



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

**RECUPERACIÓN INTERMEDIA DE ADN PLASMÍDICO A PARTIR DE
CULTIVOS DE *E. coli* APLICANDO ULTRAFILTRACIÓN CON FLUJO TANGENCIAL**

TESIS

Que para obtener el título de

INGENIERO QUÍMICO

Presenta:

JULIETH ALEJANDRA FIGUEROA ROSETTE

Hermosillo, Sonora

Mayo 2011

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

Agradecimientos

A DIOS.

A MIS PADRES:

José Héctor Figueroa Paredes

Sandra Guadalupe Rosette Medina

Por ser mí soporte y guías ejemplares durante mí desarrollo emocional y profesional.

A MIS HERMANAS:

Sandra, Karla, María José y Cynthia

Por el cariño y paciencia que me brindan cada día

A MIS FAMILIARES:

Que de alguna forma contribuyeron a lograr este fin.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS:

Les agradezco la amistad sincera que siempre me han brindado.

A ADÁN GUITERREZ OBESO

Por el apoyo y compañía a lo largo de la carrera y realización de este trabajo.

A MIS MAESTROS:

Por su gran labor académica.

A MIS SINODALES:

Por su colaboración y atenciones prestadas a través de la realización de este estudio.

CON TODO RESPETO:

A LA UNIVERSIDAD DE SONORA.

AL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

LABORATORIO DE BIOPROCESOS DEL DICTUS

RESUMEN

El interés en la terapia génica y en la producción de vacunas basadas en ADN plasmídico se ha incrementado en los últimos años, ya que son técnicas novedosas, para el tratamiento o para la prevención de enfermedades genéticas o infecciosas. El éxito de estas técnicas que utilizan ADN plasmídico como vector, depende del desarrollo de bioprocesos que entreguen este material de la mejor calidad y además sean escalables y sustentables.

Actualmente existen estudios dirigidos por mejorar y optimizar cada una de las etapas involucradas en el proceso de purificación de ADN plasmídico. El bioproceso consta, en general de cuatro etapas: propagación celular, recuperación primaria, recuperación intermedia y purificación final. Esta investigación se centra en estudiar la etapa de recuperación intermedia, ya que es crucial para proveer un material de buena calidad en la etapa de purificación.

La ultrafiltración con flujo tangencial (TFF) aparece como alternativa en la etapa de recuperación intermedia para la pre-purificación del plásmido a partir del lisado clarificado de cultivos de *E.coli*. Es una técnica de separación que se caracteriza por una circulación rápida del líquido a filtrar tangencialmente a una membrana. Dentro de sus ventajas se pueden mencionar el de concentrar y eliminar moléculas pequeñas y permeables (sales, proteínas, endotoxinas, ARN). Esto permite reducir la mayor cantidad de impurezas o contaminantes presentes en la solución conteniendo el plásmido.

En el presente trabajo, se utilizó como macromolécula modelo el plásmido pVAX1 con el gen insertado LipL-32. La pre-purificación se logró con un sistema de ultrafiltración tangencial en modo continuo utilizando membranas huecas de diferente tamaño de corte: 100, 300 y 500 kDa. Seleccionando las condiciones de operación adecuadas incluyendo, tamaño de poro de la membrana, diferencial de presión y flujo de alimentación, se consiguió la remoción de contaminantes de la solución de lisado clarificado sin la necesidad de agregar agentes químicos al proceso.

Además, se desarrolló un modelo, basado en el balance de masa, que describe el sistema de ultrafiltración tangencial que se utilizó en la etapa de recuperación intermedia. El sistema de

ultrafiltración tangencial resultó ser eficiente para la pre-purificación de plásmido y se considera fácil de escalar sin generar un impacto ambiental desfavorable, dado que la operación no utiliza agentes químicos, ni produce desechos.

CONTENIDO

RESUMEN	i
CONTENIDO	iii
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABLAS	ix
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 Introducción	1
1.1 Objetivo General.....	3
1.2 Objetivos Específicos.....	3
CAPÍTULO II	4
ANTECEDENTES	4
2.1 Terapia Génica	4
2.2 Características Físicas y Químicas de los Plásmidos	4
2.3 Características del PVAX1-LipL32.....	7
2.4 Descripción del Proceso de Producción y Purificación de ADNp.....	8
2.4.1 Fermentación	8
2.4.2 Recuperación Primaria	10
2.4.3. Recuperación Intermedia.....	11
2.4.4 Purificación Final	13
2.4.5 Control de calidad y Especificaciones del Producto	14
	iii

2.5 Teoría de Ultrafiltración con Flujo Tangencial	14
2.5.1 Tipo de membranas para la Ultrafiltración Tangencial	15
2.5.2 Diafiltración	17
2.5.3 Impacto Ambiental de Técnicas utilizadas para la Recuperación Intermedia del Plásmido.....	18
CAPÍTULO III.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Materiales	21
3.2. Equipo	22
3.3 Metodología.....	25
CAPÍTULO IV	35
RESULTADOS Y DISCUSION	35
4.1 Fermentación	35
4.2 Recuperación Primaria.....	36
4.3 Recuperación Intermedia.....	37
CAPÍTULO V.....	53
CONCLUSIONES.....	53
CAPÍTULO VI	54
RECOMENDACIONES	54

CAPÍTULO VII	55
REFERENCIAS	55
ANEXOS	59
ANEXO A. Manual de Operación del Sistema de Ultrafiltración con Flujo Tangencial (MidJet Benchtop System)	60
1. Elementos del Sistema	60
2. Aplicaciones.....	61
3. Descripción del Equipo y Accesorios del Sistema MidJet Benchtop	62
4. Instalación del Sistema MidJet System	63
5. Operación del Sistema MidJet Benchtop System.....	69
5.1 Procedimiento para iniciar el sistema:	69
5. 2 Parámetros de Operación	70
5.3 Volumen de Diafiltrado Constante	70
5.4 Procedimiento durante el Experimento	70
5.5 Para apagar el Sistema seguir los siguientes pasos:	72
6. Mantenimiento del Sistema.....	72
7. Especificaciones del Sistema MidJet Benchtop	72
ANEXO B. Instrucciones de Operación de Membranas de Fibra Hueca en el Sistema de Flujo Tangencial MidJet Benchtop	73
1.Procedimiento para el uso de una nueva membrana de fibra hueca	73
2. Flujo de Alimentación al sistema	74
3. Almacenamiento de la Membrana.....	76
ANEXO C. Programa utilizado para Regresión no Lineal	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del ADN plasmídico.....	6
Figura 2. Representación esquemática del vector pVAX1-LipL32.....	7
Figura 3. Curva típica de crecimiento de una Fermentación por lotes y una Fermentación por lote alimentado.....	9
Figura 4. Modos de ultrafiltración	15
Figura 5. Módulos utilizados en un sistema de ultrafiltración con flujo tangencial (Adaptado de Schwartz L., 2003).	16
Figura 6. Perfil de concentración de la solución de alimentación a lo largo de la membrana. ...	17
Figura 7. Cantidad de agua y agentes requeridos para un lisado alcalino de 100 procesos batch de 1L por año utilizando diferentes alternativas de recuperación intermedia de plásmido.	20
Figura 8. Costo de operación y de equipo requerido para un lisado de 100 procesos batch de 1 L en la etapa de recuperación intermedia.	20
Figura 9. Incubadora, Orbital Shaker Incubator, VWR	23
Figura 11. Centrífuga Allegra X-22, Beckman Coulter	24
Figura 12. Sistema de ultrafiltración con flujo tangencial MidJet Benchtop System, GE	24
Figura 13. Cámara horizontal de electroforesis y Equipo Multi-Doc, Digital Imaging System, Trans UV de BioRad para fotografía.....	24
Figura 14. Diagrama del proceso de pre-purificación de plásmidos.....	25
Figura 15. Diagrama de la metodología utilizada en la etapa de recuperación intermedia	30
Figura 16. Diagrama simplificado del sistema de ultrafiltración con flujo tangencial	31
Figura 18. Curva de crecimiento batch de cultivo <i>E. coli</i> pVAX LipL-32.	35
Figura 19. Biomasa obtenida en la etapa de cosecha celular	36
Figura 20. Gel de electroforesis de muestras de lisado	37
Figura 21. Perfil de absorbancia y conductividad del filtrado utilizando una membrana con tamaño de corte 100 kDa, flujo 50 mL/min y ΔP de 1.5 psig.	38

Figura 22. Gel de electroforesis de muestras de filtrado y retenido utilizando una membrana de 100 kDa en un sistema de ultrafiltración tangencial.	39
Figura 23. Perfil de absorbancia y conductividad del filtrado utilizando una membrana con tamaño de corte de 300 KDa, flujo 50 mL/min y ΔP de 1.5 psig.....	40
Figura 24. Curva del coeficiente de retención en el sistema de ultrafiltración tangencial con membrana de 300 kDa, flujo de 50 mL/min y ΔP de 1.5 psig..	41
Figura 25. Perfil de concentración de solutos en la solución retenida en el sistema de ultrafiltración tangencial con una membrana de 300 kDa , flujo 50 mL/ min, ΔP 0.75 psig.	42
Figura 26. Perfil de concentración de solutos en la solución filtrada en el sistema de ultrafiltración con una membrana de 300 kDa de tamaño de corte, flujo 50 mL/min y ΔP de 1.5 psig	43
Figura 27. Gel de electroforesis de muestras de filtrado y retenido utilizando una membrana de 300 kDa en un sistema de ultrafiltración tangencial	44
Figura 28. Perfil de absorbancia y conductividad del filtrado utilizando una membrana con tamaño de corte de 500 KDa, flujo 50 mL/min y ΔP de 1.5 psig.	45
Figura 29. Curva del coeficiente de retención en el sistema de ultrafiltración tangencial con una membrana de 500kDa, flujo de 50 mL/min y ΔP de 1.5 psig.	46
Figura 30. Perfil de concentración de solutos en la solución retenida en el sistema de ultrafiltración tangencial con una membrana de 500 kDa kDa, flujo 50 mL/ min, ΔP 0.75 psig.	47
Figura 31. Perfil de concentración de solutos en la solución filtrada en el sistema de ultrafiltración con una membrana de 500 kDa de tamaño de corte, flujo 50 mL/min y ΔP de 1.5 psig.	48
Figura 32. Gel de electroforesis de muestras de filtrado y retenido utilizando una membrana de 500 kDa en un sistema de ultrafiltración tangencial	49
Figura 33. Perfil de concentración adimensional de solutos en la solución retenida durante la pre-purificación del plásmido en función del tiempo de proceso	50

Figura 34. Perfil de concentración de proteínas en la solución retenida durante la ultrafiltración tangencial.	51
Figura 35. Bomba peristáltica de 24 volts DC de una sola velocidad	63
Figura 36. Plataforma de montaje y bomba peristáltica	63
Figura 37. Perilla para ajustar la velocidad de flujo de alimentación al sistema	64
Figura 38. Kit de accesorios para tuberías, mangueras y una válvula de contrapresión.	64
Figura 39. Válvula de tres vías para la toma de muestras de la solución retenida	64
Figura 40. Ajuste de la manguera de alimentación en la bomba peristáltica	65
Figura 41. Tanque de 120 mL para la solución de alimentación	65
Figura 42. Tanque de 120 mL para la solución de lavado y solución de alimentación	66
Figura 43. Tanque de 30 mL para solución de filtrado, tanques de 120 mL para solución de lavado y alimentación	66
Figura 44. Membrana de fibra hueca para el sistema de ultrafiltración tangencial	67
Figura 45. Salida de la membrana para la solución filtrada	67
Figura 46. Válvula de retención o contrapresión en la línea de retroalimentación.....	68
Figura 47. Sistema de ultrafiltración con flujo tangencial (MidJet Benchtop System)	68

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización de ácidos nucleicos y otros componentes de una célula <i>E. coli</i>	5
Tabla 2. Métodos de Cromatografía utilizados para la purificación de ADNp.....	13
Tabla 3. Condiciones del biorreactor controladas durante el crecimiento de cultivo <i>E.coli</i> pVAX1-LipL32.....	27
Tabla 4. Efecto del tamaño de corte de una membrana de fibra hueca en la pre- purificación de plásmido por medio de ultrafiltración tangencial operando en modo continuo.	52

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

En la actualidad, el acceso a la tecnología en el área de la genética ha hecho posible acelerar el desarrollo de nuevos modelos de vacunas. A casi dos décadas del primer informe, en el cual se demostró que un gen puede expresarse mediante la inyección directa del ADN plasmídico, las vacunas de ADN han probado ser eficientes para inducir una respuesta inmunitaria protectora contra parásitos, virus y bacterias. (Sánchez J., 2009).

El interés en la terapia génica y en la producción de vacunas de ADN plasmídico (ADNp) se ha incrementado en los últimos años. El uso de plásmidos, como vector no viral, se ha considerado una alternativa para la prevención, tratamiento y cura de enfermedades hereditarias monogénicas o adquiridas como el cáncer, hepatitis B, malaria, influenza, hemofilia, sida, problemas vasculares y desórdenes neurológicos. (Freitas *et al*, 2006). El uso de vacunas de ADN resulta más económico, seguro y fácil de producir a gran escala que las convencionales (virales). Sin embargo, se requiere una alta calidad y cantidad de ADN plasmídico (gramos o kilogramos para la aplicación clínica) (Jae-Young Kim, *et al.*, 2010). Existe un gran interés por mejorar y optimizar cada una de las etapas involucradas en el proceso de purificación de ADN plasmídico.

El bioproceso consta de cuatro etapas: fermentación, recuperación primaria, recuperación intermedia y purificación final. Esta investigación se centra en estudiar la etapa de recuperación intermedia, ya que es crucial para proveer un material de buena calidad en la etapa de purificación. El objetivo de la etapa de recuperación intermedia es reducir el contenido de sales del lisado clarificado y concentrar la solución de ADN plasmídico (ADNp), además de eliminar algunas impurezas (ARN, proteínas). La reducción de volumen o concentración de ADNp, generalmente se acompaña de precipitación con agentes como

isopropanol y sales aglutinantes como sulfato de amonio (Freitas *et al.*, 2006; Diogo *et al.*, 2001). El uso de estos agentes químicos ha sido probado, con buenos resultados, a nivel laboratorio, sin embargo presenta problemas al escalar el proceso, por las grandes cantidades de agentes utilizados y al desechar los residuos.

El presente trabajo consiste en utilizar una operación unitaria que permita realizar una pre-purificación del ADN plasmídico, evitando de esta manera el uso de agentes químicos que regularmente se utilizan para el mismo fin. La ultrafiltración como herramienta de separación dentro del proceso de purificación de plásmido no es muy común, sin embargo se ha utilizado para la producción y concentración de proteínas. La ultrafiltración con flujo tangencial (TFF) aparece como alternativa en la pre-purificación de plásmido a partir del lisado clarificado de cultivos de *E.coli* (Freitas, 2007).

La TFF es una técnica de separación que se caracteriza por una circulación rápida del líquido a filtrar tangencialmente a una membrana, así, al tiempo que se efectúa la ultrafiltración, se limpia la membrana, lo que permite trabajar en continuo con características de operación estables. Al utilizar membranas de fibra hueca en la etapa de pre purificación se aprovecha el tamaño grande de la molécula de plásmido ($3.3 - 13.2 \times 10^3$ kDa), permitiendo concentrar y eliminar moléculas más pequeñas y permeables (sales, proteínas, endotoxinas, RNA pequeño) a través de los poros de dicha membrana, logrando así una pre-purificación del plásmido. Investigaciones realizadas en ésta etapa (Eon-Duval *et al.*, 2004, 2003; Kendall *et al.*, 2002; Kahn *et al.*, 2000) coinciden que la TFF es escalable, reproducible, de bajo costo y no implica el uso de agentes precipitantes, que son las principales ventajas desde el punto de vista de producción a gran escala.

1.1 Objetivo General

Investigar la operación de ultrafiltración con flujo tangencial en la etapa de recuperación intermedia a partir de lisados celulares en el proceso de producción y purificación de ADN plasmídico.

1.2 Objetivos Específicos

- Investigar la operación de ultrafiltración con flujo tangencial del lisado celular, en la pre-purificación de plásmido, utilizando tres cartuchos de membranas de fibra hueca con diferente tamaño de corte: 100, 300, 500 kDa.
- Seleccionar la membrana que ofrezca la mejor eliminación de impurezas (ARN y proteínas), en base a los estudios electroforéticos y análisis de absorbancia.
- Demostrar las ventajas que ofrece un sistema de ultrafiltración con flujo tangencial para pre-purificación de plásmido.
- Desarrollar un modelo que describa el sistema de ultrafiltración con flujo tangencial en la pre-purificación del ADN plasmídico.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 Terapia Génica

La terapia génica es un proceso que consiste en transferir de manera eficiente el material genético a la célula receptora del cuerpo humano, para que codifique la síntesis de alguna proteína, que al expresarse, realiza una acción inmunizante o terapéutica. Uno de los métodos para administrar genes terapéuticos es la inyección directa de ADN plasmídico. Este tipo de tratamiento requiere de cantidades considerables de plásmido. Una dosis típica son 0.3 microgramos, pero otros tratamientos pueden necesitar miligramos de plásmido (Prazeres, *et al.*, 1998).

Los plásmidos poseen un interés singular en Ingeniería Genética por ser uno de los sistemas de vectores más sencillos de usar (Cejudo *et al.* 2009). En 2007, alrededor del 30% de estudios clínicos de terapia genética utilizaron los plásmidos como vector. (Prazeres, *et al.*, 2008). Los plásmidos para la terapia genética son generalmente producidos en células huésped de *Escherichia coli* por fermentación. La mayoría de las moléculas de plásmido aisladas de células de *E.coli* son superenrollados con una estructura delgada y ramificada, lo cual permite que se adapte con facilidad a la célula. Se deben de eliminar todos los componentes celulares que hacen inefectivo la transferencia del gen de expresión. Estos son proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, fragmentos de ADN cromosómico (ADNc), moléculas de ARN y variantes de plásmido que se obtienen después de la lisis (Prazeres D.M.F., *et al.*, 2006).

