B. Cabe mencionar que las presiones de calibración para las microfiltraciones solo fueron escogidas arbitrariamente.

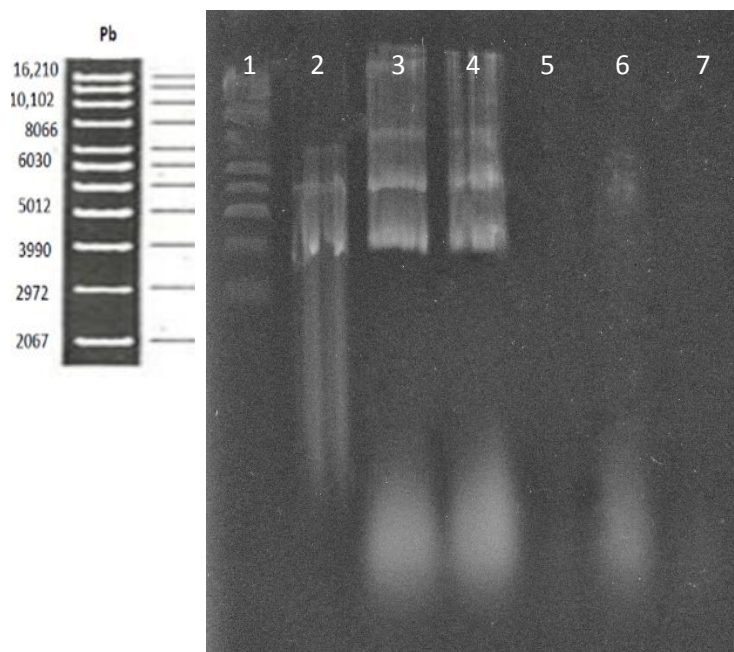


Fig. 35 Electroforesis de la etapa MFLP 1-B2. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Plásmido purificado, Carril 3: FC 1-B, Carril 4: Permeado de la MFLP 1-B1, Carril 5: Primer lavado de filtro cápsula usado en MFLP 1-B1, Carril 6: Segundo lavado de filtro cápsula, Carril 7: Tercer lavado de filtro cápsula.

Los carriles 3 y 4 de la Figura 35 muestran los resultados de la solución de alimentación y el filtrado obtenido. En estas se observa la presencia de ADNp superenrollado y ARN, además de otras isoformas del plásmido. En los carriles 5, 6 y 7, correspondientes a muestras de lavado del microfiltro, se puede apreciar que no hay plásmido. Con base a este resultado se tomó de nuevo la decisión de no incluir los volúmenes de lavado de microfiltro para la siguiente etapa.

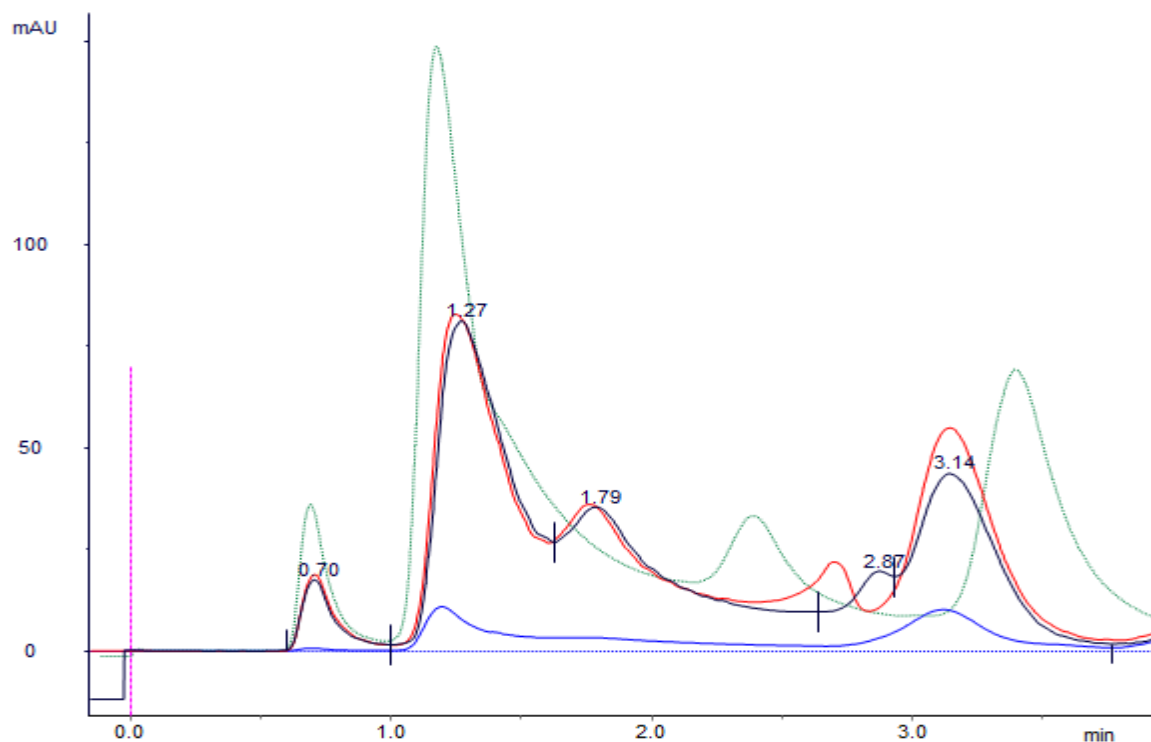


Fig. 36 Cromatogramas realizados en la etapa MFLP 1-B2. Verde (punteada): FC 1-B; Negro: MFLP1-B2; Rojo: Muestra durante el proceso; Azul: Lavados de Microfiltro.

El análisis cromatográfico comparativo realizado a esta etapa se muestra en la Fig. 36. Se observa un comportamiento similar al mostrado en la MFLP 1-B1; sin embargo, en esta corrida el análisis de los lavados de microfiltro, no muestran presencia de plásmido, lo cual afirma decisión tomada en anteriores microfiltraciones de descartar la solución de lavado. En el análisis de turbidez realizado a la solución final obtenida en esta corrida se obtuvo una turbidez de 1.2 NTU.

Microfiltración de lecho profundo 2

En esta etapa de filtración se añadieron los 241 mL de FC 2, se utilizaron los mismos parámetros de inicio que en las microfiltraciones anteriores, solamente se ajustó la presión a un valor de 8.5 psi. En esta microfiltración se efectuaron lavados al microfiltro y la solución solo fue analizada mediante HPLC-HIC.

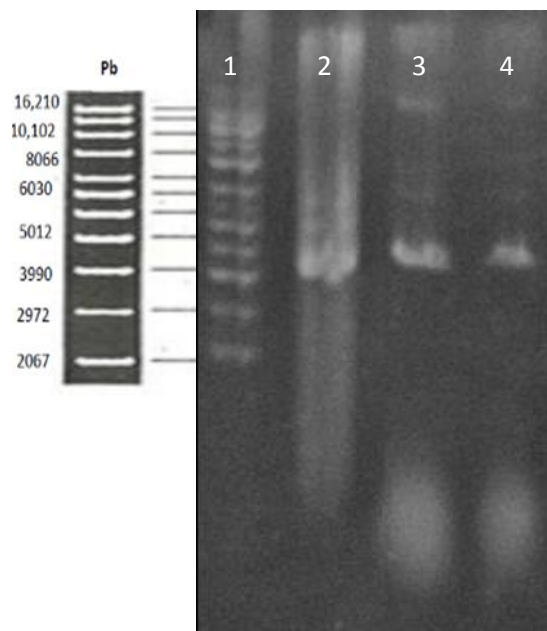


Fig. 37 Electroforesis de la etapa MFLP 2. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Plásmido purificado; Carril 3: Muestra durante el proceso; Carril 4: MFLP 2.