2.2 Características Físicas y Químicas de los Plásmidos

Los plásmidos son moléculas extracromosómicas de ADN circular y de doble hélice, que se caracterizan por que se pueden replicar de manera independiente del ADN genómico. (Giudice

et al., 1984). Cada cadena de ADN plasmídico es un polímero lineal de desoxirribonucleotidos unidos por enlaces fosfodiester (Prazeres, *et al.*, 2001). Los plásmidos no son necesarios para la viabilidad general de la célula, pero pueden contener genes que contribuyen a la supervivencia en condiciones especiales, en grado de conferir particularidades fenotípicas a las bacterias que los contienen como la resistencia a antibióticos, a metales etc. (Cejudo *et al.*, 2009). El peso molecular promedio de una molécula de plásmido ($3.3 - 13.2 \times 10^3$ kDa), y otras moléculas de ácidos nucleicos se presentan en la Tabla 1. (Diogo *et al.*, 2005)

Tabla 1. Caracterización de ácidos nucleicos y otros componentes de una célula *E. coli*

Especie	%w/w	Especie/célula	Peso Molecular (kDa)
Agua	70	1	18
Ácidos Nucleicos			
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

Adaptado de Diogo, *et al.*, 2005

Los plásmidos pueden aparecer en cinco conformaciones espaciales:

- a) Plásmido Lineal: tiene terminales libres, resulta del rompimiento químico de los enlaces fosfodiester de cadenas de ADN opuestas.
- b) Plásmido circular abierto o relajado: rompimiento de una cadena.

- c) Superenrollado: se forma cuando el eje de la hélice del ADNp se encuentra enrollado en el espacio, formando una estructura de alto orden, es la isoforma más compacta y se considera que es más activa. Esta estructura es más estable y efectiva en transfección celular que las otras, por lo que en una preparación de ADNp para aplicación terapéutica debe contener al menos el 95 % de esta isoforma.
- d) Dímero (Oligomérico): consecuencia de recombinación homóloga.
- e) Desnaturalizado: conformación donde el enlace de hidrógeno entre cadenas complementarias con cierta ubicación ha sido interrumpido. La desnaturalización resulta de arreglos en la estructura del hélice del ADN, la cual generalmente depende del ambiente que lo rodea (pH, fuerza iónica y temperatura), por ejemplo a pH mayores de 13, el ADNp se desnaturaliza. (Prazeres, *et al.*, 2001).

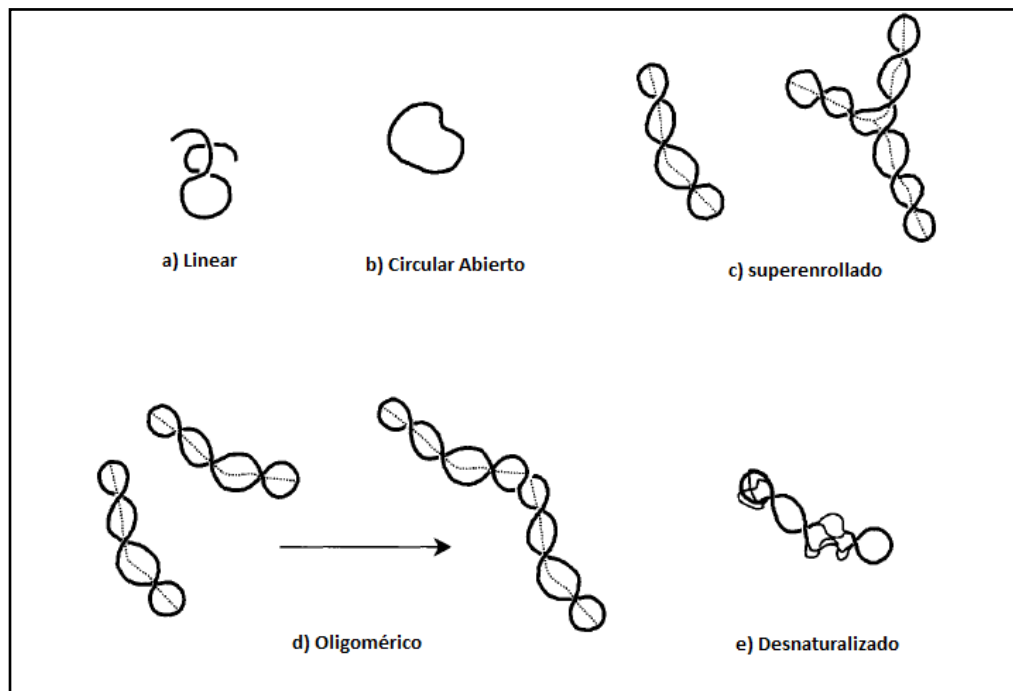


Figura 1. Representación esquemática del ADN plasmídico. a) plásmido lineal, b) plásmido circular abierto, c) plásmido superenrollado, d) Dímero u oligomérico, e) plásmido desnaturalizado (Adaptado de Prazeres *et al.*, 2001).

2.3 Características del pVAX1-LipL32

El gen LipL-32 fue clonado en el plásmido pVAX1 (Figura 2), con el cual se transformó *Escherichia coli DH5α*. Está diseñado para atacar la enfermedad conocida como *leptospirosis*. El agente infeccioso de leptospirosis es una bacteria Gram negativa que pertenece al género *Leptospira*. Ésta bacteria es totalmente dependiente de oxígeno y tiene una temperatura óptima de crecimiento entre 29 °C y 30 °C a un pH de 7.2-7.6 (Sandoval, 2008).

La *leptospirosis* es una enfermedad que afecta tanto a animales como al ser humano. Los mecanismos de infección son a través de la piel erosionada, mucosa ocular y nasal, al estar en contacto con agua, suelos húmedos y vegetación contaminada con orina, o por manipular fetos, placentas y vísceras de animales infectados. Las manifestaciones clínicas por lo general son temperatura elevada, cefalea, escalofríos, diaforesis, disnea de esfuerzo, derrame y hemorragia conjuntival, náuseas, vómito y diarrea.

La *leptospirosis* es una de las enfermedades de mayor impacto económico por las grandes pérdidas que ocasiona en la ganadería o en animales de granja, en especial en bovinos (Mazzonelli *et al.*, 1994; Radostits *et al.*, 2002.) , presentándose como una zoonosis de amplia intensidad en el mundo (OIE, 2004).

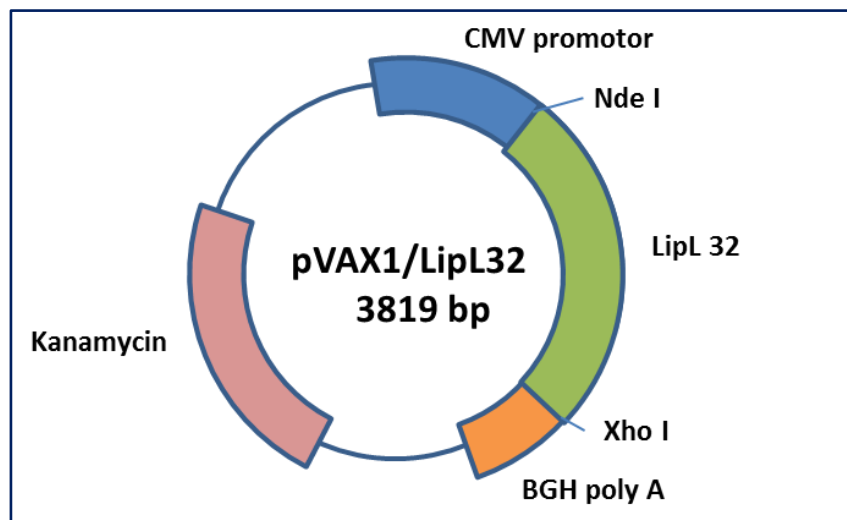


Figura 2. Representación esquemática del vector pVAX1-LipL32. El plásmido contiene una región promotor (CMV). El vector incluye las regiones que corresponden al gen de resistencia a antibióticos, en este ejemplo a la kanamicina y al origen de replicación en bacterias (Adaptado de Feng *et al.*, 2009).

2.4 Descripción del Proceso de Producción y Purificación de ADNp

El bioproceso para la producción de plásmido comprende todas las operaciones que requiere el caldo de cultivo para la obtención del producto en las condiciones de pureza y actividades deseadas. El proceso consta de cuatro pasos principales: Fermentación, Recuperación Primaria, Recuperación Intermedia y Purificación Final, los cuales se describen brevemente a continuación.

2.4.1 Fermentación

La fermentación de la bacteria hospedera puede realizarse en diferentes medios de cultivo, dependiendo del objetivo que se haya fijado. Generalmente, se emplean medios simples disponibles comercialmente como el Luria Bertani (LB) y Terrific Broth (TB). El requerimiento de pequeñas cantidades de plásmido purificado se puede realizar a escala laboratorio en cultivos en matraces agitados. Para mayor producción de cultivos celulares se utilizan biorreactores controlados (control de oxígeno disuelto y pH) en distintos modos de operación. La cuantificación de la concentración celular en un medio de cultivo es necesaria para la determinación de la cinética y estequiometría del crecimiento celular. Componentes intracelulares como el ARN, ADN y proteínas se pueden medir indirectamente con el crecimiento celular (Shuler y Kargi, 2002).

Fermentación por Lotes

La fermentación por lotes se conoce por su simplicidad. Todos los nutrientes para el crecimiento de la célula están presentes al momento de la inoculación. Durante un cultivo batch, la concentración de estos componentes intracelulares cambia con el tiempo. Al graficar datos de concentración celular contra tiempo se forma la curva típica de crecimiento. Esta curva incluye una fase lag, fase exponencial o logarítmica de crecimiento, fase estacionaria y fase de muerte (Fig. 3). La cinética puede describirse con la ecuación logística:

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

Donde: $X_{(t)}$ es la concentración celular (g peso seco celular/L), X_0 es la concentración inicial de la biomasa (g peso seco celular/L), X_∞ es la concentración de la biomasa cuando el tiempo tiende a infinito (g peso seco celular/ L) y μ es la velocidad específica de crecimiento (Shuler y Kargi, 2002).

Fermentación por Lote Alimentado

La fermentación por lote alimentado inicia con una fase por lotes. La alimentación controlada de sustrato empieza cuando las células han consumido la cantidad inicial de nutrientes. (Prather *et al.*, 2003). Las estrategias de alimentación pueden ser por control retroalimentado, basado en OD, pH, actividad metabólica de biomasa y concentración de sustrato. También por alimentación constante, lineal, escalonada, exponencial (Control predeterminado). En la Figura 3 se muestra una curva típica de crecimiento batch y por lote alimentado.

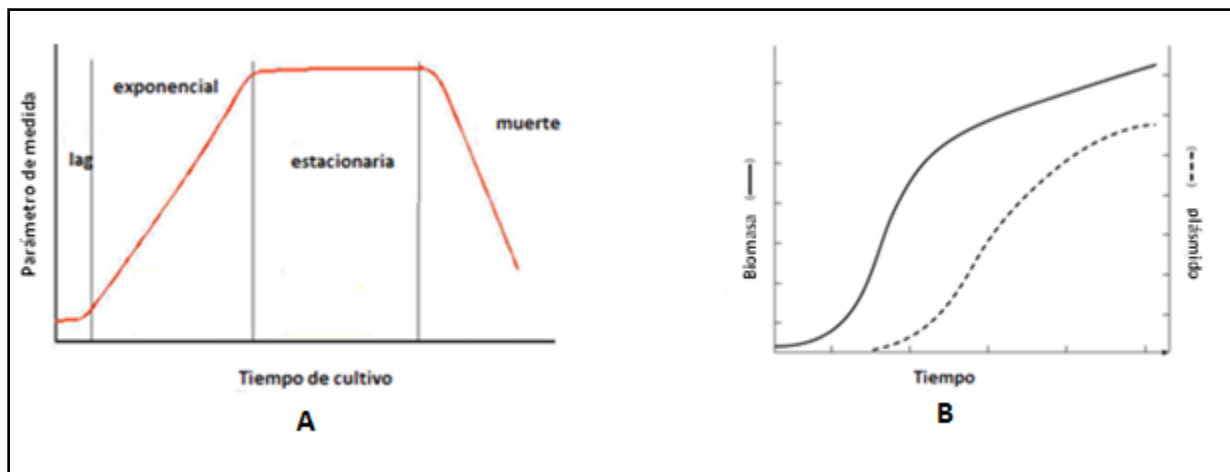


Figura. 3 a) Curva típica de crecimiento de una Fermentación por lotes y b) Fermentación por lote alimentado.

2.4.2 Recuperación Primaria

Las células obtenidas del caldo después de la etapa de fermentación deben de pasar por un proceso de rompimiento celular para poder dejar libre el contenido celular. Esta etapa consta de las operaciones de cosecha celular y lisis. El método de rompimiento varía con el tipo de célula y naturaleza de los productos intracelulares. Los métodos de rompimiento celular pueden ser divididos en métodos mecánicos y métodos químicos. (Shuler y Kargi, 2002)

Métodos de Rompimiento Celular

Métodos Mecánicos

- a) Molienda húmeda en molinos de perlas agitadas a alta velocidad. Las células son prensadas entre perlas de vidrio. Generalmente se utiliza en tratamiento de suspensiones celulares a gran escala (Tejeda *et al.*, 1995).
- b) Homogenización a alta presión. Las células son forzadas a pasar a través de un pequeño orificio lo que produce que se rompan por el esfuerzo de corte. Se utiliza en tratamiento de suspensiones celulares a gran escala (Shuler y Kargi, 2002).
- c) Ultrasonificación. Este método utiliza un generador eléctrico para romper la pared celular. Éste generador produce ondas de ultrasonido y un transductor convierte las ondas en oscilaciones mecánicas. La densidad de onda es generalmente alrededor de 20 kc/s. Este método se utiliza para medios líquidos y no es recomendable para células muy sensibles (Shuler y Kargi 2002).
- d) Homogenizador de cuchillos. las células son rotas en un mezclador. El esfuerzo cortante es moderado. Generalmente se utiliza para el rompimiento de tejidos y células animales (Tejeda *et al.*, 1995).

Métodos Químicos

- a) Choque Osmótico. El rompimiento celular consiste en la carga de un volumen dado de células dentro de agua pura. La célula se expande debido a que contiene solutos que ocasionan un flujo osmótico del agua hacia su interior. Esta expansión puede

conducir hacia su lisis o rompimiento. La factibilidad de este método depende de la resistencia mecánica de las células de interés.

- b) **Disolución lipídica.** Se añade a la suspensión celular un volumen de tolueno igual al de 10% de la biomasa. El tolueno es absorbido dentro de los lípidos de la pared celular, lo que produce la expansión de la pared y la ruptura de esta. El contenido es liberado y entonces puede ser separado el producto de interés.
- c) **Digestión Enzimática.** Consiste en el empleo de enzimas que atacan la pared celular y provocan el rompimiento celular. Una de las enzimas más utilizadas en la digestión enzimática de bacterias es la lisozima. (Tejeda *et al.*, 1995)
- d) **Tratamiento Alcalino.** Se basa en la solubilización de membranas por saponificación de lípidos pequeños. Un método utilizado comúnmente es el rompimiento celular con NaOH y dodecilsulfato de sodio a un pH controlado. Esto permite la desnaturalización selectiva de ADN cromosómico mientras que el ADN superenrollado mantiene su estructura de doble cadena (Birnboim y Doly, 1979).

Aunque se pueden utilizar varias técnicas en la ruptura de las células de *E. coli* para liberar las moléculas de ADNp, el daño es generalmente significativo (Zhu *et al.*, 2005; Prazeres *et al.*, 1999). El método más ampliamente usado es la lisis alcalina, originalmente descrito por Birnboim y Doly, (1979).

2.4.3. Recuperación Intermedia

El objetivo de la etapa de recuperación intermedia es actuar sobre el lisado clarificado de las células de *E. coli* para concentrar el ADN plasmídico y reducir la mayor cantidad posible de impurezas o contaminantes (ARN, proteínas), las cuales están presentes en un 90% de la masa total del soluto (Freitas *et al.*, 2009). Existen varias técnicas que se utilizan para la recuperación intermedia del plásmido. A continuación se describe brevemente cada una de ellas.

Precipitación (PP): Es un método muy popular que se utiliza para concentrar ADN plasmídico por medio de agentes químicos como el isopropanol, polietileno glicol (PEG). Tiene como ventajas la remoción de ácidos nucleicos de bajo peso molecular, separación de las isoformas

del plásmido lineal y superenrollado, remoción de gran cantidad de impurezas como proteínas, endotoxinas y RNA utilizando sulfato de amonio, acetato de amonio y cloruro de calcio. La desventaja de esta técnica es que tiene limitaciones de escalamiento y un costo elevado de instalación.

Sistema de Extracción en dos Fases Acuosa (ATPS): Es una alternativa para la recuperación intermedia del plásmido. Se utiliza PEG el cual se acumula en la fase superior y un segundo polímero o sal se enriquece en la fase inferior del sistema. En ambos casos las moléculas de plásmido se trasladan a la fase enriquecida de sal (parte inferior), mientras que la mayoría de las impurezas se mueven a la fase superior enriquecida de PEG 600. Se logra remover el 98% de RNA y proteínas, el 68% de endotoxinas. Tiene ventaja esta técnica si se quiere pasar la solución por una columna de cromatografía de interacción hidrofóbica ya que el plásmido fue recuperado en una fase enriquecida de sal.