La Figura 37 se muestra la electroforesis realizada a la MFLP 2, se ve claramente la presencia de plásmido en los carriles 3 y 4, correspondientes a la muestra durante el proceso y el microfiltrado obtenido. La Figura 38 muestra el análisis comparativo por cromatografía realizada a diferentes muestras de esta etapa. Se aprecia un comportamiento similar al resultado obtenido en la MFLP 1-A, en cuanto a que se mantuvo la concentración de plásmido durante el proceso y que los lavados del microfiltro no contenían plásmidos en forma significativa.

Los resultados generales obtenidos en cada una de las microfiltraciones se exponen en la Tabla 13. Para esta corrida se obtuvo una turbidez de 2.81 NTU en la solución final.

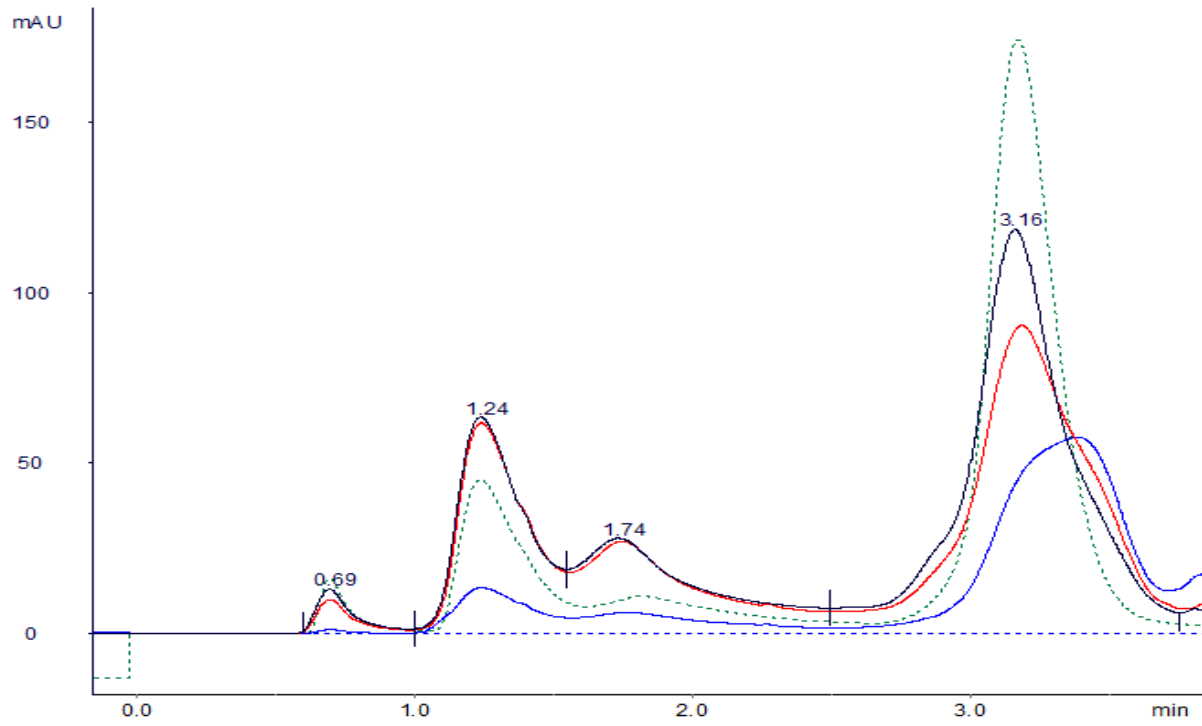


Fig. 38 Cromatogramas realizados en la etapa MFLP 2. Verde (punteada): FC 2; Negro: MFLP 2; Rojo: Muestra durante el proceso; Azul: Lavados de Microfiltro.

Tabla 13 Resultados Generalizados para Microfiltraciones de Lecho Profundo

Micro-filtración	Volumen (mL)		Conc. Promedio ($\mu\text{g ADNp / mL}$)		Masa de ADNp (μg)		% ADN		
	Alim.	Filtr.	Alim.	Filtr.	Alim.	Filtr.	Filtrado recuperado	Lavado	Retenido
MFLP 1-A P = 0.9 psi	140	99	44	54	6 173	5 260	85	11	4
MFLP 1-B1 P = 0.3 psi	50	49	71	42	3 528	2284	65	29	6
MFLP 1-B2 P = 4.0 psi	60	59	71	67	4 233	2450	58	6	36
MFLP 2 P = 8.5 psi	241	215	37	21	8 795	4479	51	37	12

Análisis de presión en la microfiltración de lecho profundo

Se tomaron lecturas de presión de entrada y salida en cada una de las corridas de microfiltración a diferentes tiempos, luego se determinó el diferencial de presión para cada lectura, Ec. (12) y el flux inicial fue utilizado para determinar el parámetro, volumen específico en cm^3/cm^2 , $V = J_0 t$, que corresponde al volumen filtrado por unidad de área a un tiempo dado. El término $\Delta P / \Delta P_0$, es el diferencial de presión relativo, nos indica el incremento del diferencial de presión conforme transcurre el tiempo de operación, respecto al diferencial observado al inicio. Se ajustó el modelo de la Ec. (11) a los datos obtenidos en las corridas de microfiltración de lecho profundo, por medio de la función *nlinfit* de Matlab, determinando como parámetro de ajuste la constante de recubrimiento de fibra K_f , utilizando $\varphi_0 = 0.23$, dato obtenido por Padilla, (2013). Los datos de las corridas MFLP 1-A y MFLP 1-B1 fueron utilizados en el modelo.

Como se podrá observar en la Figura 39, para la MFLP 1-A el diferencial de presión relativo mayor fue de 9, mientras que para la MFLP 1-B1, este valor fue poco menor a 3. Esto se debe a que los volúmenes procesados por cada corrida son diferentes, sin embargo el valor de K_f obtenido para ambas corridas fue similar. Estos valores similares pueden indicar que el microfiltro con tamaño de poro de $8 \mu\text{m}$ regresa a su estado inicial después de una operación y su correspondiente lavado. La Tabla 14 muestra los resultados obtenidos a partir del ajuste del modelo para MFLP a flujo constante, se puede observar que

no se procesó el volumen máximo de filtración en las corridas realizadas en esta investigación. Los resultados obtenidos por Padilla 2013, muestran para un filtro similar, un valor de K_f de 0.02 cm^{-1} , que equivale a $V_{\text{máx}}$ de 1250 cm^3 , esto puede significar que el filtro utilizado en la investigación actual, comparado con el utilizado en el 2013, no estaba en las mismas condiciones.

Tabla 14 Resultados obtenidos a partir del ajuste del modelo a datos de MFLP.

Microfiltración	$K_f (\text{cm}^{-1})$	$V_{\text{máx}} (\text{cm}^3)$	R^2	φ_0
MFLP 1-A	0.11	227	0.90	0.23
MFLP 1-B1	0.12	208	0.93	0.23

El comportamiento de la presión fue el esperado, es decir, hubo un incremento de ésta en las corridas de microfiltración en lecho profundo, esto indica que hay retención de sólidos en el lecho; sin embargo, también es retenido el plásmido, razón por la cual se efectuaron los lavados de los microfiltros.

Cabe mencionar que las microfiltraciones MFLP 1-A y MFLP 1-B1 además de ajustarse mejor al modelo que el resto, retuvieron menor cantidad de plásmido, resultados reportados la Tabla 13. Esto puede significar que a menores presiones de operación, el recubrimiento de las fibras por los sólidos es predominante, mientras que para mayores presiones como las manejadas en la MF1-B2 y MF2, pudiera presentarse otro tipo de taponamiento más severo.