Sistema Combinado de ATPS y Membranas: Es una técnica propuesta para la separación y purificación del plásmido sin necesidad de utilizar una columna de cromatografía como etapa final. Es un sistema de dos fases PEG 800/solución salina. El plásmido se recupera en la fase inferior enriquecida de sal y pasa por una segunda extracción para remover las impurezas e isoformas circular abierto restantes. En estudios realizados se obtuvo un rendimiento de plásmido de 95% (3% plásmido circular abierto) en un proceso de escala piloto (Freitas *et al.*, 2009).

Tratamiento con Ribonucleasas: El ARN representa uno de los principales problemas de purificación, ya que es uno de los contaminantes más difíciles de remover. Una práctica común para eliminarlo es utilizar ribonucleasa pancreática bovina (RNase A) en el buffer de lisis que, aunque es efectiva en la reducción de cantidad y tamaño de ARN, no es recomendable utilizarla ya que se puede encontrar contaminada con agentes infecciosos (Carnes *et al.*, 2007).

Ultrafiltración con Flujo Tangencial (TFF): Es una técnica de separación que se caracteriza por una circulación rápida del líquido a filtrar en dirección tangencial a la membrana. Toma ventaja en el tamaño grande de la molécula de plásmido ($3.3 - 13.2 \times 10^3$ kDa), permitiendo concentrar y eliminar moléculas más pequeñas y permeables (sales, proteínas, endotoxinas,

ARN pequeño). Se utilizan membranas porosas de diferente material y tamaño de poro. Se agrega una solución de lavado que permite que la membrana se esté limpiando constantemente. En general, la recuperación del plásmido es alta (80-100%) si se ha realizado un pre tratamiento a la solución de lisado (Tejeda *et al.*, 1995; Harrison, 2005).

2.4.4 Purificación Final

Como herramienta de purificación de plásmido, la cromatografía es la operación más utilizada. Diferentes métodos de cromatografía (Tabla 2) incluyendo, exclusión por tamaño, intercambio iónico, interacción hidrofóbica y afinidad, se han integrado en el proceso de purificación de plásmido.

Tabla 2. Métodos de Cromatografía utilizados para la purificación de ADNp.

Técnica Cromato-gráfica	Principio de Separación	Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
AEC	Fuerza electrostática	Concentración de pDNA Rápida y simple Remoción de impurezas de baja densidad de carga Variedad de fases estacionarias	Baja resolución de sc pDNA de gDNA e isoformas de pDNA Co-Elución con endotoxinas y RNA de alto PM	Captura, concentración y cuantificación
SEC	Tamaño molecular	Separa endotoxinas, gDNA, RNA de alto y bajo PM, olig-NT y proteínas Fracciona isoformas de pDNA	Volumen bajo de alimentación y concentración Corridas lentas Dilución del producto Limitación de escalamiento	Paso final de purificación Remoción de endotoxinas Fraccionamiento de isoformas
HIC	Hidrofobicidad	Separa endotoxinas y ácidos nucleicos de cadena simple Algunas fases separan isoformas de pDNA Rapidez	Elución de pDNA con alto contenido de sales Dilución de pDNA Costo elevado	Captura de impurezas Cuantificación de pDNA
AC	Tamaño y forma	Separa pDNA de impurezas e isoformas Concentración de pDNA	Elución de pDNA en soluciones de sales altamente concentrada	Captura y concentración de pDNA

AEC: Cromatografía de Intercambio iónico, SEC: Cromatografía de Exclusión molecular, HIC: Cromatografía de Interacción Hidrofóbica, AC: Cromatografía de Afinidad. (Adaptado de Carnes, 2005)

2.4.5 Control de calidad y Especificaciones del Producto

En la producción de ADN plasmídico, se debe cumplir con ciertas especificaciones de pureza, eficiencia, potencia y seguridad. Agencias regulatorias como Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos, La Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales (EMA) proveen una guía referida a las especificaciones y pruebas de calidad del ADN plasmídico como producto (Prazeres *et al.* 1998; Carnes, 2007).

Generalmente, el plásmido final debe de estar libre de ADN genómico (<10ng), proteínas (<10ng), ARN (no detectado en 0.8% gel de agarosa), endotoxinas o lipopolisacáridos LPS (1<EU/kg) y virus eliminados (>12log reducción o inactivados). (Prazeres *et al.* 1998; Queiroz 2008)

Una de las técnicas más comunes para verificar la calidad del plásmido es la técnica de electroforesis en gel de agarosa (Tejeda *et al.*, 1995).

2.5 Teoría de Ultrafiltración con Flujo Tangencial

La ultrafiltración es una operación unitaria que permite clarificar, concentrar y purificar solutos de interés en una solución utilizando membranas. Este tipo de ultrafiltración utiliza como fuerza impulsora la presión para separar componentes en una solución líquida basándose en la diferencia de tamaño de moléculas. (Grzeniaa *et al.*, 2008). Existen dos modos de ultrafiltración: Filtración con Flujo Normal (NFF) y Filtración con Flujo Tangencial (TFF). La diferencia de la dirección del fluido se puede observar en la Figura 4.

En la Ultrafiltración con Flujo Normal el fluido se dirige directamente hacia la membrana bajo una presión aplicada. Las partículas que son muy grandes para pasar a través de la membrana se acumulan en la superficie formando un gel, el cual, ensucia la superficie de la membrana y obstruye el fluido a través de ella. Generalmente se utiliza nitrógeno para ejercer presión sobre el fluido.

En la Ultrafiltración con Flujo Tangencial el fluido es bombeado de manera tangencial a lo largo de la superficie de la membrana. La presión aplicada permite que una porción del fluido pase a

través de los poros de la membrana. Al igual que en la NFF, las moléculas grandes son retenidas en la parte superior de la membrana, sin embargo, en este caso los componentes no se acumulan en la superficie de la membrana. Las partículas son arrastradas a lo largo de la membrana debido a la dirección de flujo tangencial (Schwartz, 2003). Ésta característica hace que la TFF sea ideal para procesos de separación basados en diferencia de tamaño de moléculas. Dentro de sus ventajas se pueden mencionar el de concentrar y desalinizar, remoción de proteínas, ácidos nucleicos (ARN, ADN), purificar ADN plasmídico a partir de lisado celular y preparar la muestra para introducirla a una columna de cromatografía (EonDuval, 2003; Schwartz, 2003); filtrar partículas de tamaño pequeño y efectuar una ultrafiltración continua sin necesidad de productos químicos (Vidal-Asaín, 1999).

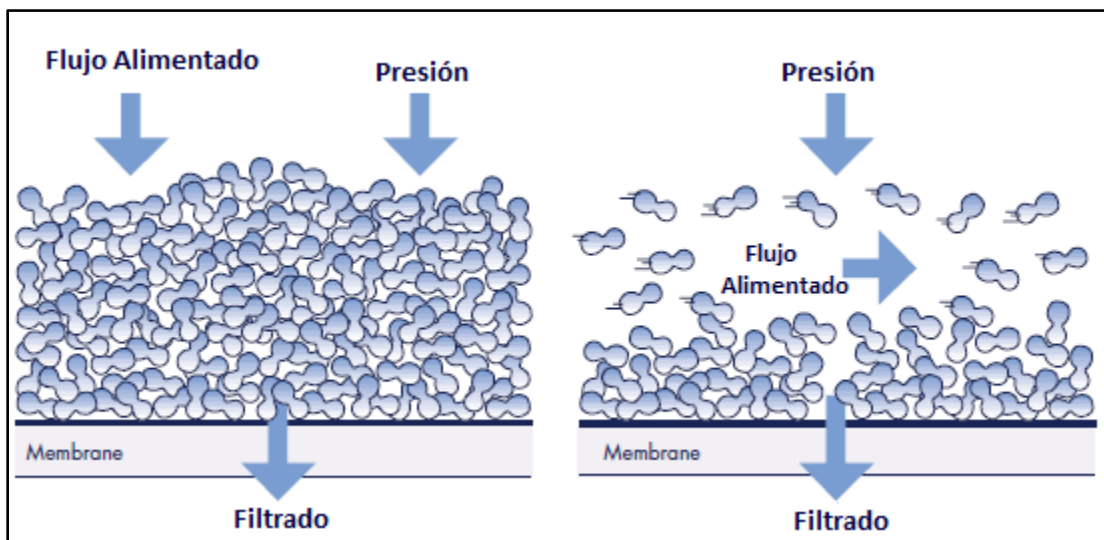


Figura 4. Modos de ultrafiltración a) Alimentación directa hacia la membrana (NFF) b) Alimentación en dirección tangencial a la membrana (TFF) (Adaptado de Schwartz, 2003).

2.5.1 Tipo de membranas para la Ultrafiltración Tangencial

Las membranas para un sistema de ultrafiltración deben cumplir con ciertas características. Deben de tener una alta permeabilidad, peso molecular de corte preciso, buena resistencia mecánica, química y térmica, baja tendencia a incrustamiento, facilidad de limpieza y larga vida

activa (Tejeda *et al.*, 1995; Seader, 2006). Debido al mecanismo de separación, las membranas de ultrafiltración tienen flujos apreciables mayores que las de la ósmosis inversa. (Wankat, 2008).

En la ultrafiltración, la mayoría de las membranas que se utilizan son fabricadas a partir de polímeros sintéticos orgánicos. Son microporosas asimétricas o anisotrópicas para separar macromoléculas de partículas pequeñas (Harrison, 2005). Se diferencian de las membranas tradicionales debido a que se pueden limpiar con facilidad y ser reutilizadas (Tejeda *et al.*, 1995). Además, se caracterizan por su Peso Molecular de Corte, el cual es el peso molecular del soluto globular que es retenido en un 90-95% por la membrana. El Peso Molecular de Corte puede variar entre 500 y 1, 000,000 Dalton para la mayoría de las membranas (Harrison, 2005). Las membranas más utilizadas en la TFF son módulos de Hoja Plana, Hoja Enrollada en Espiral y Fibra hueca (Figura 5).

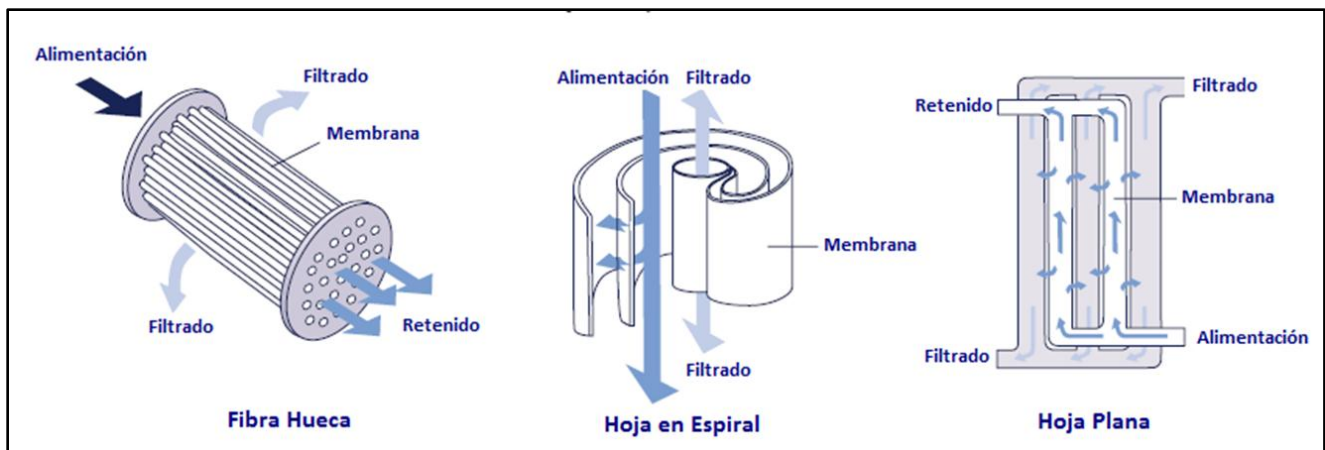


Figura 5. Módulos utilizados en un sistema de ultrafiltración con flujo tangencial (Adaptado de Schwartz L., 2003).

En comparación con las membranas de ultrafiltración con flujo normal, la ultrafiltración tangencial involucra una línea de recirculación de la solución de alimentación a través de la superficie de la membrana impulsada por una bomba peristáltica. La acción tangencial que realiza el fluido a través de la membrana promueve mayor consistencia en la producción del soluto y se crea un esfuerzo cortante muy bajo debido a la alimentación tangencial, siendo útil para productos muy sensibles.

La presión ejercida sobre el fluido permite que una porción del fluido pase a través de la membrana. El resultado es un gradiente de concentración de la solución inicial desde el centro del cartucho hacia las paredes de la membrana. También se crea un gradiente de concentración a lo largo de la membrana desde la entrada del flujo de alimentación hacia la salida de la solución retenida. En la Figura 6 se describen los flujos y las fuerzas dentro de la membrana de fibra hueca.

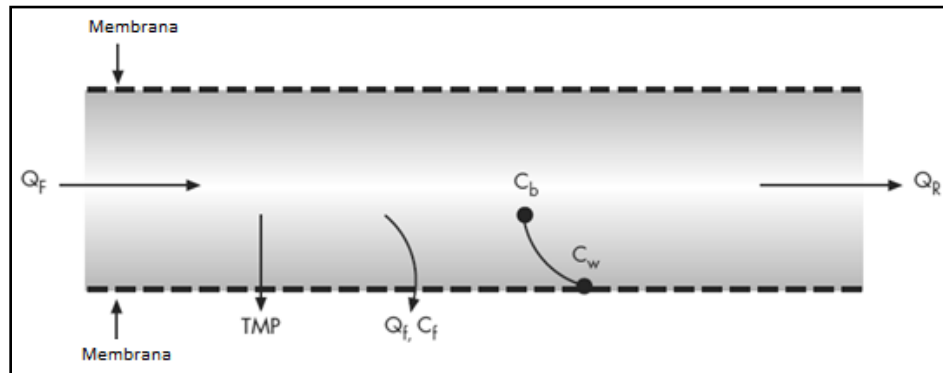


Figura 6. Perfil de concentración de la solución de alimentación a lo largo de la membrana. Q_f : Flujo de alimentación [$L h^{-1}$], Q_R : Flujo de retenido [$L h^{-1}$], Q_f : Flujo de filtrado [$L h^{-1}$], C_b : Concentración del componente en el seno de la solución [$g L^{-1}$], C_w : Concentración del componente en la superficie de la membrana [$g L^{-1}$], C_f : Concentración del componente en la corriente de filtrado [$g L^{-1}$], TMP : Presión aplicada a lo largo de la membrana [bar] (Adaptado de Schwartz L., 2003).

Dos fenómenos que afectan la permeabilidad de la membrana son la polarización y taponamiento de la membrana. Estos fenómenos son causados por el transporte convectivo de las moléculas presentes en la solución hacia la membrana. Se espera que el plásmido sea retenido por la membrana debido a su alto peso molecular, sin embargo se ha observado la transmisión del plásmido hacia el filtrado debido a su flexibilidad y elongación (Freitas, 2007).

2.5.2 Diafiltración

Si se realiza un proceso de lavado de manera que el filtrado sea reemplazado por un volumen igual de solvente, los solutos retenidos se limpiarán a través de la membrana del sistema más eficientemente. La diafiltración diluye la alimentación y permite que la concentración del soluto

de interés aumente. También se utiliza para producir productos de alta pureza y fraccionar productos de alto valor (Perry, 2003). En la diafiltración la ecuación de rendimiento es:

$$Y = \exp \left[\left(\frac{V_D}{V_0} \right) (\sigma - 1) \right] \quad (2)$$

Donde V_D es el volumen del solvente de diafiltración (solución de lavado) añadido, σ es el coeficiente de retención o de rechazo que varía entre 0 a 1. V_0 es el volumen inicial de lisado clarificado.

La permeabilidad de la membrana generalmente se describe en términos del coeficiente de retención o rechazo: (Tejeda *et al.*, 1995; Schwartz L., 2003):

$$\sigma = 1 - \frac{C_F}{C_R} \quad (3)$$

Donde C_F es la concentración del filtrado y C_R la concentración de la solución retenida. $\sigma = 1$, indica 0% de permeabilidad, mientras que $\sigma = 0$, indica 100% de permeabilidad.

Las expresiones para el coeficiente de retención pueden dar diferentes valores en función del tiempo. Las concentraciones en la alimentación son a menudo variables y las concentraciones en el permeado pueden cambiar a la vez que las concentraciones de alimentación. La diafiltración ha demostrado ser uno de los métodos más efectivos para controlar el ensuciamiento de las membranas de fibra hueca (Harrison, 1994).

2.5.3 Impacto Ambiental de Técnicas utilizadas para la Recuperación Intermedia del Plásmido

Un estudio ambiental de los diferentes procesos de recuperación intermedia para la pre-purificación del plásmido determinó el impacto ambiental de las sustancias utilizadas en cada técnica: agentes de separación, PEG 600, isopropanol, arsénico, hidróxido de sodio y Tris HCL. (Freitas, 2009)

Las sustancias con mayor impacto ambiental fueron los agentes de separación, isopropanol y arsénico. En el caso del isopropanol, se debe a que su producción es a partir de aceite o gas natural por lo que los riesgos térmicos no pueden ser descartados, el olor es muy fuerte y requiere una demanda alta de oxígeno. Además, el PEG 600 proviene de una síntesis compleja (3 a 10 etapas) y requiere de recursos y materiales no renovables (El PEG se produce en la industria petroquímica vía cracking).

Por el otro lado, el proceso de ultrafiltración con flujo tangencial, no presenta prácticamente ningún impacto ambiental. El impacto del hidróxido de sodio utilizado para la limpieza del equipo es mínimo. La Figura 7 presenta la cantidad de agua y agentes químicos requeridos para un lisado alcalino de 100 procesos batch de 1m^3 por año utilizando diferentes técnicas de recuperación intermedia de plásmido. La Figura 8 muestra el costo de operación y de equipo requerido para un lisado de 100 procesos batch de 1m^3 . Los costos relativos fueron determinados en base a \$276 00 en operación y \$723 000 en equipo (Freitas, 2009).