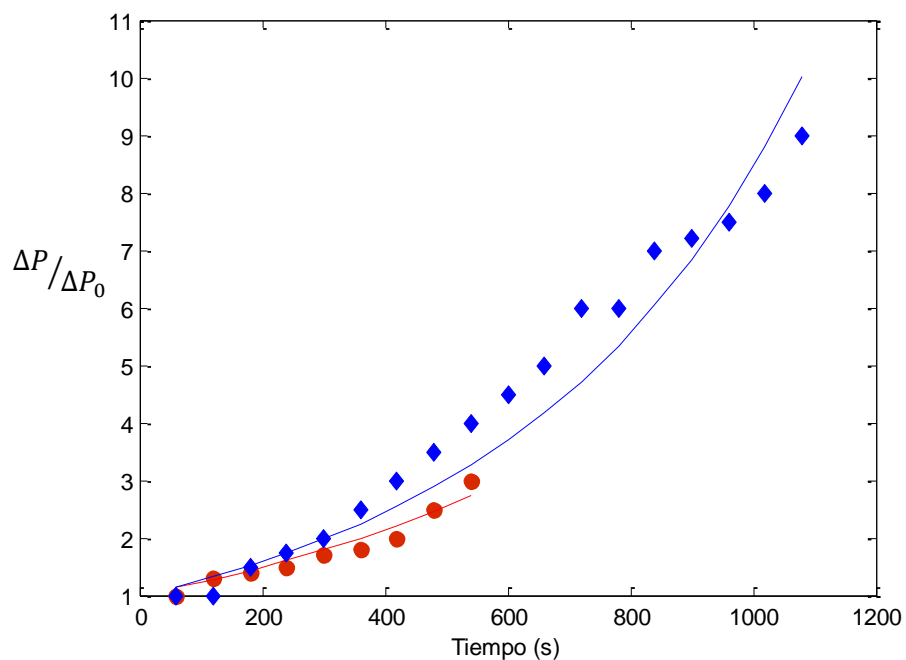


Fig. 39 Comportamiento del diferencial de presión relativo y ajuste del modelo a flujo constante.
Azul: MFLP 1-A, Rojo: MFLP 1-B1.

4.2.4. Microfiltración Tangencial

En esta etapa se utilizó una membrana de microfiltración de fibra hueca de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$, se acondicionó un sistema de filtración en el laboratorio y se utilizaron todos los productos de las microfiltraciones anteriores combinados como solución de alimentación al proceso.

Esta solución se hizo pasar por el sistema de MFFT, el cual tenía una recirculación al recipiente de alimentación. El flujo de alimentación fue de 40 mL/min , con presiones constantes de 1.7 psi a la entrada, 0.5 psi en la recirculación y 0.2 psi en el permeado.

En la Figura 40 se observa el análisis de electroforesis en muestras correspondientes a esta etapa.

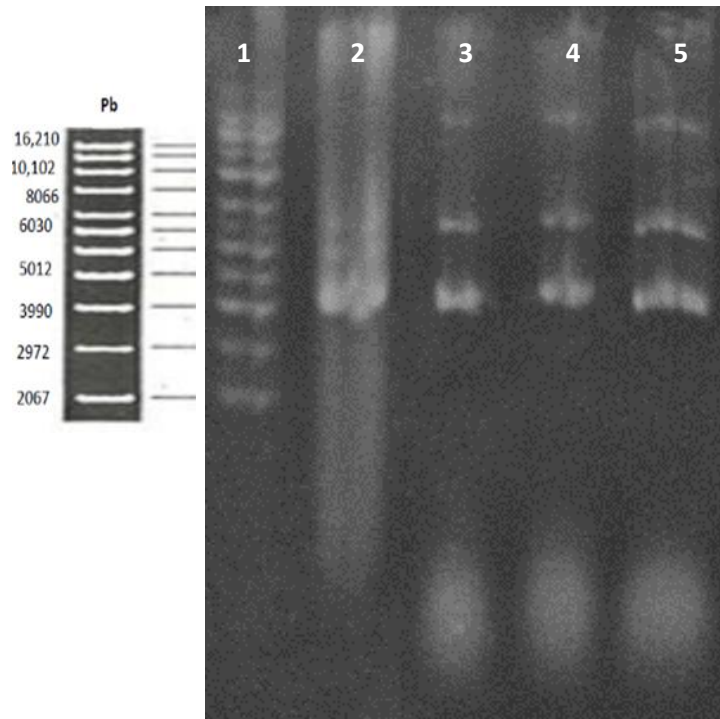


Fig. 40 Electroforesis realizada a la etapa MFFT; Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Plásmido purificado; Carril 3: Solución de Alimentación a MFFT; Carril 4: Muestra durante el proceso; Carril 5: Filtrado final del proceso de MFFT.

En la figura se muestra que el plásmido y los contaminantes al inicio, durante y al final de la MFFT se mantienen. Se realizó además un análisis mediante HPLC-HIC cuyos cromatogramas obtenidos se comparan en la Figura 41.

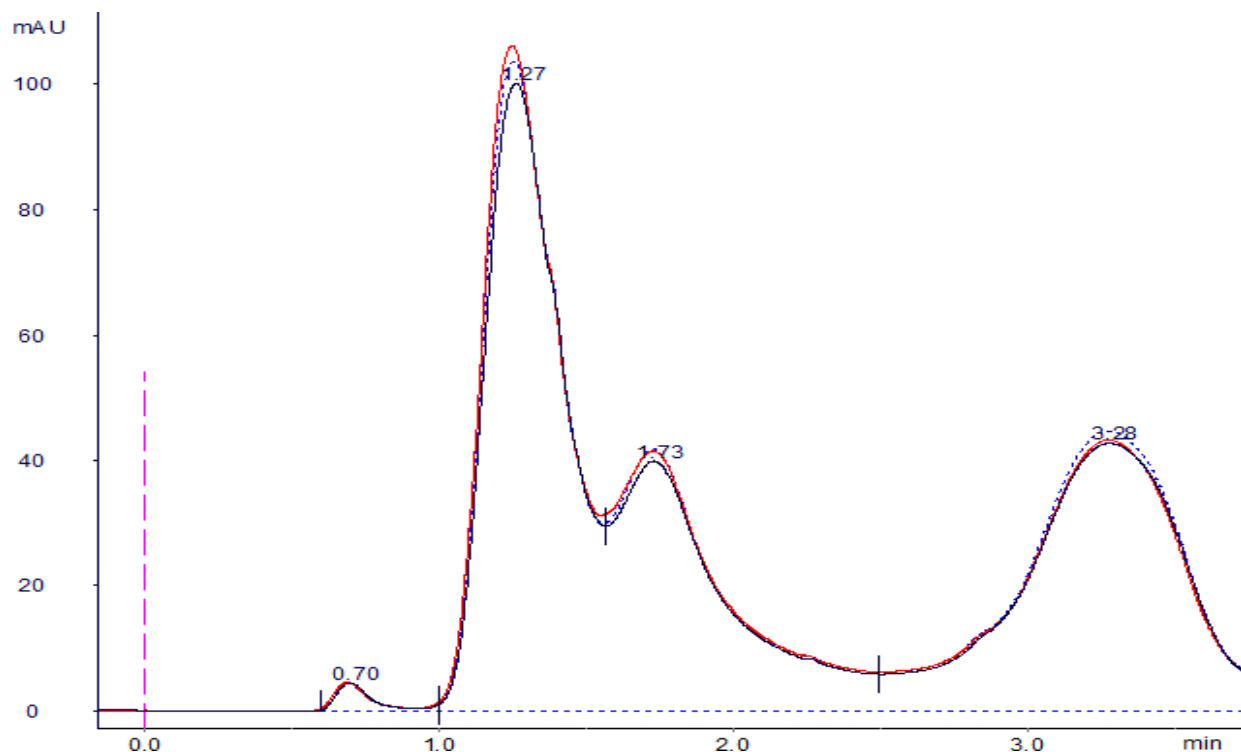


Fig. 41 Cromatogramas realizados a la etapa MFFT; Rojo: Solución de alimentación a MFFT; Negro: Filtrado final del proceso de MFFT; Azul: Muestra tomada durante el proceso.

La solución alimentada a este proceso de MFFT tenía una turbidez total de 2.81 NTU y una vez realizado el proceso se obtuvo una solución con una turbidez de 0.18 NTU. Los cromatogramas de la Figura 41 fueron analizados y se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 14. Estos resultados muestran que en esta última operación en la etapa de recuperación primaria, hay una remoción importante de sólidos suspendidos, manteniendo la integridad del plásmido.

Tabla 15 Resultados para la MFFT

Micro-filtración	Volumen (mL)		Conc. Promedio ($\mu\text{g ADNp / mL}$)		Masa de ADNp (μg)		% ADN
	Alim.	Filtr.	Alim.	Filtr.	Alim.	Filtr.	Filtrado recuperado
MFFT $P_{in} = 1.7 \text{ psi}$	356	356	12.3	11.5	4380	4085	93

4.3 Recuperación primaria en el Proceso 2

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en las etapas correspondientes al Proceso 2. Partiendo de la fermentación 3, se realizó el cultivo celular y lisado, para purificar este último mediante centrifugación y una filtración al vacío posterior. Como se ha mencionado antes, este proceso de purificación de plásmido se comparará con el proceso propuesto. Dichas comparaciones se analizan en este mismo apartado mediante cromatogramas y análisis de resultados.

4.3.1. Clarificación por centrifugación

En esta etapa se utilizaron 193.2 mL de lisado, se sometieron a centrifugación por dos periodos de 50 minutos a 12000 g y 4 °C. Se realizó un análisis de electroforesis, con los resultados mostrados en la Figura 42.

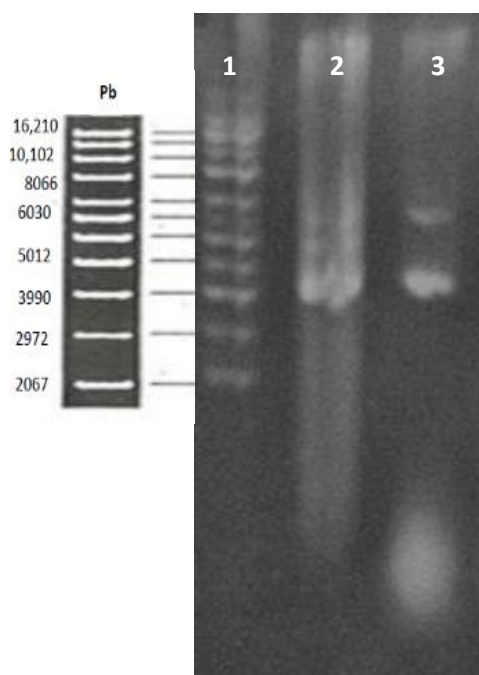


Fig. 42 Electroforesis realizada a la clarificación por centrifugación; Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Plásmido Pvax-NH36 purificado; Carril 3: Clarificado por Centrifugación

En la electroforesis anterior se observa claramente la presencia de plásmido en la solución clarificada por centrifugación. Conociendo el comportamiento de esta etapa cualitativamente mediante el análisis anterior, se realizó un análisis mediante HPLC-HIC, para conocer su comportamiento cuantitativamente.

En la siguiente figura se muestra el cromatograma obtenido en la clarificación por centrifugación, además se incluyen cromatogramas realizados a etapas de clarificación.

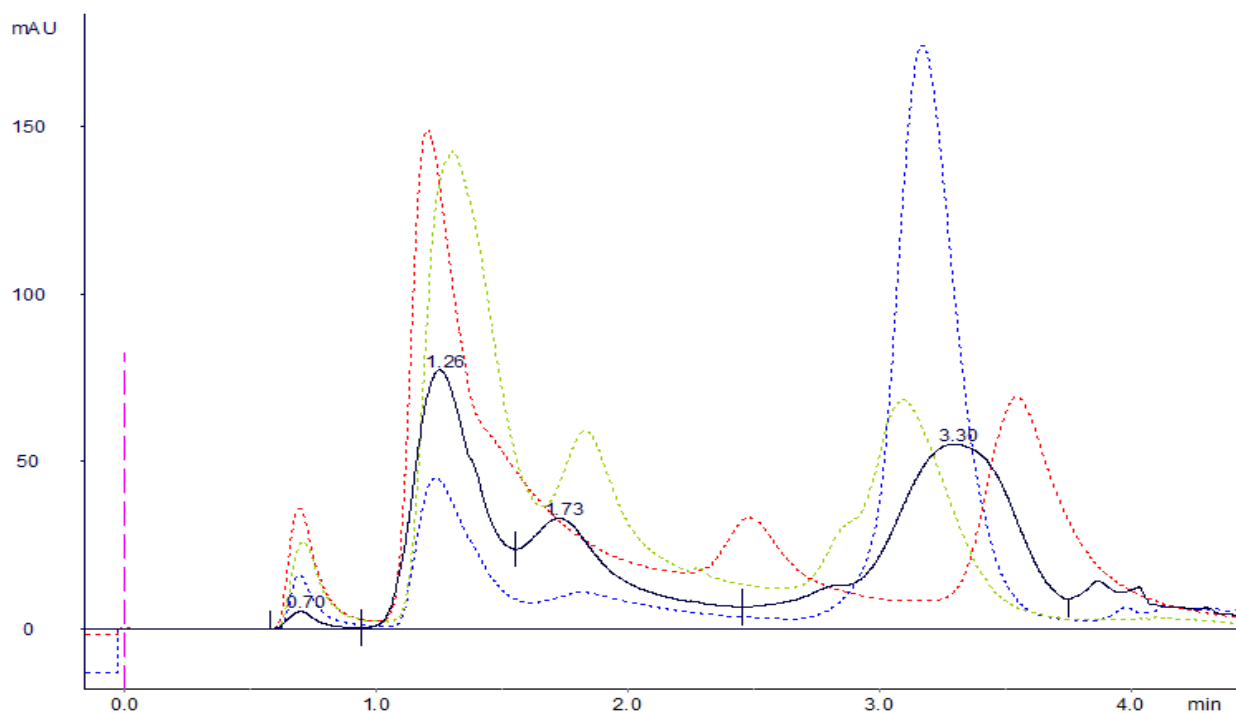


Fig. 43 Comparativos cromatográficos entre Clarificación por Centrifugación y FC (Previa a Microfiltración de Lecho Profundo); Negro: Clarificación por Centrifugación; Verde (punteado): FC 1-A; Rojo (punteado): FC 1-B; Azul (punteado): FC 2.

En los cromatogramas punteados se puede ver una mayor concentración de plásmidos que en el cromatograma de la clarificación por centrifugación, este resultado se muestra en la Tabla 15.