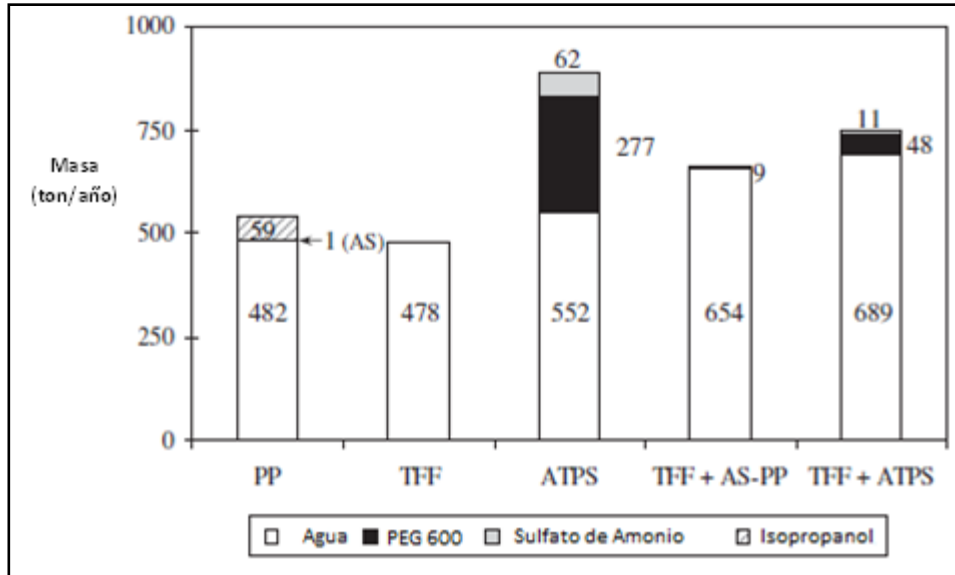


Figura 7. Cantidad de agua y agentes requeridos para un lisado alcalino de 100 lotes de 1m³ por año utilizando diferentes alternativas en la recuperación intermedia de plásmido (Adaptado de Freitas S., 2009).

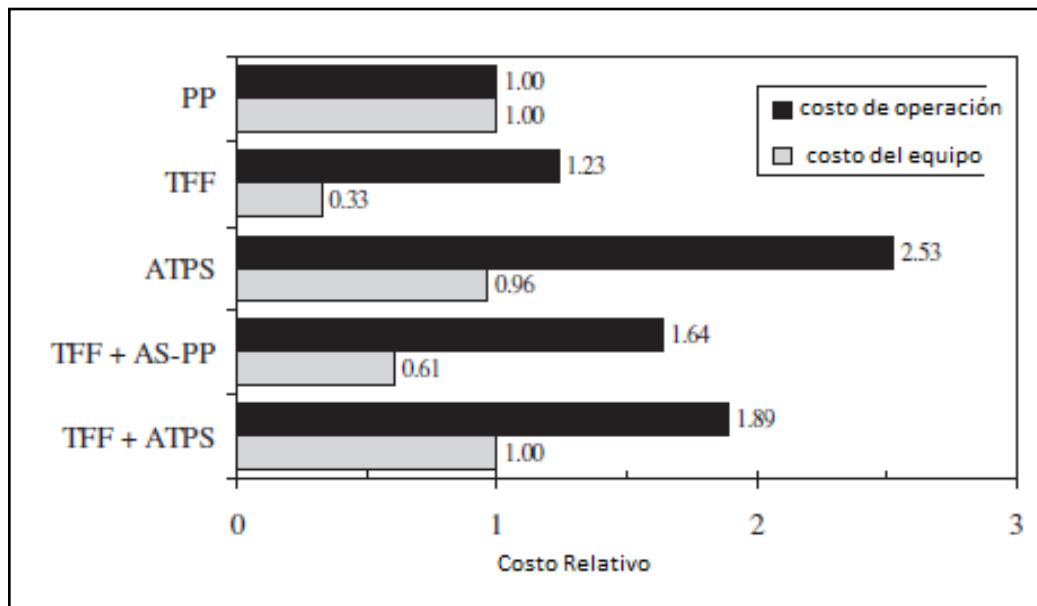


Figura 8. Costo de operación y de equipo requerido para un lisado de 100 lotes de 1 m³ en la etapa de recuperación intermedia. Los costos relativos fueron determinados en base a \$276 000 en operación y \$723 000 en equipo (Adaptado de Freitas S., 2009).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

En los estudios de ultrafiltración con flujo tangencial (TFF) se utilizó como macromolécula modelo el plásmido pVAX1 con el gen insertado LipL-32. Es una molécula con peso molecular aproximadamente de 4000 pares de base. En la producción de plásmidos se utilizaron cepas de *Escherichia Coli* (*E.Coli*) con el plásmido pVAX1- LipL32 hospedado.

En la fermentación en matraz se utilizó el medio de cultivo Luria Bertani (LB) y kanamicina para prevenir el crecimiento de otra cepa y dar resistencia a las células. En la producción en bioreactor se utilizó el medio de cultivo Terrific Broth (TB).

Para la Recuperación Primaria se prepararon las siguientes soluciones: 50 mM glucosa, Tris-HCl 25 mM (Hidroximetil Amino Metano, P.M.=121.14), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 10 mM (PM 292.25), llamada Solución P1 o solución de resuspensión; NaOH 0.2M, SDS 1% (m/v), llamada Solución P2 o solución de lisis; Acetato de Potasio 3M en ácido acético glacial y agua desionizada, llamada Solución P3 o solución de neutralización. Estas soluciones fueron pasadas a través de un microfiltro, Milliporede 0.45 μm .

En la recuperación intermedia se utilizaron membranas de fibra hueca de polisulfona con tamaño de corte de 100, 300 y 500 kDa. Este tipo de módulo está formado por 2 tubos de membrana de diámetro 1 mm dentro de un cartucho. El Buffer de lavado que se utilizó en todos los experimentos fue 10mM Tris y 1.0 mM EDTA (PM 292.25) a pH = 8.0 (Buffer TE). Para realizar la limpieza de las membranas después de cada experimento se utilizó cloro, hidróxido de sodio 0.1N y etanol al 30%. Las membranas se acondicionaron de acuerdo con el protocolo del fabricante. (Ver Anexo B). En los estudios electroforéticos se utilizó agarosa 0.8% en buffer TE 1X, el marcador Supercoiled DNA Ladder, Invitrogen. La solución para teñir el gel fue bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g/L}$).

3.2. Equipo

En los cultivos en matraz se utilizó una incubadora, Orbital Shaker Incubator, VWR (Figura 9). En la propagación de la cepa *E. coli* con el plásmido pVAX1 LipL-32 se manejó el Bioreactor Applikon eZ-Control de 3 L ubicado en el Laboratorio de Bioprocesos del DICTUS de la Universidad de Sonora. Las variables del sistema fueron controladas en el software BioXpert Lite (Figura 10). Para el control del crecimiento celular se midió la absorbancia del cultivo a una longitud de una de 600 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer.

En la etapa de recuperación primaria se utilizó una centrifuga Allegra X-22, Beckman Coulter (Figura 11), ubicada en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia de la Universidad de Sonora. En la clarificación se pasó a vacío por un filtro Millipore de 0.45 μm .

El equipo usado para llevar a cabo la etapa de pre-purificación del ADN plasmídico consistió en un sistema de ultrafiltración con flujo tangencial MidJet Benchtop System, GE Healthcare acoplado a un equipo BioRad Biological LP Chromatography con monitor de computadora para medir absorbancia y conductividad durante el experimento (Figura 12). El software donde se registraron los datos fue LPData View acoplado al equipo Biologic Bio-Rad. El sistema de ultrafiltración (MidJet Benchtop System) está conformado por una bomba peristáltica (24V DC), tuberías de silicona de diámetro interno de 1.6 mm, tanques de depósito de poliestireno de 30 y 100 mL y cartuchos que contienen dos membranas de fibra hueca de polisulfona (1 mm de diámetro interno, 30 cm de longitud con un área total de filtración de 16 cm^2). La longitud de las tuberías se redujo lo más posible y la calibración del flujo volumétrico de alimentación se verificó antes de todos los experimentos.

En los estudios de electroforesis se utilizó una cámara horizontal de electroforesis GT mini gel casting system de Biorad (Figura 13) y para la fotografía del gel de agarosa se utilizó el equipo Multi –Doc, Digital Imaging System, Trans UV de BioRad.

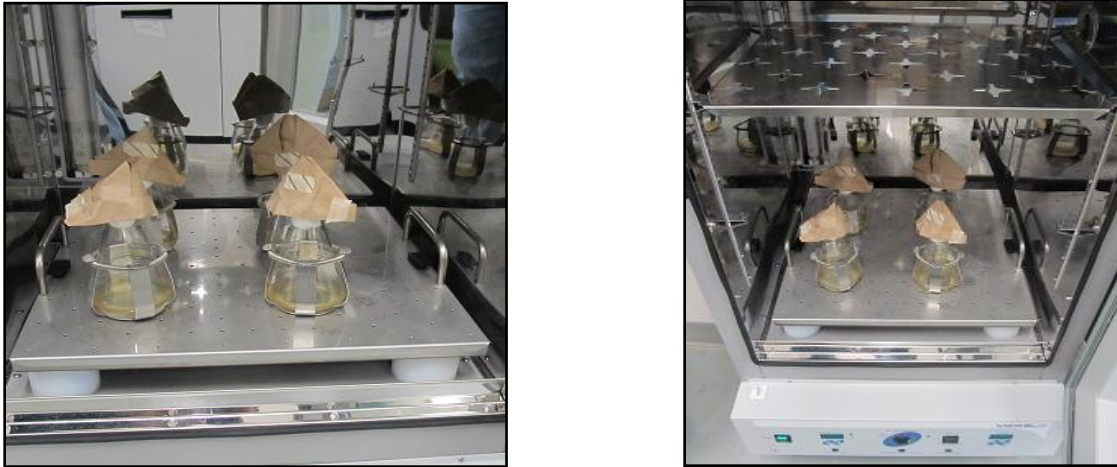


Figura 9. Incubadora, Orbital Shaker Incubator, VWR.

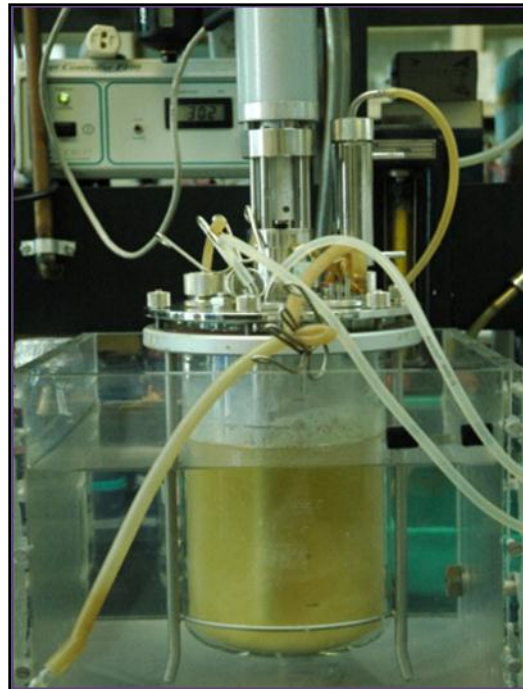


Figura 10. Biorreactor eZ-Control de 3 L ubicado en el Laboratorio de Bioprocesos en el DICTUS, acoplado al software BioXpert Lite.



Figura 11.Centrífuga Allegra X-22, Beckman Coulter.



Figura 12. Sistema de ultrafiltración con flujo tangencial MidJet Benchtop System, GE.

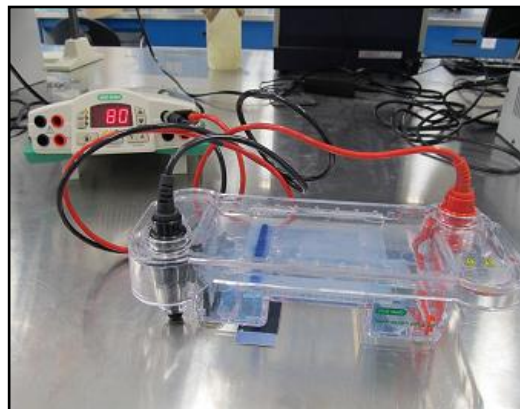


Figura 13. Cámara horizontal de electroforesis y Equipo Multi –Doc, Digital Imaging System, Trans UV de BioRad para fotografía.

3.3 Metodología

Durante la investigación se trabajó con cultivos por lotes en matraz y bioreactor de cepas bacterianas que contenían el plásmido de interés pVAX1-LipL32. En la Figura 14, se presentan las etapas utilizadas en el proceso de producción y pre-purificación de plásmidos a partir de la cepa hospedera.

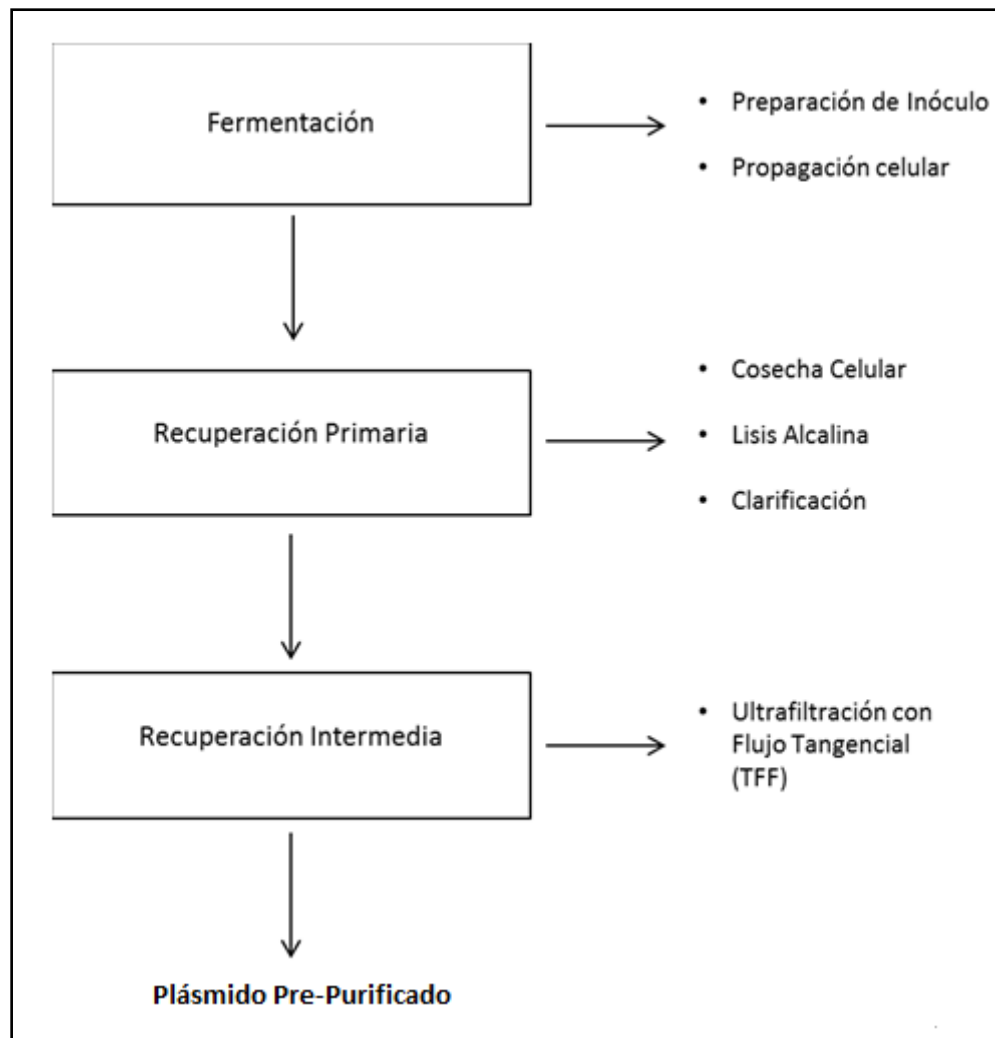


Figura 14. Diagrama del proceso de pre-purificación de plásmidos a partir de la cepa hospedera.

3.3.1 Fermentación

La producción de plásmido para esta investigación se realizó utilizando la cepa *E. coli* DH5 α con el plásmido pVAX1- LipL32. Se utilizó el medio Luria Britania (LB) y Terrific Broth (TB) en la fermentación en matraz y en biorreactor respectivamente. En ambos se utilizó kanamicina para dar resistencia a las células.

Crecimiento de inóculo en matraz. Se realizaron fermentaciones en matraz a una temperatura de 37°C y a 250 rpm durante 12 horas. El inóculo se preparó con 30 mL de medio de cultivo LB de concentración 20 g/L en matraces de 100 mL. Al medio estéril se añadieron 30 μ L de una solución de kanamicina de 30 mg/mL de concentración, previamente filtrada. El medio fue inoculado utilizando un tubo eppendor con 100 μ L (80 μ L de cultivo + 20 μ L de glicerol, congelado a -80°C) de *E. coli* DH5 α conteniendo pVAX1-LipL32. El cultivo se realizó en la incubadora a temperatura de 37 °C y agitación de 250 rpm, de 8 a 10 h, hasta alcanzar una densidad óptica, de aproximadamente 1.2 ($DO_{600} \approx 1.2$), a 600 nm.

Propagación celular en matraz. La obtención de la biomasa se realizó mediante cultivos en matraces de 2 L con 220 mL de medio LB estéril (20 g/L). Se añadió los 30 mL de inóculo y 250 μ L de kanamicina de 30 mg/mL, previamente filtrada. El cultivo se desarrolló en una incubadora a 37 °C y 250 rpm, por un período de 12 a 14 h, hasta alcanzar una $DO_{600} \approx 3.8$.