Tabla 16 Resultados para la Clarificación por centrifugación

Clarificación por	Vol.	Conc. promedio	Masa de ADNp	Conc. másica	Turbidez
	(mL)	(μg ADNp /mL)	(μg)	(μg ADNp /g biomasa)	(NTU)
Centrifugación	160	12.8	2 055.1	256	2.2

4.3.2. Filtración al vacío

La filtración al vacío presentada en este apartado se realizó en la misma configuración de equipos que la utilizada para la clarificación, en cambio, se utilizaron filtros con un tamaño de poro de $0.45\ \mu\text{m}$. Se alimentaron los 160 mL obtenidos de la clarificación por centrifugación y haciendo un análisis posterior de electroforesis se obtuvo lo mostrado en la siguiente figura:

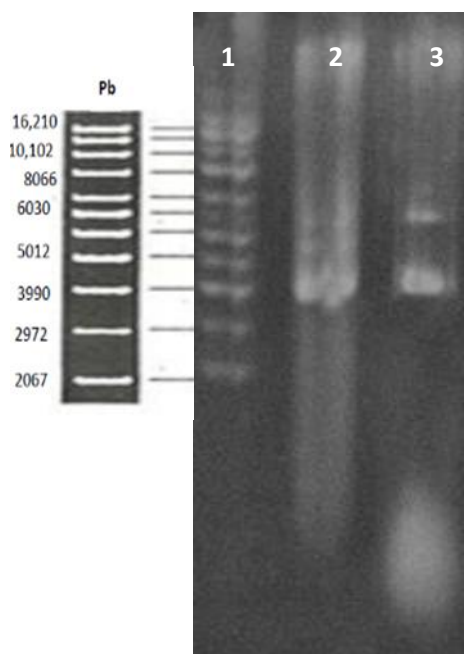


Fig. 44 Electroforesis realizada a la filtración a vacío ($0.45\ \mu\text{m}$); Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Plásmido purificado; Carril 3: Filtrado al vacío.

Verificando la presencia del plásmido en la solución de filtrado al vacío, se realizó un análisis mediante HPLC-HIC. En la Figura 45 se presenta el cromatograma obtenido a partir de la solución al vacío y además se hace una comparación con el cromatograma obtenido a partir de la microfiltración tangencial.

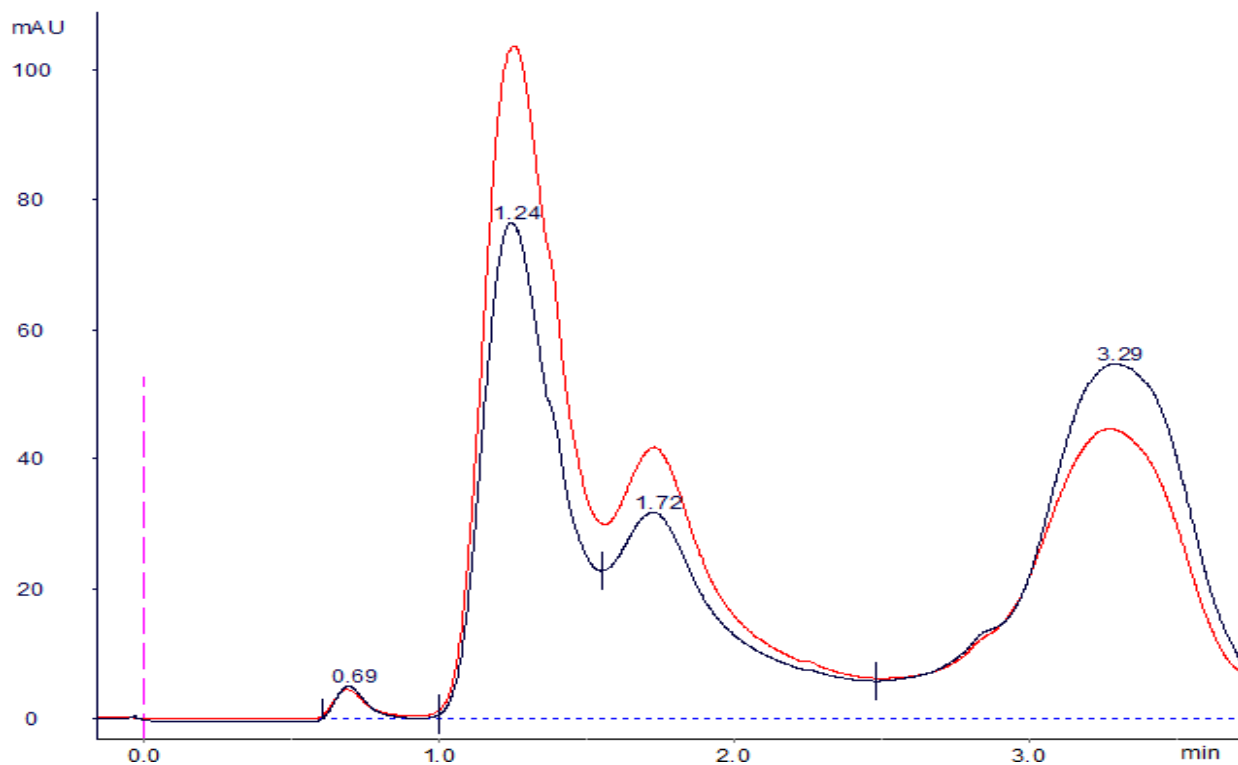


Fig. 45 Comparativos cromatográficos entre Filtración a vacío (negro) y Microfiltración Tangencial (rojo).

En la figura anterior se puede observar que la concentración de plásmido es muy similar en ambas etapas, sin embargo en la microfiltración tangencial hay una mayor presencia de contaminantes. Hay que recordar que estas soluciones clarificadas de plásmido no provienen de la misma fermentación. Los resultados generales se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 17 Resultados para la Filtración a vacío

Filtración al Vacío	Volumen (mL)		Conc. Promedio ($\mu\text{g ADNp/mL}$)		Masa de ADNp (μg)		% ADNp Filtrado recuperado
	Alim.	Filtr.	Alim.	Filtr.	Alim.	Filtr.	
0.45 μm	160	160	12.8	11.1	2055	1772	86

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

La recuperación primaria de plásmido fue realizada satisfactoriamente por medio de una clarificación, microfiltración de lecho profundo y microfiltración tangencial, obteniéndose una solución de buena calidad para ser utilizada en las siguientes etapas de recuperación intermedia y purificación.

En la clarificación del lisado neutralizado de *E.coli* se logró obtener una buena recuperación de plásmido en la solución filtrada; se encontró que una cantidad de plásmido se queda en los floculos retenidos, recuperándose por medio de los lavados realizados a los mismos, según lo demuestran los análisis de electroforesis y HPLC-HIC, por otro lado, también se encontró que en el medio filtrante no se queda retenido el plásmido.

El plásmido se mantiene presente en todas las operaciones de microfiltración en lecho profundo según se muestra en los análisis de electroforesis. Como se señala en los análisis de turbidez al inicio y final en estas corridas de microfiltración, se logra eliminar los sólidos en suspensión satisfactoriamente en las soluciones obtenidas en las previas etapas de clarificación. La recuperación de plásmido en las microfiltraciones va desde un 51 % hasta 85%, mientras que al evaluar los lavados de los microfiltros se encontró que se recupera del 11 al 37 % del plásmido que se había quedado retenido.

En las corridas de microfiltración de lecho profundo se tiene una variación de resultados, de tal manera que no se puede distinguir un patrón bien establecido entre recuperación de plásmido y presión. Esto se debe principalmente a que las condiciones del sistema de microfiltración no son las óptimas, debido a esto, el flujo varía a lo largo del proceso, afectando en el ajuste del modelo de Bolton.

La mejor corrida de microfiltración en lecho profundo con base a la recuperación de plásmidos fue la realizada a una presión de entrada de 0.9 psi. Mientras que los datos de caída de presión durante, que se pueden validar por medio del modelo de recubrimiento de fibras a flujo constante, son los

correspondientes a las corridas con la presión de entrada de 0.3 psi y 0.9 psi, encontrándose el volumen específico máximo que se puede manejar en la operación, mismo que es útil como parámetro de escalamiento.