Para los cultivos en biorreactor, se siguió el protocolo de instalación y conexión del Biorreactor eZ-Control ubicado en el Laboratorio de Bioprocesos del DICTUS. La preparación del medio TB enriquecido se realizó en un volumen de 2000 mL, se agregaron 27.6 g de Triptona, 55.2 g de extracto de levadura y 70 mL de Glicerol. La solución salina con 5.313 g /21.9 mL de KH PO₄ a 25-35° C y 28.842 g /16.4 mL de K₂HPO₄ a 60 °C.

Propagación celular en bioreactor. Se preparó un inóculo con 150 mL de medio TB enriquecido, inoculado con 3 mL de cultivo de células de *E.coli* hospedando el plásmido pVAX1-LipL32 en glicerol y el volumen correspondiente de kanamicina. De acuerdo a Carnes (2006), el inóculo se incuba en el fermentador hasta que haya alcanzado entre 0.3 y 1.0 unidades de absorbancia a 600 nm, a 37°C y 250 rpm. El volumen de inóculo utilizado puede estar entre el 5 y el 10% del volumen de trabajo.

Para realizar la propagación celular en el bioreactor, se utilizaron las condiciones descritas en la Tabla 3. Se inyectaron 5 mL de medio con 1.85 mL de kanamicina y 5 mL de medio con 200 μ L de antiespumante. Se alimentó la solución de sales (K_2HPO_4 y KH_2PO_4) del frasco conectado al bioreactor. Finalmente se alimentó el inóculo por la manguera hacia el fermentador. Se tomaron muestras durante el tiempo de cultivo para medir la absorbancia y determinar la curva de crecimiento.

Tabla 3. Condiciones del bioreactor controladas durante el crecimiento de cultivo *E.coli* pVAX1-LipL32.

Condiciones de Operación	
Presión de entrada de O ₂ :	17 psi
Presión de entrada de aire:	4 psi
Flujo de aire:	2 L/min
Flujo de O ₂ :	0.2 L/min
v v m:	1 vol de aire/(1 vol de medio de cultivo x min)
Temperatura:	37 °C
pH.	7
rpm:	400 - 1000
DO %	28-100

Para tener una descripción del crecimiento celular se tomaron muestras cada 60 minutos y se midió la absorbancia del cultivo en un espectrofotómetro a 600nm. Se detuvo la fermentación hasta que se alcanzó la fase estacionaria. Las variables del sistema fueron controladas en el software BioXpert Lite.

3.3.2 Recuperación Primaria

El proceso de producción continúa con la recuperación de las células del caldo obtenido después de la etapa de fermentación.

Al finalizar el cultivo, las células fueron cosechadas por medio de centrifugación a 3500g, 4°C por 20 minutos. Se recolectó el sólido y se desechó el sobrenadante. Se determinó el peso de las células húmedas.

A la biomasa se le agregaron 8 mL de la solución P1 por gramo de células húmedas y se agitó hasta resuspender el paquete celular. Luego se agregó un volumen igual de la solución P2 para realizar la lisis celular y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se neutralizó agregando un volumen igual de la solución P3 a 4°C, se agitó suavemente y se incubó por 10 minutos en hielo.

El lisado conteniendo el plásmido se clarificó mediante la remoción del precipitado formado durante la etapa de lisis (restos celulares, ADN genómico y proteínas) por centrifugación a 12000 g por 30 min a 4°C en dos pasos. (Se separó el sobrenadante y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones). El lisado clarificado se filtró a vacío con un filtro de 0.45 μm para asegurar la remoción completa de partículas suspendidas.

3.3.4 Recuperación Intermedia

La recuperación intermedia del plásmido se realizó en un sistema de ultrafiltración con flujo tangencial (MidJet Benchtop System, GE Healthcare) utilizando membranas de fibra hueca de polisulfona de diferente tamaño de corte.

Para determinar la membrana con la cual se obtiene una mejor recuperación de plásmido y remoción de impureza, se realizaron tres experimentos en modo de diafiltración continua partiendo de una solución de lisado clarificado. Se establecieron las condiciones de operación del sistema a un flujo de alimentación de 50 mL/min y un diferencial de presión (ΔP) de 0.75 psig durante los tres experimentos. Se estudiaron tres membranas de fibra hueca de polisulfona con tamaño de corte: 100, 300 y 500 kDa. Se tomaron muestras de la solución filtrada y retenida durante el experimento para ser analizadas y determinar la recuperación del plásmido, así como la remoción de sales y proteínas. Las membranas fueron acondicionadas de acuerdo al procedimiento establecido por el fabricante (Anexo B).

Antes de empezar el experimento se introdujo al sistema la solución buffer TE por 10 minutos para lograr humedecer y homogenizar todas las áreas del sistema.

La recuperación de los plásmidos se inició introduciendo una solución de lisado clarificado a la membrana con el flujo establecido. Al tanque de alimentación se agregó constantemente una solución de buffer Tris 10 mM/EDTA 1 mM/HCl, pH 8.0 (buffer TE) con el mismo flujo de filtrado. Se ajustó la válvula de retención hasta igualar los flujos de lavado, filtrado y retroalimentación. Se consideró el diferencial de presión constante durante los tres experimentos debido a la falta de un transductor de presión en las corrientes de entrada y salida de la membrana. El valor del diferencial de presión a lo largo de la membrana y el flujo de alimentación se tomaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante de la membrana (Anexo B).

Las variables medidas durante los tres experimentos fueron la absorbancia y conductividad del filtrado y retenido a lo largo del tiempo de proceso. Se midieron en el equipo Biologic Bio-Rad y los datos fueron registrados y graficados en el programa LPData View durante cada experimento. Se llevó control del número de volúmenes de lavado con buffer TE hasta que la solución de filtrado igualara la conductividad del buffer ($< 1\text{mS}$). Se tomaron muestras de filtrado y retenido cada 10 minutos para su análisis. Se midió la absorbancia de ácidos nucleicos a 260 nm y de proteínas a 280 nm, así como la conductividad en milisiemens (mS). En la Figura 15 se muestra un diagrama de la metodología utilizada en la etapa de recuperación intermedia.

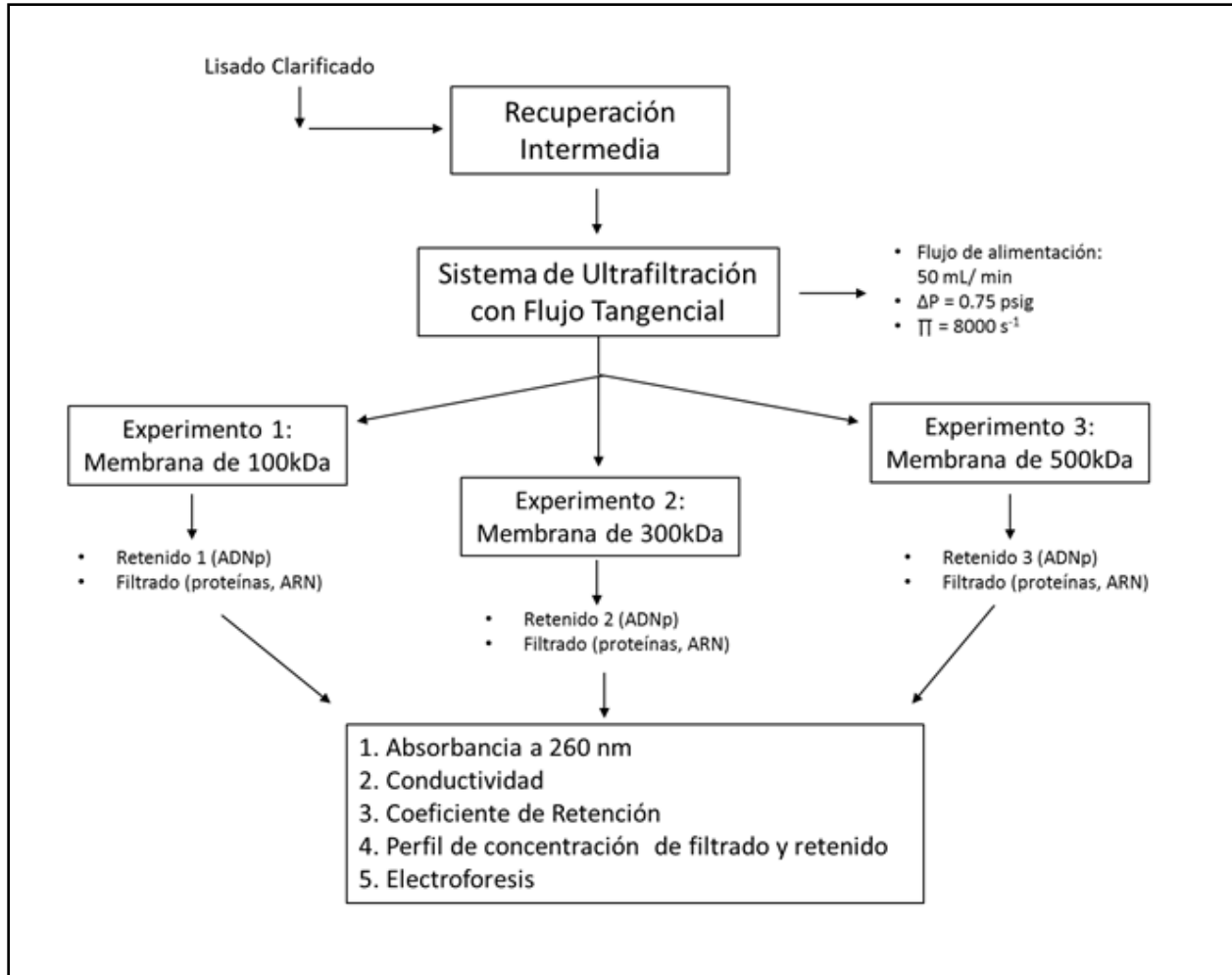


Figura 15. Diagrama de la metodología utilizada en la etapa de recuperación intermedia.

3.3.5 Descripción del modelo de un Sistema de Ultrafiltración con Flujo Tangencial

Un esquema del sistema de TFF se muestra en la Figura 16. La presión ejercida sobre el fluido permite que una porción del fluido pase a través de la membrana. El resultado es un gradiente de concentración de la solución inicial desde el centro del cartucho hacia las paredes de la membrana.

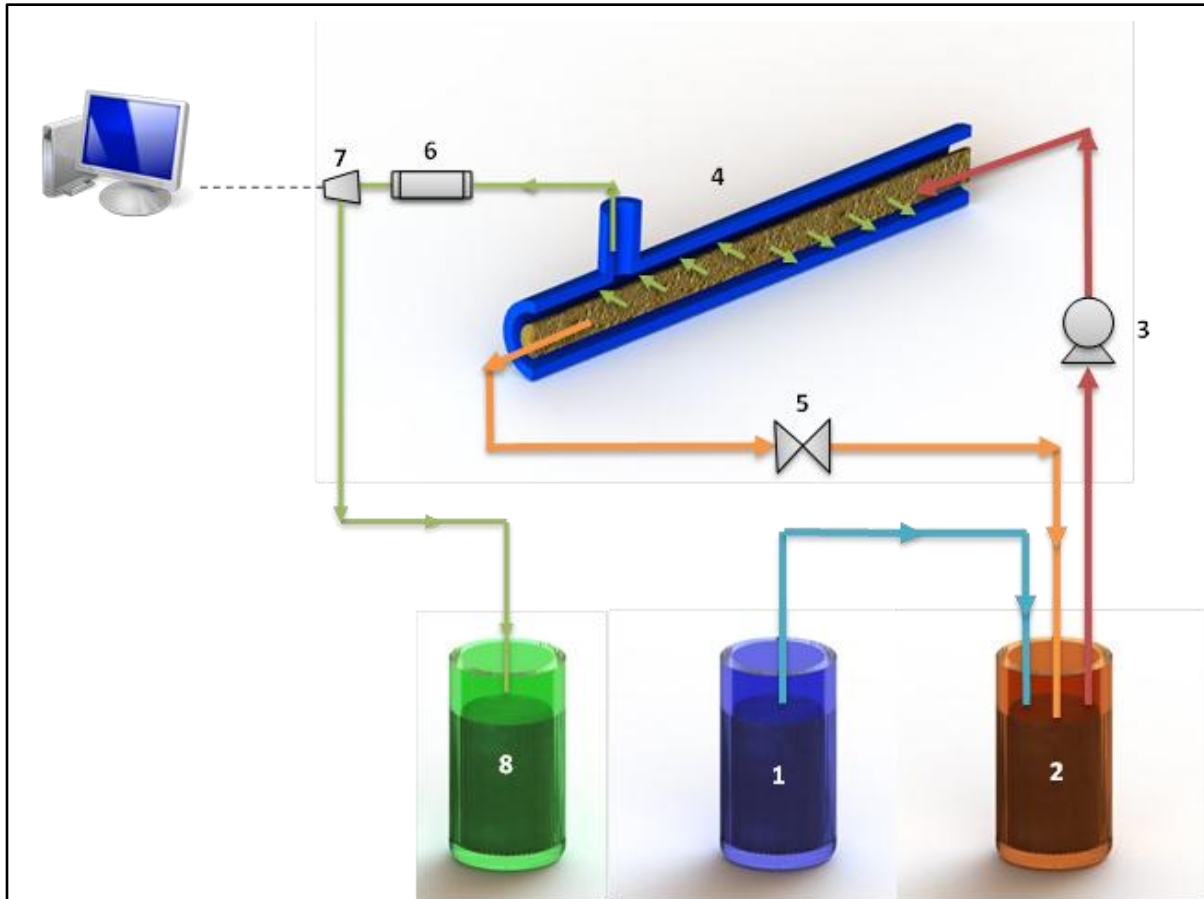


Figura 16. Diagrama simplificado del sistema de ultrafiltración con flujo tangencial. 1: solución de lavado; 2: tanque de alimentación; 3: bomba peristáltica; 4: membrana de fibra hueca; 5: válvula de retención; 6: celda de UV; 7: conductímetro; 8: tanque de filtrado; Lisado Clarificado \rightarrow (rojo), Retenido \rightarrow (naranja), Filtrado \rightarrow (verde), Buffer \rightarrow (azul), lectura en PC $\cdots\cdots\cdots$

Para describir el comportamiento del sistema de ultrafiltración con lavado continuo se realizó un balance de masa basado en la absorbancia de la solución en el tanque de alimentación (Figura 17). El tanque conteniendo el lisado clarificado, con concentración C_0 de soluto y un volumen V , se alimenta a la membrana de ultrafiltración con un flujo F_A y concentración $C_A(t)$. A éste tanque entra el volumen de recirculación y se adiciona continuamente el volumen de lavado, V_D de Buffer TE, manteniendo el volumen del tanque constante, de concentración $C_A(t)$, formando la solución de retenido. Se elimina a través de los poros de la membrana el flujo de filtrado F de concentración $C_F(t)$. El volumen de filtrado $V_F(t)$ es reemplazado por un volumen V_D de buffer TE.

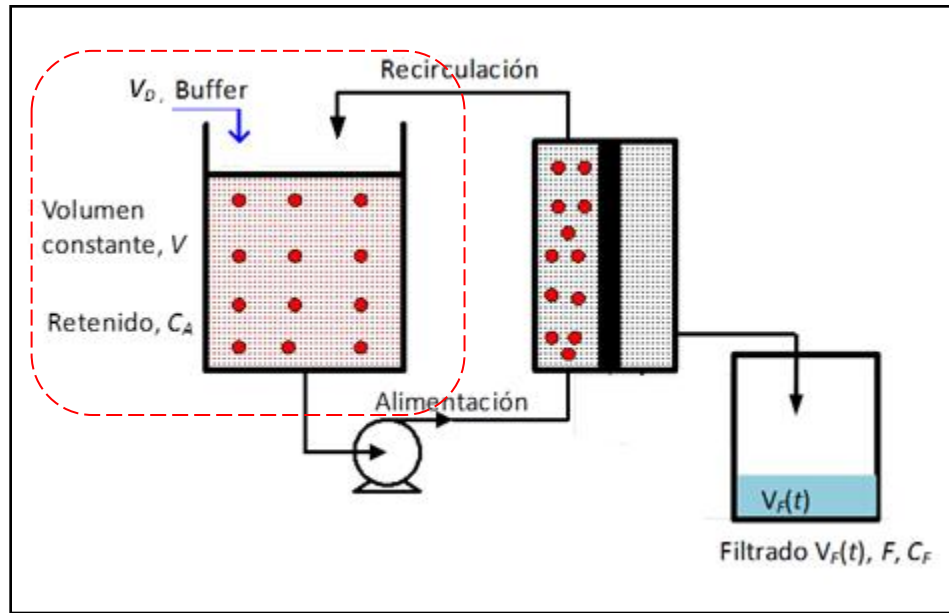


Figura 17. Sistema físico de ultrafiltración con flujo tangencial.

El balance de masa se desarrolla considerando lo siguiente:

- El tanque de alimentación está bien mezclado
- El volumen de fluido en la membrana es despreciable
- Las densidades de cada corriente son iguales

$$V \frac{dC_A}{dt} = -F(C_F) \quad (4)$$

El volumen de filtrado $V_F(t)$ es reemplazado por el volumen de lavado, $V_D(t)$ en el tanque de alimentación por lo que la Ecuación (4) puede expresarse como:

$$V \frac{dC_A}{dt} = -\frac{dV_D}{dt}(C_F) \quad (5)$$

El coeficiente de retención, Ec. (3) definido en este sistema, se puede expresar como:

$$\sigma = 1 - \frac{C_F}{C_A} \quad (6)$$

Reemplazando C_F obtenido de la Ec. (6) en Ec. (5) :

$$V \frac{dC_A}{dt} = -\frac{dV_D}{dt} [C_A (1-\sigma)] \quad (7)$$

Considerando que el coeficiente de retención, σ varía durante el tiempo de operación, éste puede expresarse en términos de volumen de lavado V_D , siguiendo el modelo:

$$\sigma = \frac{\sigma_{\max} * V_D}{k + V_D} \quad (8)$$

Donde σ_{\max} es el coeficiente de retención máximo de un sistema y k es el valor de V_D cuando $\sigma = \frac{1}{2} \sigma_{\max}$.