Haciendo una comparación del proceso propuesto por microfiltración con el establecido por centrifugación, para la etapa de recuperación primaria, se encuentra un comportamiento similar en base a la recuperación de plásmido respectivamente, aunque la microfiltración ofrece mejor eliminación de sólidos en suspensión, basándose en la turbidez de la solución obtenida y además realizar esta etapa por clarificación y microfiltración, puede proporcionar una mejor opción de escalamiento.

5.2 Recomendaciones

El resultado de esta investigación ha sido favorable, sin embargo, puede ser necesario profundizar en algunos puntos para mantener las condiciones del proceso estables. Se recomienda utilizar un equipo más especializado para realizar las corridas de microfiltración, ya que se presentaron algunos problemas en el empleo de un sistema armado en laboratorio, sobre todo en los ajustes de parámetros como el flujo.

Respecto a los lavados realizados en los microfiltros y la membrana de fibra hueca, se recomienda determinar la concentración del buffer de lavado y estudiar cual sería la más indicado para la recuperación de plásmido, además es importante investigar sobre el volumen de lavado que sea más conveniente, tanto para los lavados de medios filtrantes como para los flóculos, dado que se encontró que una cantidad importante de plásmido puede quedar retenida en éstos.

Con base a los resultados obtenidos, se recomienda utilizar microfiltración de flujo tangencial en la recuperación primaria de plásmidos, debido a que este tipo de filtración presenta una mayor facilidad para mantener parámetros de operación constantes. El sistema puede constar de una membrana de poro de 8 μm , seguida de otra de 0.45 μm o simplemente una membrana de 0.45 μm a la cual se le alimente la solución obtenida en la filtración convencional.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

1. Ager, K., Latulippe, D. R., Zydney, A. L. (2009). Plasmid DNA transmission through charged ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 344, 123-128.
2. Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *J. Nucl. Acids Res.*, 7:1513-23.
3. Bolton, G.R., LaCasse, D., Lazarra, M.J., Kuriyel, R. (2005). The fiber-coating model of biopharmaceutical depth filtration. *AIChE Journal*, Vol. 51, No. 11.
4. Carnes, A.E., Williams, J.A. (2007) Plasmid DNA manufacturing technology. *Recent Patents on Biotechnology*, Vol. 1, 151-166.
5. Coronel M. (2012). Microfiltración Tangencial. *ENFOQUETE* 3: 1-7
6. Diogo, M.M., Queiroz, J.A., Prazeres, D.M.F. (2003) Assessment of purity and quantification of plasmid DNA in process solutions using high-performance hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 998:109 – 117.
7. Diogo, M.M., Queiroz, J.A., Prazeres, D.M.F. (2005). Chromatography of plasmid DNA. *Journal of Chromatography. A*, 1069, 3 – 22.
8. Eon-Duval, A., MacDuff R.H., Fisher, C. A., Harris, M. J., Brook, C. (2003). Removal of RNA impurities by tangential flow filtration in an RNase-free plasmid DNA purification process. *Analytical Biochemistry*, 316, 66 – 73.
9. Ferreira, G.N.M., Monteiro, G.A., Prazeres, D.M.F., Cabral, J.M.S. (2000). Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *TIBTECH.*, 18, 380 – 388.
10. Freitas, S., Canario, S., Santos, J. A. L., Prazeres, D. M. F. (2009). Alternatives for the intermediate recovery of plasmid DNA: Performance, economic viability and environmental impact. *Biotechnology Journal*, 4: 265-278.
11. García, R.S., González, M.E. (2008). Terapia Génica: Perspectivas y consideraciones éticas en relación con su aplicación. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, Vol. 7, No.1.
12. Geankoplis, C.J. (1998). *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. 3ra ed., pp. 884-894. Ed. Cecsca, México.

13. Ghanem, A., Healey, R., Adly, F. G. (2013). Current Trends in Separation of Plasmid DNA Vaccines: A review. *Analytica Chimica Acta*, 760, 1-15.
14. Guerrero-Germán, P., Prazeres, D.M.F., Guzmán, R., Montesinos-Cisneros, R.M., Tejeda, A. (2008). Purification of plasmid DNA using tangential flow filtration and tandem anion-exchange membrane chromatography. *Bioprocess Biosyst Eng*, 32: 615-623.
15. Harrison, R.G, Todd P., Rudge, S.R, Petrides, D.P. (2003). *Bioseparations Science and Engineering*. 1st ed., pp. 104-124. Ed. Oxford, USA.
16. Hermia, J., (1982), Constant pressure blocking filtration laws—Application to power-law non-Newtonian fluids, *Trans IChemE*, 60:183-187.
17. Invitrogen. (2012), *User Guide: pVAX1*, V260-20.
18. Iuliano, S., Fisher, F.R., Chenc, M., Kellyd, W.J. (2002). Rapid analysis of a plasmid by hydrophobic-interaction chromatography with a non-porous resin. *Journal of Chromatography A*, 972, 77–86.
19. Jornitz, M.W. (2008). *Filtration and Purification in the Biopharmaceutical Industry*. 2nd ed, pp. 539. Ed. Informa Healthcare, USA.
20. Li, H., Fane, A.G., Coster, H.G.L., Vigneswaran, S. (1998). Direct observation of particle deposition on the membrane surface during crossflow microfiltration. *Journal of Membrane Science*, 149, 83-97.
21. Lucero, J.A., (2007). Análisis y simulación de la cromatografía frontal de plásmidos en sistemas de membranas. Tesis de Maestría en Ciencias de la Ingeniería, División de Ingeniería, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora.
22. Manthorpe, M., Hobart, P., Ferrari, M., Geall, A., Goff, B., Rolland, A., (2005). Plasmid vaccines and therapeutics: from design to applications. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*, 99, 41 – 92.
23. McCabe, W.L., Smith, J.C., Harriot, P. (2007). *Operaciones Unitarias en Ingeniería Química*. 7ma ed., pp. 1054-1055, 1067. Ed McGraw-Hill/Interamericana. México.
24. Modabber, F. (2010). Leishmaniasis vaccines: past, present and future. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36S; S58–S61.
25. Montesinos-Cisneros, R.M., Guzmán-Zamudio, R., Ortega-Lopez, J., Tejeda-Mansir, A. (2005). Cromatografía frontal de plásmidos: estimación de parámetros y simulación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 4, 47 – 58.
26. Motulsky y Christopoulos (2004). *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression*. Oxford University Press. 34-35.