Reemplazando la Ec. (8) en (7) e integrando de acuerdo con las condiciones iniciales de operación: $V_D = 0$ y $C_A = C_{A0}$

$$\frac{C_A}{C_{A0}} = \exp \left[\frac{1}{V} (\sigma_{\max} - 1) - \frac{\sigma_{\max} * k}{V} \ln \left(\frac{k + V_D}{k} \right) \right] \quad (9)$$

Las Ecuaciones (6, 8 y 9) representan el modelo para describir el comportamiento del sistema de ultrafiltración con flujo tangencial utilizado en la investigación. Este modelo se va a comparar con los datos experimentales, por medio del cálculo del coeficiente de correlación.

Los parámetros σ_{\max} y k se obtienen por regresión no lineal, en Matlab, para el modelo del coeficiente de retención, Ec. (8) y se ajustan con a la condición que $\sigma_{\max} \leq 1$. Además dado que se utilizan en el cálculo de la absorbancia de filtrado y retenido, C_A y C_F , Ecs. (6) y (9), respectivamente, se calcula para los tres casos el coeficiente de correlación, R^2 (Motulsky y Christopoulos, 2004), para obtener el mejor ajuste:

$$R^2 = 1.0 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{cal})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (10)$$

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.

3.3.5 Control de la Calidad del ADN Plasmídico

Después de la operación de lisis y de la etapa de recuperación intermedia, se realizaron estudios de electroforesis en gel de agarosa para evaluar el estado del plásmido. Se preparó gel de agarosa al 0.8% en buffer Tris 40 mM-Ácido acético 20 mM-EDTA 1mM, pH 8 (buffer TAE 1X) y se colocó en la cámara de electroforesis. Después se vertió el buffer TAE en la cámara hasta el nivel indicado. Se inyectaron las muestras de interés en el gel inmerso en buffer y se dejó correr a 80 volts por 60 minutos aproximadamente. Se utilizó como marcador 0.8 μ L de Supercoiled Ladder DNA y 9 μ L de cada muestra. Todas las muestras fueron mezcladas con 1 μ L de buffer de carga. Se tiñó el gel en una solución de 0.5 μ g/mL de bromuro de etidio, agitándolo a 65 rpm durante 40 minutos. Finalmente, el gel de agarosa se lavó con agua desionizada y se utilizó el equipo MultiDoc-It, Digital System para tomar la fotografía de los geles.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Fermentación

Para la propagación celular en fermentador, se utilizó un inóculo en el medio TB en matraz, el cual alcanzó una absorbancia de 1.71 AU en 7 horas. El crecimiento celular se monitoreó cada hora tomando muestra del cultivo y midiendo su densidad óptica.

La curva de crecimiento de *E. coli* hospedando el plásmido pVAX1-LipL32 se presenta en la Figura 18. El crecimiento exponencial tuvo una duración aproximada de 8 h. La curva continua de la Figura representa el modelo del crecimiento utilizando la ecuación logística (Ec. 1) con una velocidad de crecimiento (μ) de 1.05 h^{-1} . Este valor es típico para cultivos *E. coli* hospedando el plásmido pVAX1 LipL-32 y concuerda con lo descrito en otros trabajos (Sandoval, 2008; Munguía, 2011).

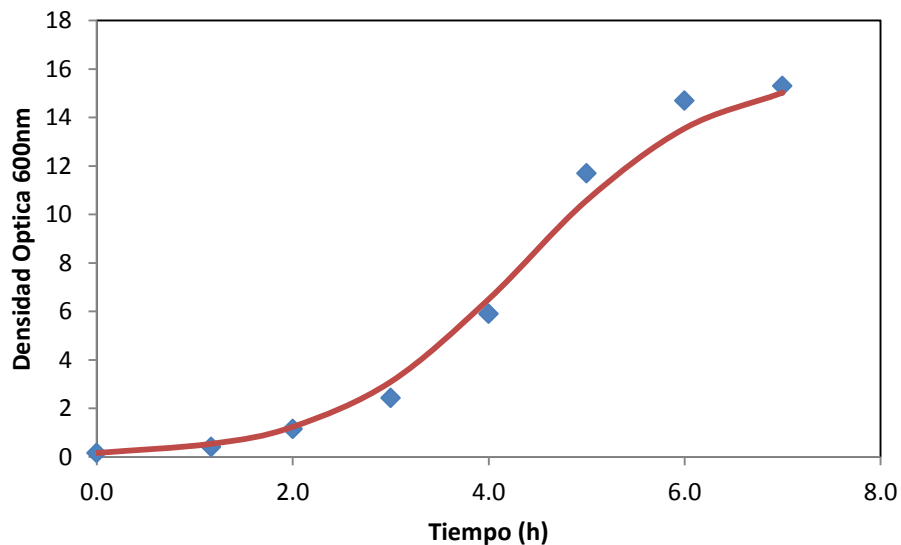


Figura 18. Curva de crecimiento batch de cultivo *E. coli* pVAX LipL-32.

◆ Datos experimentales — Modelo Logístico

4.2 Recuperación Primaria

La biomasa que se obtuvo en la cosecha celular fue en promedio 8.0.g de células húmedas/Litro de cultivo. Se desechó el sobrenadante, para luego llevar a cabo la lisis alcalina y clarificación de la solución. (Figura 19)

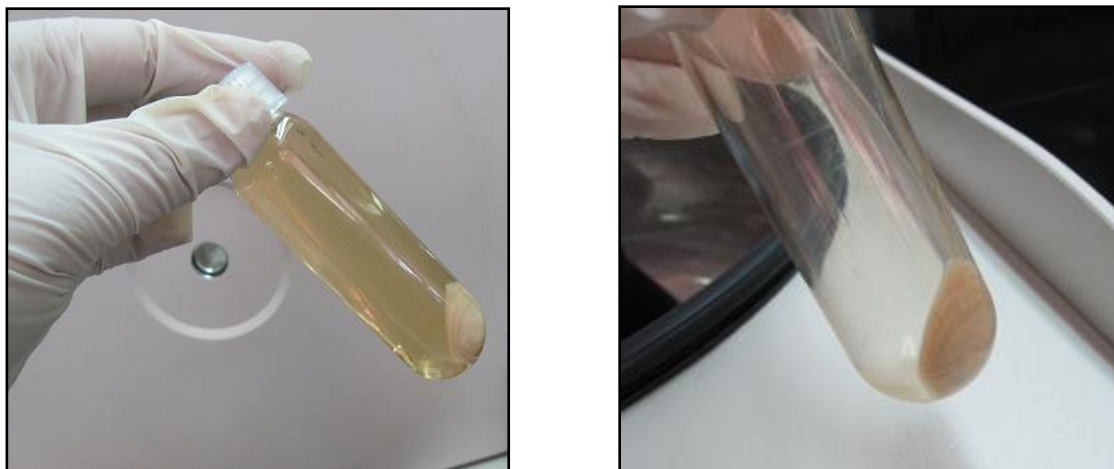


Figura 19. Biomasa obtenida en la etapa de cosecha celular.

Se obtuvieron en promedio 85 mL de lisado/Litro de cultivo. Se realizó un estudio electroforético para verificar la calidad del plásmido en el lisado (Figura 20). Se puede observar en las líneas 4 – 8 las muestras de lisados, donde se aprecia la banda del ADN plasmídico y una gran cantidad de ARN, lo que hace evidente la cantidad de contaminante que se debe eliminar.

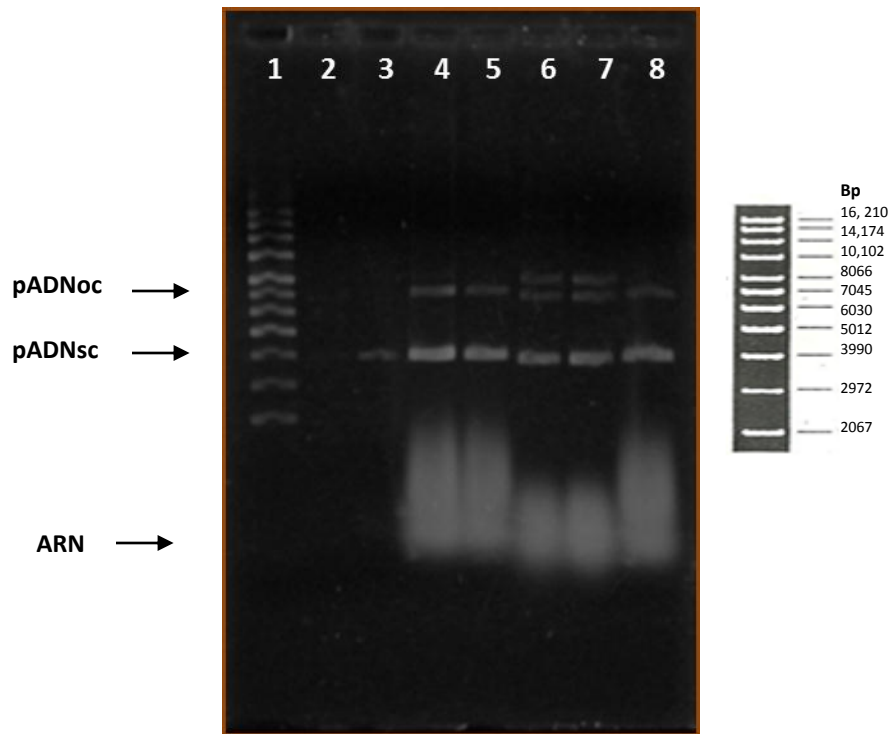


Figura 20. Gel de electroforesis de muestras de lisado. Línea 1 marcador de peso molecular (supercoiled DNA ladder); línea 3 pVAX1 purificado con kit químico; 4-8 lisados con pVAX1-LipL32 (pADN oc: ADNp circular abierto; pADN sc: ADNp super enrollado).

4.3 Recuperación Intermedia

Para determinar la membrana con mejor recuperación de plásmido y remoción de impurezas, se realizaron tres experimentos con lavado continuo utilizando el mismo volumen de lisado. Se utilizaron membranas de fibra hueca con un tamaño de corte de 100, 300 y 500 kDa. Las condiciones de operación durante los tres experimentos fueron: flujo de alimentación de 50 mL/min, que de acuerdo a las especificaciones del fabricante de la membrana corresponde a un diferencial de presión (ΔP) de 0.75 psig y esfuerzo de corte 8000 s^{-1} . El volumen del tanque de alimentación se mantuvo constante a lo largo del experimento, debido a que el volumen de filtrado, era reemplazado por un volumen igual de solución de lavado (buffer).

Una parte básica del trabajo realizado consistió en investigar el comportamiento de membranas porosas de fibra hueca con flujo de alimentación tangencial. Para tal efecto se obtuvieron

gráficas de absorbancia de la solución de filtrada y retenida por la membrana medida a 260 nm a lo largo del tiempo y se compararon con el modelo matemático obtenido a partir del balance de masa, Ecuación (8).

Experimento 1: Ultrafiltración Tangencial con una Membrana de 100 kDa

La ultrafiltración se realizó a partir de un volumen de lisado clarificado de 100 mL con 2.3 Unidades de Absorbancia (AU) y conductividad de 18.8 miliSiemens (mS).

El flujo de filtrado fue de 1.28 mL/min y se utilizaron 226 mL de buffer TE, que equivalen a 3 volúmenes de lavado, para desalinizar la solución. Se obtuvo una absorbancia y conductividad final en la solución filtrada de 0.164 AU y 1.78 mS en un tiempo aproximado de 130 minutos. La Figura 21 muestra el perfil de absorbancia y conductividad del filtrado durante el tiempo de proceso utilizando una membrana con tamaño de corte de 100 kDa.

En la solución retenida por la membrana se obtuvo una absorbancia de 1.826 AU y conductividad de 1.56 mS. La disminución en la absorbancia indica que una cantidad de contaminantes (proteínas, ácidos nucleicos) de peso molecular menor a 100 kDa y fueron removidos hacia el filtrado. La disminución en la conductividad muestra la desalinización del lisado durante la ultrafiltración.

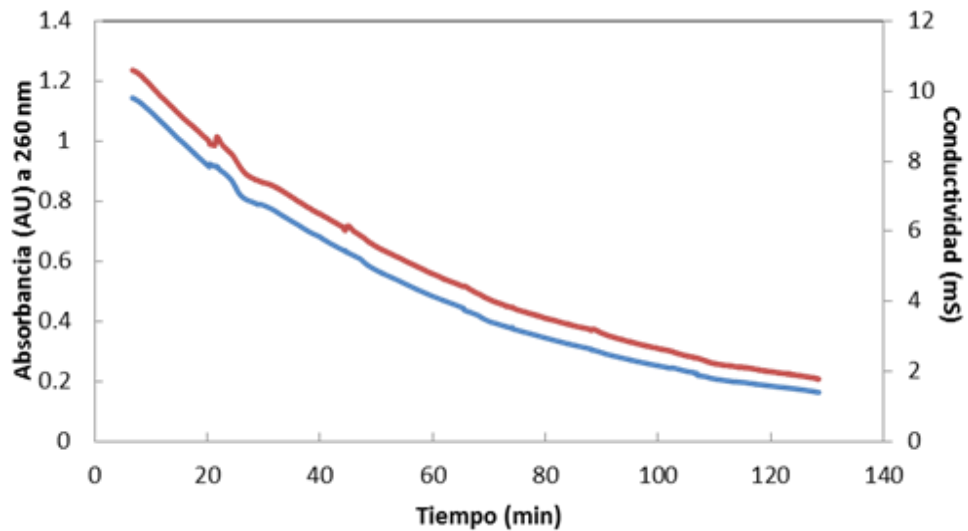


Figura 21. Perfil de absorbancia y conductividad del filtrado utilizando una membrana con tamaño de corte 100 kDa, flujo 50 mL/min y ΔP de 1.5 psig. — Absorbancia, — Conductividad.

Para verificar la calidad del plásmido se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Figura 22). Se puede observar en esta Figura la disminución de los contaminantes en el retenido con el tiempo de filtrado (líneas 4, 6, 8, 10, 12, 14) y también que el ARN de tamaño pequeño se encuentra en el filtrado (líneas 3, 5, 7, 9, 11, 13). Además, se observa que no hubo pérdidas de plásmido a través de los poros de la membrana, sin embargo la solución final de retenido aun presenta moléculas de ARN de mayor peso molecular.

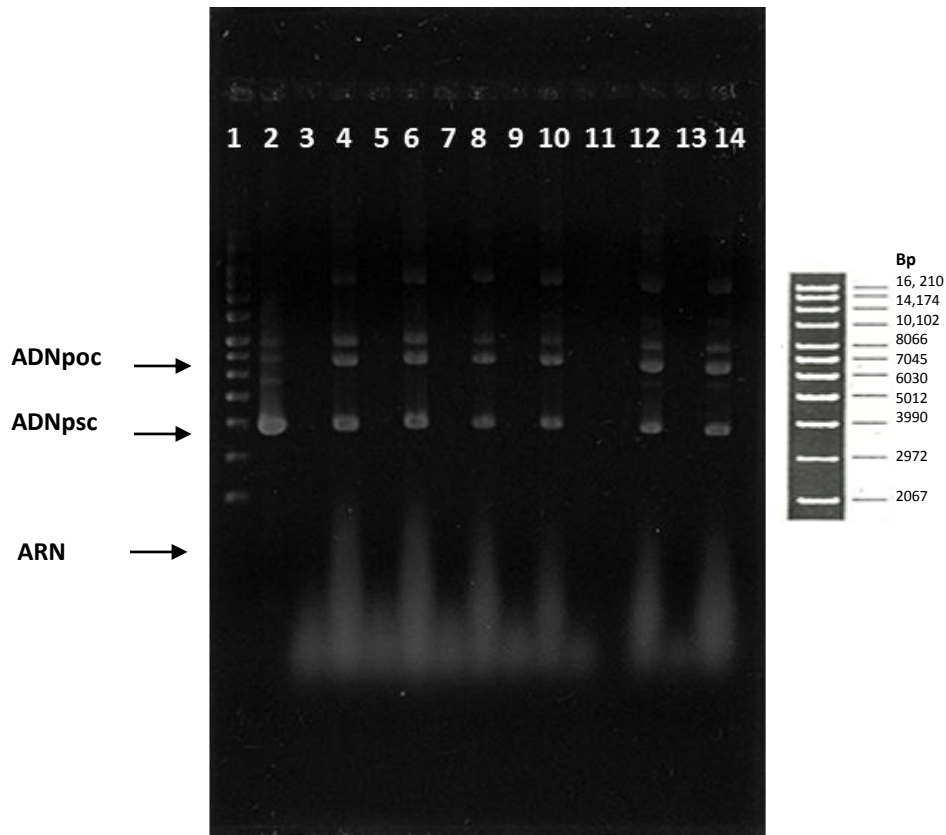


Figura 22. Gel de electroforesis de muestras de filtrado y retenido utilizando una membrana de 100 kDa en un sistema de ultrafiltración tangencial. Línea 1 marcador de peso molecular (supercoiled ADN ladder); línea 2 pVAX1 purificado con kit comercial; línea 3,5,7,9,11,13 solución de filtrado; línea 4,6,8,10,12,14 solución de retenido. (ADNp oc: plásmido circular abierto; ADNp sc: plásmido superenrollado).