27. Nunes, J.C., Morão, A.M., Nunes, C., Pessoa de Amorim, M.T., Escobar, I.C, Queiroz, J.A. (2012). Plasmid DNA recovery from fermentation broths by a combined process of micro- and ultrafiltration: Modeling and application. *Journal of Membrane Science*. 415–416, 24–35.
28. Okuda, K., Wada, Y., Shimada, M. (2014). Review: Recent Developments in Preclinical DNA Vaccination. *Vaccines*, 2, 89-106.
29. Padilla, A. (2013). Estudio de la recuperación primaria de ADN plasmídico a partir de lisados de *E. coli* por microfiltración de lecho profundo. Tesis profesional para obtener título de Ingeniero Químico, Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora.
30. Prather, K.J., Sagar, S., Murphy, J., Chartrain, M. (2003). Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 865 – 883.
31. Prazeres, D.M.F., Schluep, T., Cooney, C. (1998). Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion exchange Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 806, 31 – 45.
32. Prazeres, D.M.F., Ferreira, G.N.M. (2004). Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Chemical Engineering and Processing.*, 43, 609 – 624.
33. Prazeres, D.M.F., Monteiro, G.A., Ferreira, G.N.M., Diogo, M.M., Ribeiro, S.C., Cabral, J.M.S. (2001). Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Biotechnol. Ann. Rev*, 7, 1 – 30.
34. Rayat, A.C.M.E., Lye, G.J., Micheletti, M. (2014). A novel microscale crossflow device for the rapid evaluation of microfiltration processes. *Journal of Membrane Science*, 452 284–293.
35. Roush D.j., Lu Y. (2008). Advances in Primary Recovery: Centrifugation and Membrane Technology. *Biotechnol. Prog.* 24, 488-495.
36. Shukla, A.A., Etzel, M.R., Gadam, S. (2007). *Process scale bioseparations for the biopharmaceutical industry*. 1st ed., pp. 26-28. Taylor & Francis Group. USA.
37. Shuler M.L., Kargi F. (2001). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Prentice Hall Prof. Tech. Ref. New Jersey.
38. Smith, C. R., De Prince, R. B., Dackor, J., Weigl, D., Griffith, J., Persmark, M. (2007). Separation of topological forms of plasmid DNA by anion-exchange HPLC: Shifts in elution order of linear DNA. *Journal of Chromatography B*, 854, 121 – 127.
39. Stadler, J., Lemmens, R., Nyhammar, T. (2004). Plasmid DNA purification. *Journal of Gene Medicine*, 6, S54 – S66.
40. Tejeda, A., Montesinos, R. M., Guzman, R. (2011). *Bioseparations* 2nd ed., pp. 461-512. Pearson Ed, Mexico.

41. Theodossiou, I., Collins, I.J., Ward, J.M., Thomas, O.R.T., Dunnill, P., (1997), The processing of a plasmid based gene from E. coli primary recovery by filtration, *Bioprocess Eng*; 16: 175–183.
42. Van Reis, R., Zydney, A. (2001). Membrane Separations in Biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 12:208–211
43. wikispaces.psu.edu/display/Bio110Leap/Chromosome+Behavior+and+Gene+Linkage; Revisado el 26 de Septiembre 2014.
44. www.medicinaunsa.edu.pe/las-bacterias-y-el-ser-humano/; Revisado el 27 de Septiembre 2014.
45. Zamani, A., Maini, B. (2009). Flow of dispersed particles through porous media-Deep bed filtration. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 69 71–88.

Anexos

Anexo A: Acondicionamiento de la Membrana de Fibra hueca.

La membrana de fibra hueca utilizada es la MidGee Microfiltration Cartridge de General Electric®, con poros de 0.45 μm y un área de 16 cm^2 . El material de la membrana es polisulfona y los accesorios de policarbonato. Una membrana nueva debe ser lavada mediante las siguientes consideraciones:

- 1.- Usar agua limpia (DI)
- 2.- Ajustar la presión transmembrana del cartucho a 5 psi.
- 3.- El flujo del retenido debe ser diez veces menor al flujo del permeado.
- 4.- El retenido y permeado deben ser desechados.
- 5.- Usar agua caliente (arriba de 50°C) para el lavado. El agua fría puede ser menos efectiva. Añadiendo 100 ppm NaOCl se puede mejorar la remoción de glicerol de la membrana.
- 6.- Continúe enjuagando hasta que por lo menos 100 mL se hayan permeado. Asegúrese de que el NaOCl se haya eliminado por completo antes de introducir la solución a procesar.

Parámetros de Operación

La presión máxima de entrada es de 50 psi, para esta membrana de microfiltración la presión recomendable de entrada es de 3 a 10 psi. La temperatura máxima es de 60 °C y la membrana puede operar en un rango de pH de 2 a 13.

Almacenamiento

Antes de almacenar el cartucho se debe lavar a fondo, se limpia y se enjuaga con agua limpia, para el almacenamiento a corto plazo (hasta dos semanas) los cartuchos sólo deben ser humedecido con agua.

Para almacenamientos más largos, los cartuchos pueden ser llenados con una solución de almacenamiento y sellados en todas las terminales y orificios de permeado. La solución de almacenamiento puede ser:

- 1.- Agua con 5 a 10 ppm de cloro activo (10 a 20 ppm de hipoclorito de sodio).
- 2.- Hidróxido de sodio 0.1 N
- 3.- Formalina hasta 3 %.
- 4.- Solución de etanol al 30 %.

Para un almacenamiento más prolongado se recomienda que las membranas permanezcan humedecidas. Antes de su reutilización se recomienda que el cartucho sea lavado con una solución con 100 ppm de hipoclorito de sodio.

Anexo B: Turbidímetro portable TN-100/T-100, Manual de Instrucciones

1. Calibración de turbidímetro

El turbidímetro TN-100/T-100 fue calibrado y probado antes de dejar la fábrica. Por lo tanto, es posible usar directamente el instrumento al sacarlo de su caja. Sin embargo, una re-calibración del instrumento es recomendada para ayudar a familiarizarse con la operación del instrumento y el procedimiento de calibración. En adición, se recomienda una re-calibración al menos una vez al mes para una precisión óptima.

Se recomienda que se realiza una completa calibración usando las 4 soluciones estándar dadas para **asegurar un rango total óptimo.**

1.1 Soluciones de calibración

Se recomienda que se usen los siguientes materiales durante la calibración para lograr el estado óptimo en este manual:

CAL 1: 800 NTU solución de calibración

CAL 2: 100 NTU solución de calibración

CAL 3: 20.0 NTU solución de calibración

CAL 4: 0.02 NTU solución de calibración

Procedimiento de calibración

Coloque el turbidímetro TN-100/T-100 en una superficie plana equilibrada, seleccione la función de calibración del instrumento presionando el botón CAL una vez. El anunciador [CAL] parpadeará momentáneamente y el medidor le pedirá la primera solución de calibración CAL 1 (800 NTU). Inserte la solución CAL 1 (800 NTU) en el orificio de muestra, alineando la marca del vial con la marca del medidor, Figura 45.

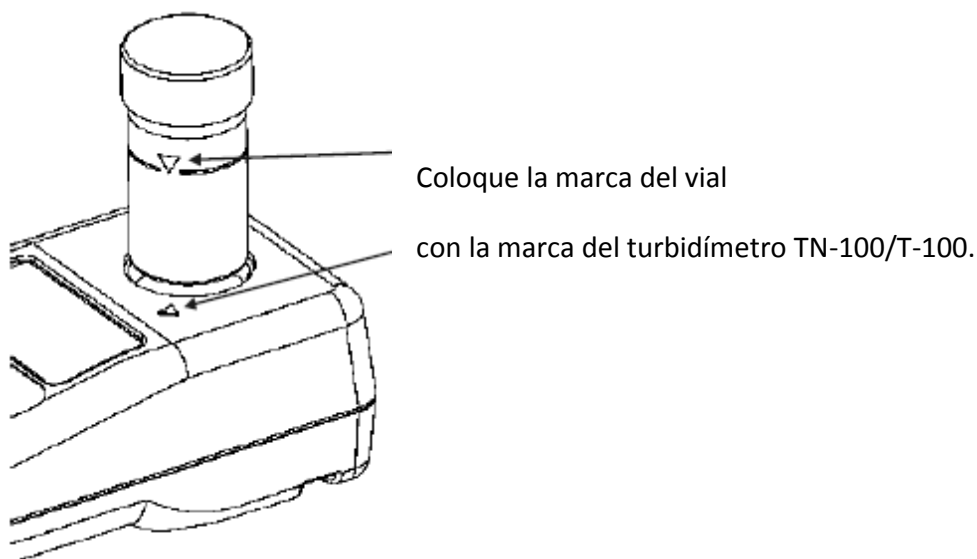


Fig. 45 Alineación del vial con el turbidímetro.

Presione hasta que el vial quede completamente dentro del instrumento, presione el botón READ/ENTER.