La membrana de 100 kDa logró remover el 33 % de contaminantes considerando la absorbancia al inicio y al final del proceso. También se logró desalinizar el lisado como se comprueba con la conductividad final alcanzada. Después de 120 minutos de proceso se mantiene constante la

absorbancia y conductividad del filtrado, lo cual indica que la membrana ya filtró las moléculas de tamaño menor a su tamaño de poro.

Experimento 2: Ultrafiltración Tangencial con una Membrana de 300 kDa

El volumen inicial de lisado clarificado fue de 100 mL con un absorbancia de 2.075 AU y conductividad de 45.1 mS. La absorbancia de la solución retenida se disminuyó hasta un valor de 0.644 AU y una conductividad de 1.6 mS. La disminución en la absorbancia indica que una cantidad de contaminantes de peso molecular menor a 300 kDa y proteínas fueron removidos hacia el filtrado. La disminución en la conductividad muestra la desalinización del lisado durante la filtración. Se utilizaron 287 mL de solución de lavado para alcanzar dicha absorbancia en 290 minutos, lo cual equivale a 2.8 volúmenes de lavado. En la Figura 23 se muestra la variación de la absorbancia y conductividad en el filtrado, durante el tiempo de experimento.

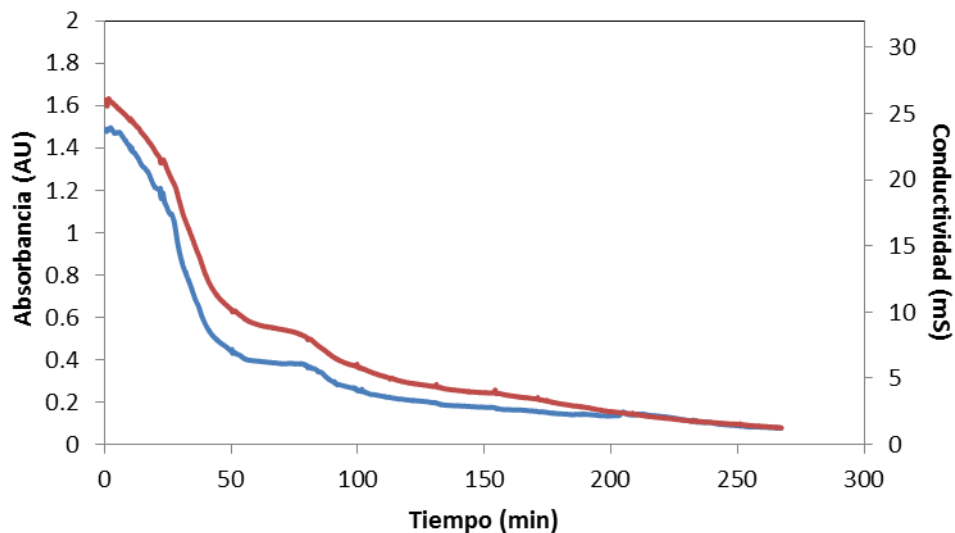


Figura 23. Perfil de absorbancia y conductividad del filtrado utilizando una membrana con tamaño de corte de 300 KDa, flujo 50 mL/min y ΔP de 1.5 psig. — Absorbancia, — Conductividad.

Se calculó el coeficiente de retención experimental a partir de la Ecuación (6), con los datos medidos de absorbancia de retenido y de filtrado, tomados a cada intervalo de tiempo. Para relacionar cada medición con el volumen de lavado, V_D , se calculó el volumen de filtrado V_F , que es igual a V_D , utilizando el flujo de filtrado promedio.

Se calcularon los parámetros σ_{max} y k de la Ecuación (8), con los datos experimentales, realizando una regresión no lineal en el programa Matlab. El resultado de esta regresión produjo un valor de σ_{max} mayor a uno, sin embargo considerando que éste debe de ser menor o igual a 1, se hizo un ajuste con los valores obtenidos de σ_{max} y k hasta lograr la mejor correlación. Estos valores a la vez deben de ofrecer una buena correlación en el cálculo de C_A/C_{A0} (Ec. 9) y C_F (Ec. 6).

Los parámetros para determinar los coeficientes de retención utilizando la membrana de 300 kDa fueron: σ_{max} igual a 0.99 y k igual a 60. La Figura 24 presenta los coeficientes de retención experimentales y los valores calculados con el modelo, Ecuación (8).

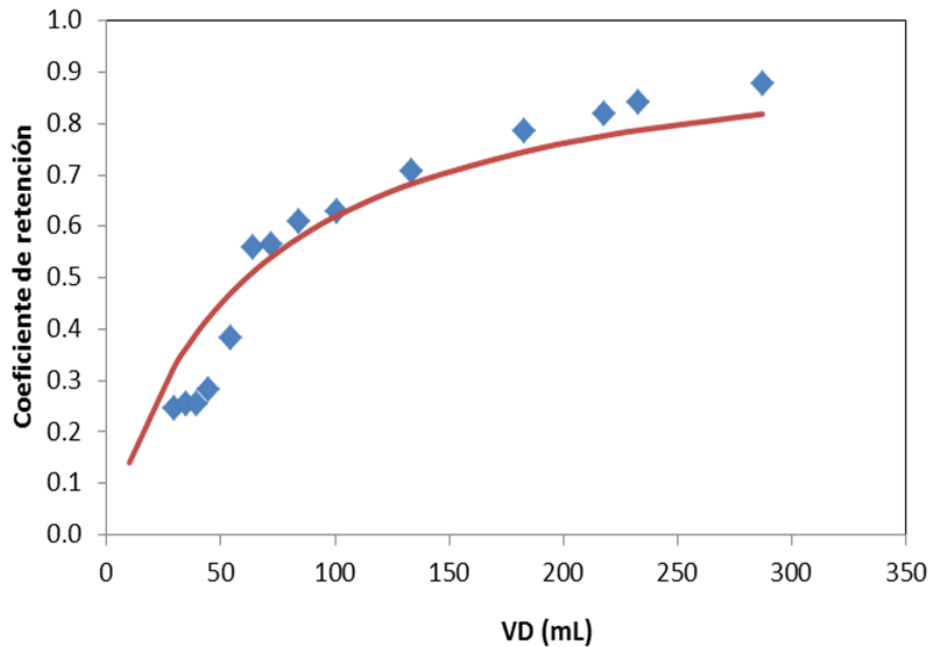


Figura 24. Curva del coeficiente de retención en el sistema de ultrafiltración tangencial con una membrana de 300 kDa, flujo de 50 mL/min y ΔP de 1.5 psig. \blacklozenge Datos experimentales, — Datos calculados con el modelo.

Se supuso el comportamiento variable del coeficiente de retención (σ) con el volumen de lavado, esto puede ser comprobado con los valores de los coeficientes de retención calculados durante el experimento, Figura 24.

Se determinó la curva de concentración en forma adimensional de la solución retenida durante el tiempo de operación. En la Figura 25 se muestra que el modelo teórico para C_A/C_{A0} , Ec. (9), presenta un buen ajuste a los datos experimentales y describe el comportamiento del sistema. Durante los primeros 100 mL de lavado se elimina el 50% de los contaminantes que pueden atravesar la membrana.

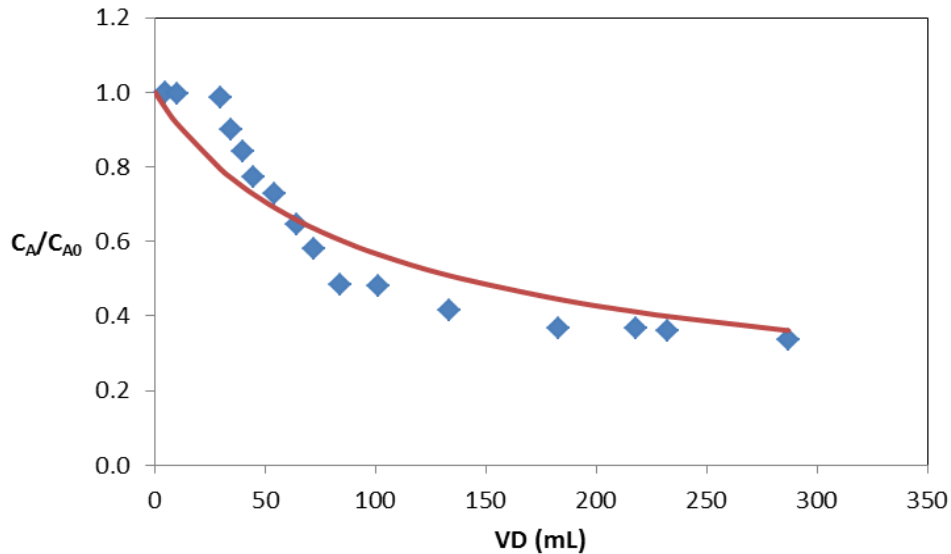


Figura 25. Perfil de concentración de solutos en la solución retenida en el sistema de ultrafiltración tangencial con una membrana de 300 kDa de tamaño de corte, flujo 50 mL/ min y ΔP 0.75 psig. \blacklozenge Datos experimentales, Datos calculados con el modelo. —

A continuación, en la Figura 26, se muestra el perfil de concentración en forma adimensional de la solución filtrada durante la pre- purificación de la solución conteniendo el plásmido. Se observa que el 80% de las moléculas con tamaño menor a 300 kDa se filtraron después de 100 mL de lavado. En la Figura, también se muestran los valores obtenidos a partir de la definición del coeficiente de retención utilizando σ y C_F calculados con la Ec. (6). Esto permitió hacer su comparación con los valores de concentración adimensional medidos en el filtrado y validarlos con el modelo.

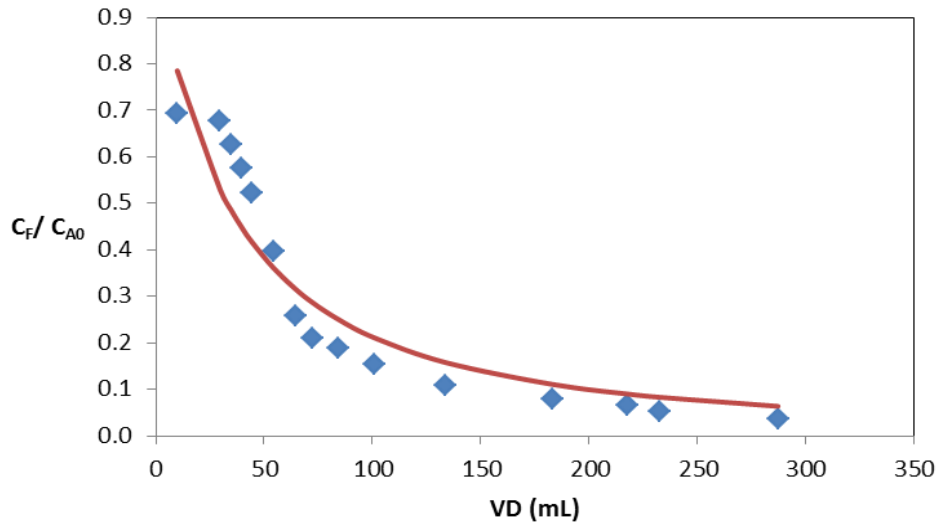


Figura 26. Perfil de concentración de solutos en la solución filtrada en el sistema de ultrafiltración con una membrana de 300 kDa de tamaño de corte, flujo 50 mL/min y ΔP de 1.5 psig, ◆ Datos experimentales, Datos calculados con el modelo. —

El estudio electroforético de las muestras recolectadas durante el experimento se muestra en la Figura 27. Se puede observar en esta Figura la disminución de los contaminantes en el retenido (líneas 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13) y también que el ARN de tamaño pequeño se encuentra en el filtrado (líneas 6, 8, 10, 12, 14). Además, se observa que no hubo pérdidas de plásmido a través de los poros de la membrana.

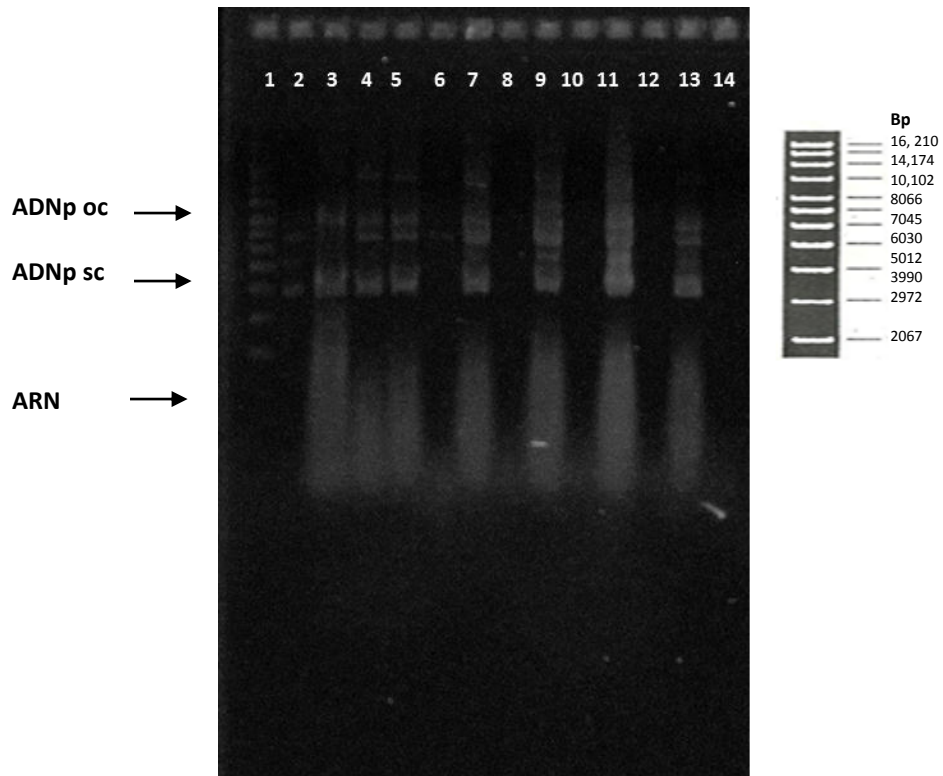


Figura 27. Gel de electroforesis de muestras de filtrado y retenido utilizando una membrana de 300 kDa en un sistema de ultrafiltración tangencial. Línea 1 marcador de peso molecular (supercoiled ADN ladder); línea 2 pVAX1 purificado con kit químico; línea 3 lisado; línea 4-5 lisado clarificado; línea 7, 9, 11, 13 solución de retenida por la membrana; línea 6,8,10,12,14 solución filtrada.(ADNp oc: ADNp circular abierto; ADNp sc: ADNp super enrollado).

Experimento 3: Ultrafiltración Tangencial con Membrana de 500 kDa

La ultrafiltración se realizó a partir de un volumen de lisado clarificado de 100 mL con 1.88 Unidades de Absorbancia (AU) y conductividad de 26.6 miliSiemens (mS).

La absorbancia de la solución retenida se disminuyó hasta una absorbancia de 0.59 AU y una conductividad de 0.09 mS. , lo cual indica la remoción del 68 % de contaminantes durante la ultrafiltración. Se utilizaron 350 mL de solución de lavado para alcanzar dicha absorbancia en 184 minutos, lo cual equivale a 3.5 volúmenes de lavado. La Figura 28 muestra el perfil de

absorbancia y conductividad del filtrado durante el tiempo de proceso utilizando una membrana con tamaño de corte de 500 kDa.

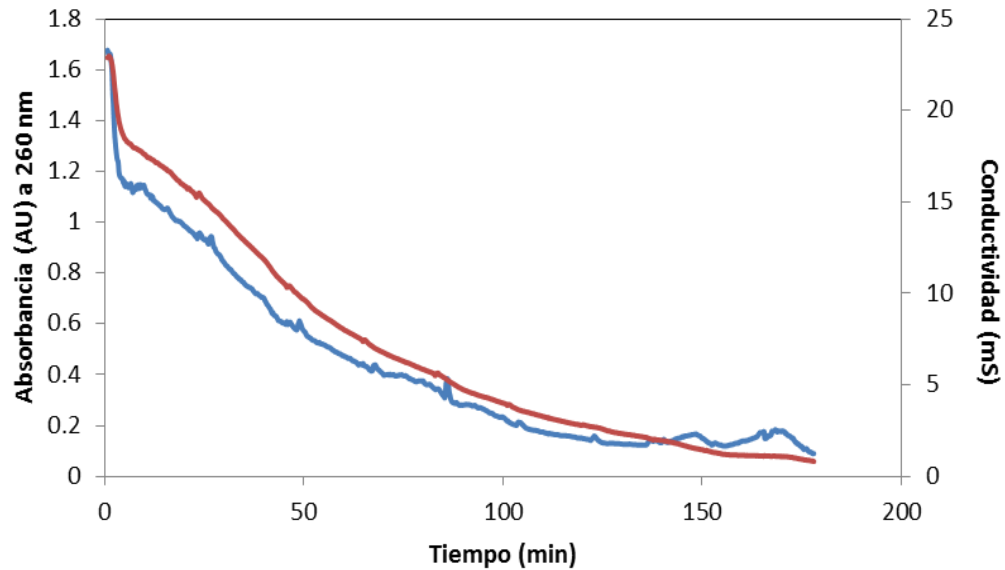


Figura 28. Perfil de absorbancia y conductividad del filtrado utilizando una membrana con tamaño de corte de 500 kDa y flujo 50 mL/min y ΔP de 1.5 psig. — Absorbancia, — Conductividad.

Se calculó el coeficiente de retención experimental con la Ecuación (6) y el coeficiente teórico a partir de la Ecuación (8) de la misma manera que en el Experimento 2. Utilizando la membrana de 500 kDa se obtuvo un valor máximo de σ_{\max} de 0.94 y un valor de k de 24.5. La Figura 29, presenta los valores del coeficiente de retención obtenidos durante el experimento y el ajuste de los mismos con los valores calculados, demostrando de esta manera el comportamiento variable del coeficiente de retención durante el tiempo de proceso.