El anunciador [CAL 1 800 NTU] parpadeará por aproximadamente 12 segundos.

Cuando el instrumento haya completado la calibración hasta este punto, te pedirá que insertes la próxima solución de calibración dentro del instrumento [CAL 2 100 NTU], repita la secuencia de calibración para cada solución de calibración.

Después de que haya calibrado exitosamente la solución CAL 4 (0.02 NTU), la pantalla mostrará [STbY], El medidor está listo para la siguiente medición.

2. Medición de turbidez

2.1 Información general

El turbidímetro TN-100/T-100 a prueba de agua te permite medir la turbidez de una muestra colectada. La turbidez es reportada en Unidades nefelométricas de turbidez (por sus siglas en inglés NTU). La lectura fuera de 1000 NTU está fuera del rango del instrumento.

2.2 Procedimiento de medición de turbidez

Una óptima medición de la turbidez depende de buenas técnicas de medición. Factores como la limpieza de los viales, el posicionamiento del vial en el muestreador, la calibración, la base del turbidímetro y otros, tienen que tomarse en consideración.

2.2.1 Preparación de los viales

Tome líquido con el tubo de plástico otorgado, tome un vial seco y limpio (Fig. 46a), tenga cuidado de manejar el vial por la tapa. Vierta en el vial aproximadamente 10 cm³ de la agua, tape el vial con la tapa de enrosque negra y agítelo suavemente varias veces. Deseche la muestra utilizada y repita el procedimiento de lavado dos o más veces.

Llene el vial lavado con la porción remanente (10 cm³ aproximadamente) de la muestra hasta la marca indicada en el vial. Tape el vial con la tapa de enrosque negra.

Limpie el vial con la tela suave libre de hilo. Asegure que el exterior del vial esté seco y libre de manchas, aplique una delgada película de aceite de silicona (incluido) en el vial de muestra (Fig. 46b), limpie con la tela suave para obtener una mejor distribución sobre toda la superficie del vial, ahora se encuentra listo para colocar el vial dentro del muestreador.

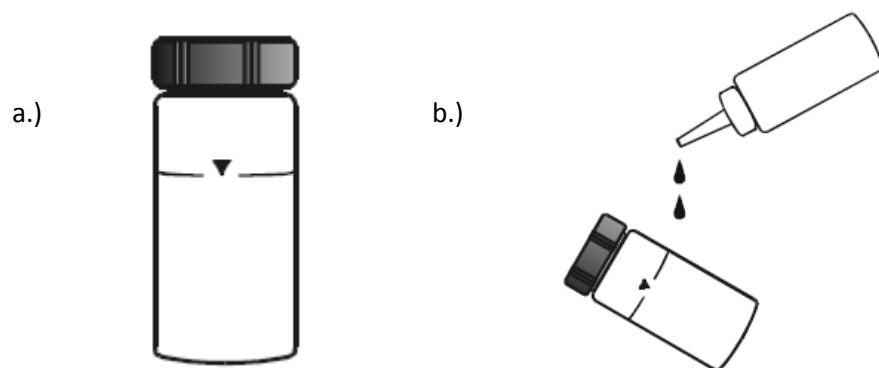


Fig. 46 a) Vial muestreador, b) Aplicación de una delgada película de aceite de silicona.

Para mediciones continuas asegúrese de que el medidor se encuentra en una superficie plana y equilibrada y está en modo de medición. La pantalla muestra [STbY], coloque el vial con la muestra dentro del muestreador, presione READ/ENTER y sostenga aproximadamente 0.3 segundos, la pantalla parpadeará [-Rd-] durante 10 veces o más y se mostrará el valor medido.

Anexo C: Curva estándar para análisis de Cromatografía Líquida de Alta Resolución con columna de interacción hidrofóbica (HPLC-HIC).

La concentración de muestras tomadas en los experimentos se determinó mediante el uso de una curva estándar, que se obtuvo del análisis de muestras con concentraciones conocidas de plásmido purificado por medio un kit comercial. El análisis de estas muestras de concentraciones de 5 a 250 $\mu\text{g/mL}$ se realiza en el mismo equipo de HPLC-HIC utilizado para todos los análisis en los procesos. El resultado se muestra en la Figura 47.

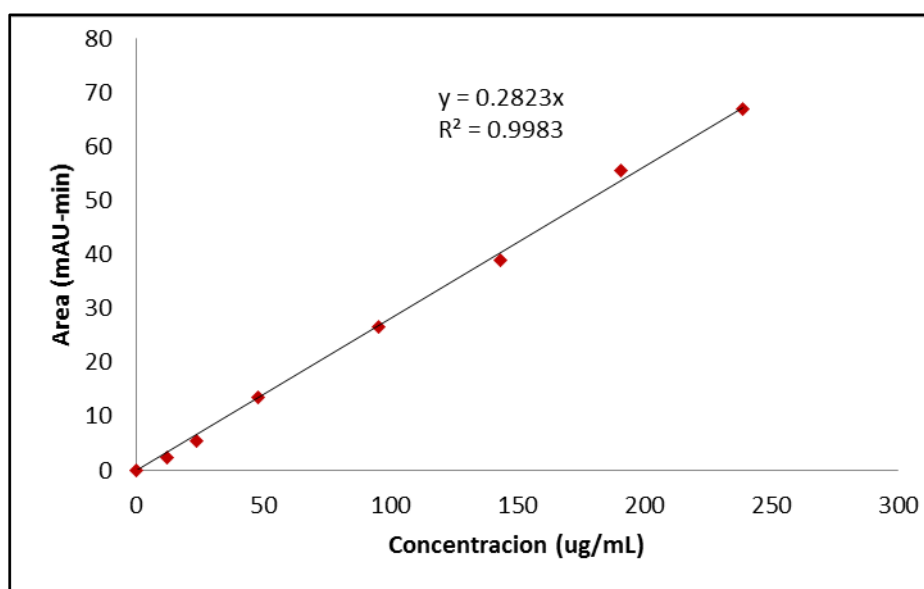


Fig. 47 Curva estándar para análisis de muestras en HPLC-HIC.

Anexo D: Datos experimentales utilizados en el ajuste del modelo de MFLP a flujo constante.

Tabla 18 Datos experimentales obtenidos en MFLP 1-A.

Tiempo (seg)	Vol. (mL)	Presión In (psi)	Presión Salida (psi)	ΔP (psi)
0	0	0	0	0
60	4	1.1	1	0.1
120	11	1.3	1.2	0.1
180	14	1.4	1.2	0.2
240	18	1.5	1.3	0.2
300	21	1.6	1.3	0.3
360	24	1.7	1.3	0.4
420	29	1.4	1	0.4
480	32	1.3	0.9	0.4
540	35	1.5	1.1	0.4
600	38	1.6	1.1	0.5
660	39	1.7	1.1	0.6
720	45	1.7	1.1	0.6
780	48	1.7	1.1	0.6
840	51	1.8	1.1	0.7
900	55	1.8	1.1	0.7
960	59.5	1.7	1	0.7
1020	61	1.9	1.1	0.8
1080	67	1.8	0.9	0.9
1140	68	1.2	0.5	0.7

Tabla 19 Datos experimentales obtenidos en MFLP 1-B1.

tiempo (seg)	Vol. (mL)	Presión In (psi)	Presión Salida (psi)	ΔP (psi)
0	0	0	0	0
60	8	0.5	0.3	0.2
120	15	0.5	0.3	0.2
180	18	0.5	0.3	0.2
240	22	0.6	0.3	0.3
300	26	0.6	0.3	0.3
360	32	0.6	0.3	0.3
420	37	0.6	0.3	0.3
480	42	0.7	0.3	0.4
540	47	0.9	0.3	0.6