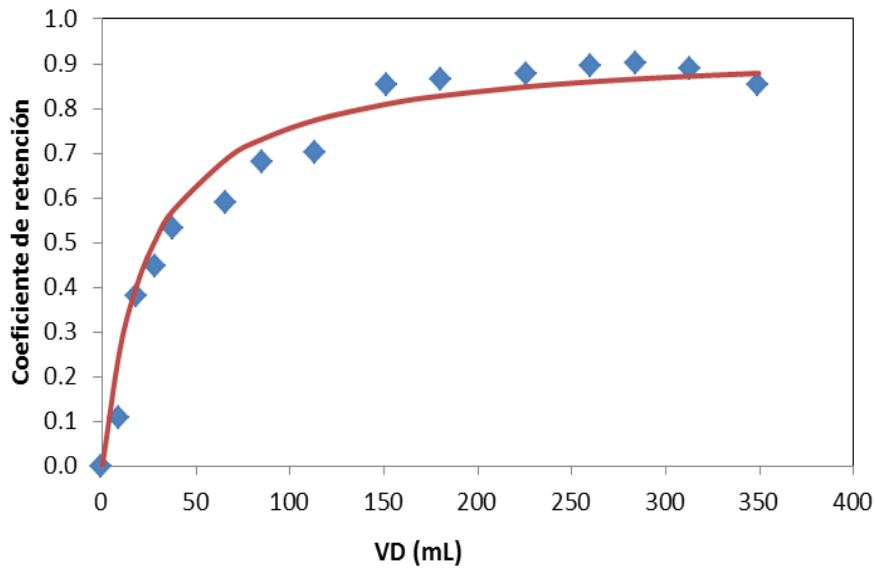


Figura 29. Curva del coeficiente de retención en el sistema de ultrafiltración tangencial con una membrana de 500kDa, flujo de 50 mL/min y ΔP de 1.5 psig. \blacklozenge Datos experimentales, — Datos calculados con el modelo.

Se determinó la curva de concentración en forma adimensional de la solución retenida durante el experimento. Se comparó con los valores obtenidos a partir del modelo, Ecuación (9). La Figura 30, muestra los valores calculados y los valores de C_A/C_{A0} experimentales, medidos a 260 nm en la solución retenida durante el tiempo de proceso. También, se observa que durante los primeros 100 mL de lavado se logra remover el 40 % de los contaminantes.

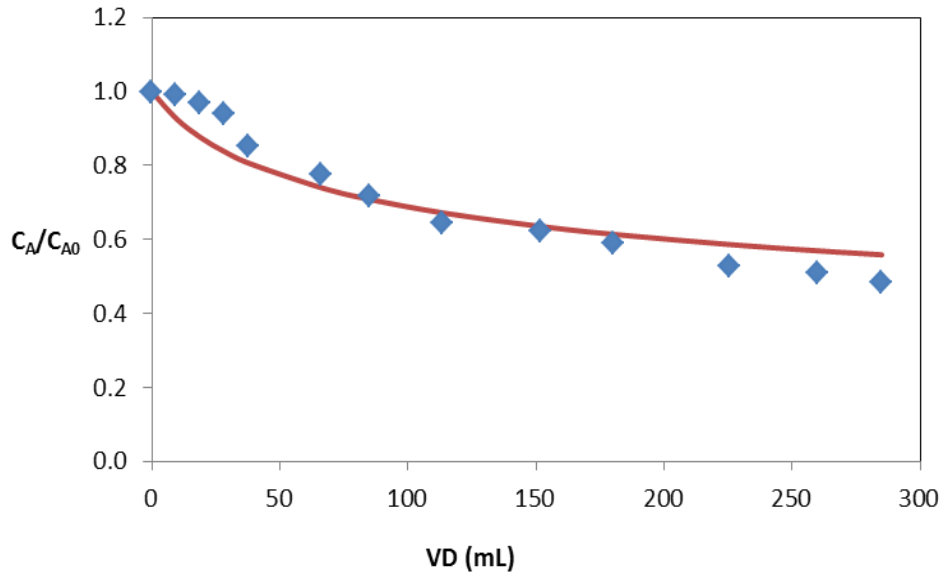


Figura 30. Perfil de concentración de solutos en la solución retenida en el sistema de ultrafiltración tangencial utilizando una membrana de 500 kDa de tamaño de corte, flujo 50 mL/ min y ΔP 0.75 psig. \blacklozenge Datos experimentales, — Datos calculados con el modelo.

A continuación, en la Figura 31, se muestra el perfil de concentración en forma adimensional de la solución filtrada durante la pre-purificación de la solución conteniendo el plásmido. Se observa que el 80% de las moléculas con tamaño menor a 500 kDa se filtraron después de 100 mL de lavado. También, se muestran los valores obtenidos a partir de la definición del coeficiente de retención utilizando σ y C_F calculados con la Ec. (8). Esto permitió hacer su comparación con los valores de concentración adimensional medidos en el filtrado y validarlos con el modelo.

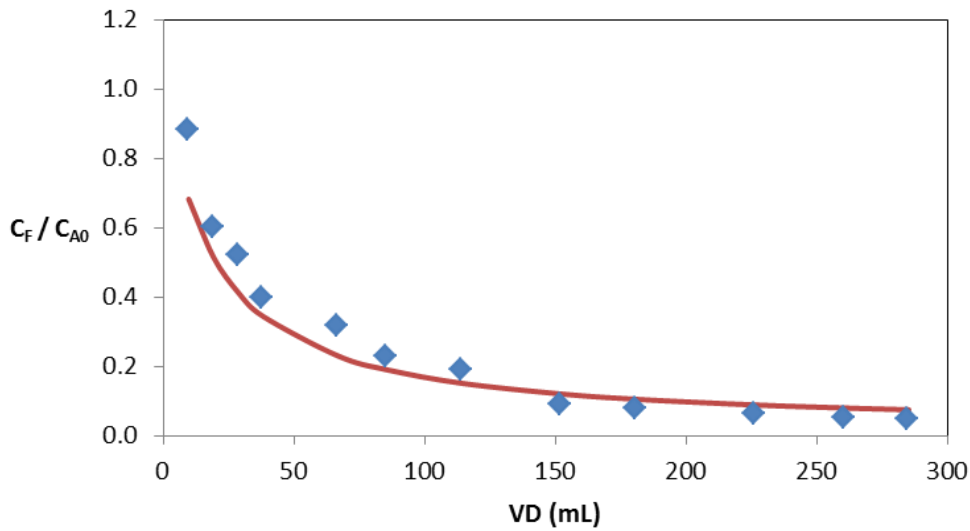


Figura 31. Perfil de concentración de solutos en la solución filtrada en el sistema de ultrafiltración con una membrana de 500 kDa de tamaño de corte, flujo 50 mL/min y ΔP de 1.5 psig. \blacklozenge Datos experimentales, Datos calculados a partir del modelo. —

Se realizó un estudio de electroforesis en gel de agarosa de las muestras recolectadas durante el experimento. En la Figura 32, se puede observar claramente la disminución de los contaminantes del retenido durante la operación del sistema de ultrafiltración tangencial con la membrana de 500 kDa (líneas 2, 3, 6, 8, 10, 12), sin embargo, se detectó una pequeña pérdida de plásmido a través de la membrana durante los primeros minutos de filtración. Esto puede deberse a la característica de elongación que tiene el plásmido (Eon-Duval *et al.*, 2003). A pesar de ello, se logra mantener una buena calidad del plásmido en la solución final y una remoción notoria de ARN (Línea 12).

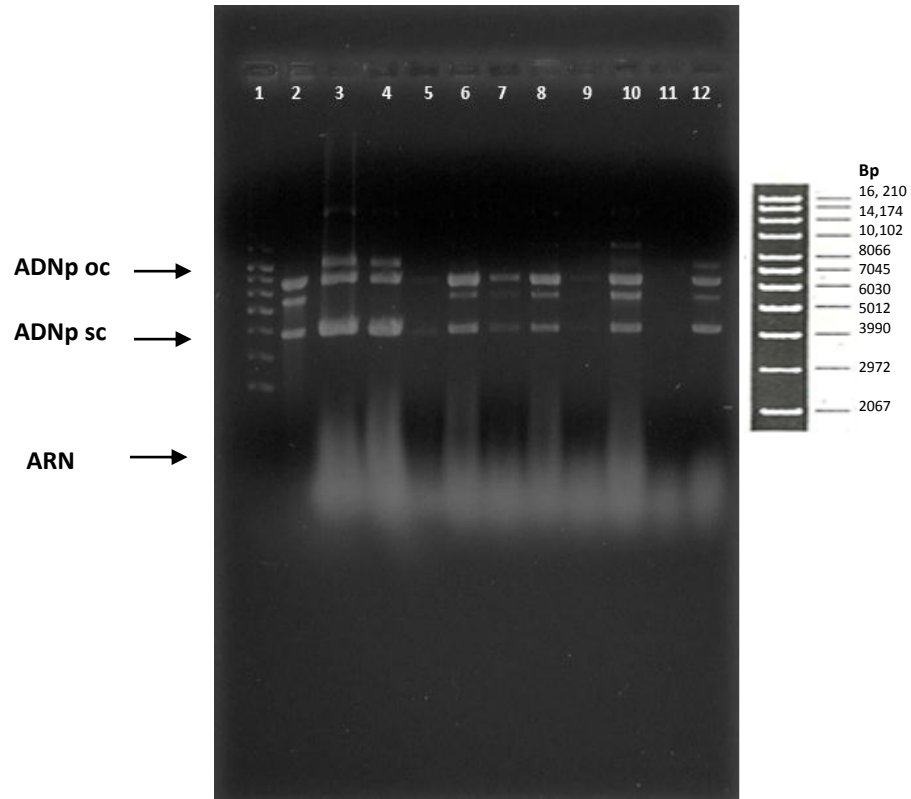


Figura 32. Gel de electroforesis de muestras de filtrado y retenido utilizando una membrana de 500 kDa en un sistema de ultrafiltración tangencial. Línea 1 marcador de peso molecular (supercoiled DNA ladder); línea 2 pVAX1 purificado con kit químico; línea 3 lisado; línea 4 lisado clarificado; línea 5, 7, 9, 11 solución de filtrado; línea 6,8,10,12 solución retenida por la membrana (ADNp oc: ADNp circular abierto; ADNp sc: ADNp superenrollado).

Con el propósito de comparar el comportamiento del retenido utilizando las membranas de 300 y 500 kDa se calculó el perfil de concentración adimensional de la solución retenida (C_A/C_{A0}) (que es proporcional a la absorbancia) a lo largo del tiempo de proceso, Figura 33. Se puede observar que con la operación de ultrafiltración con flujo tangencial se puede eliminar alrededor del 50% de los contaminantes, utilizando la membrana de 300 kDa y 500 kDa, considerando todas las especies que se logran filtrar a través de la membrana.

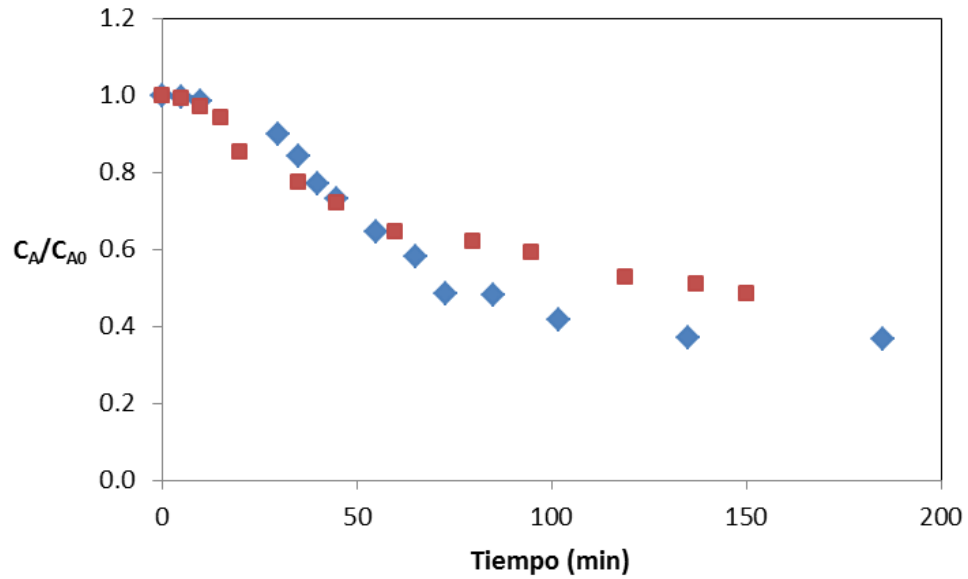


Figura 33. Perfil de concentración adimensional de solutos en la solución retenida durante la pre-purificación del plásmido en función del tiempo de proceso. ◆ Datos obtenidos con la Membrana de 300 kDa. ■ Datos obtenidos con la Membrana de 500 kDa.

Finalmente, se determinó el contenido de proteínas en la solución retenida midiendo la absorbancia de las muestras colectadas a una longitud de onda de 280 nm. La Figura 34 muestra el perfil del contenido de proteínas en forma adimensional, durante el tiempo de operación con las membrana de 300 y de 500 kDa.

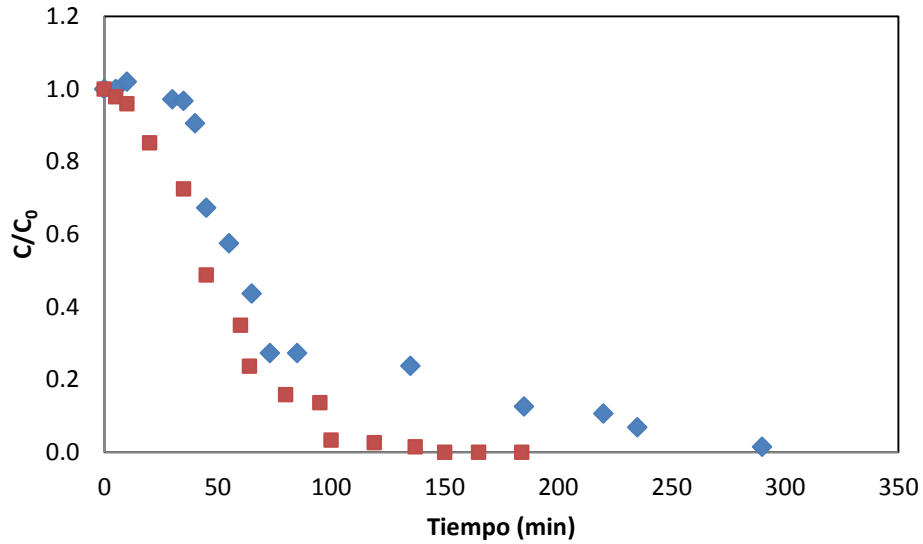


Figura 34. Perfil de concentración de proteínas en la solución retenida durante la ultrafiltración tangencial.
◆ Membrana de 300 kDa, ■ Membrana de 500 kDa.

El desempeño de ambas membranas en la ultrafiltración fue similar, dado que las proteínas tienen un tamaño menor a 200 kDa, se logró la remoción de éstas. Con la membrana de 300 kDa la eliminación fue del 98.5% de proteínas presentes en el lisado clarificado, mientras que con la membrana de 500 kDa se obtuvo una remoción completa de proteínas y en aproximadamente la mitad del tiempo de proceso.

En la Tabla 4 se resumen los resultados obtenidos durante la experimentación con cada una de las membranas.

Tabla 4. Efecto del tamaño de corte de una membrana de fibra hueca en la pre purificación de plásmido por medio de filtración con flujo tangencial operando en modo continuo.

Peso Molecular de Corte	Remoción de contaminantes del Retenido	Remoción de Proteínas	Número de volúmenes de lavado	Tiempo de operación del sistema
kDa	%	%		min
100	33.0	NC*	3.0	130
300	69.0	98.5	2.8	290
500	68.0	100	3.5	184

*NC: no cuantificado

Con base a los resultados, las membranas de 300 y 500 kDa mostraron un comportamiento similar en cuanto a la remoción de contaminantes y se mantuvo una buena calidad del plásmido. Sin embargo, la membrana de 500 kDa realizó la operación en un tiempo más corto, lo cual representaría una ventaja al momento de escalar la operación. El plásmido pre-purificado se pasará hacia la última etapa del bioproceso que consiste en cromatografía de intercambio iónico, en modo frontal.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

La pre-purificación de ADN plasmídico se logró con un sistema de ultrafiltración tangencial en modo continuo utilizando membranas huecas de diferente tamaño de corte. La selección del tamaño de poro de la membrana es un factor muy importante para conseguir la remoción de contaminantes de la solución de lisado clarificado.

Las tres membranas de: 100, 300 y 500 kDa, lograron desalinizar la solución inicial como se verificó con la conductividad final del retenido. Las membranas de 300 y 500 kDa mostraron un comportamiento similar en cuanto a la remoción de contaminantes y mantuvieron una buena calidad del plásmido. Sin embargo, la membrana de 500 kDa realizó la operación en un tiempo más corto, lo cual representaría una ventaja al momento de escalar la operación.

El modelo desarrollado en base al balance de masa describe el comportamiento del sistema de ultrafiltración tangencial, demostrando a su vez, la variación del coeficiente de retención durante el tiempo del proceso.

El sistema de ultrafiltración tangencial es eficiente para la pre-purificación de plásmido y es fácil de escalar. Además, no genera un impacto ambiental desfavorable, dado que la operación no utiliza agentes químicos, ni produce desechos.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

Realizar un análisis cuantitativo en las soluciones de filtrado y retenido, para determinar la integridad del plásmido durante el proceso o si hubiera pérdidas a través de la membrana fluyendo hacia el filtrado.

Acoplar un transductor de presión en la entrada y ambas salidas de la membrana (filtrado y retenido) para llevar un control de la presión transmembrana durante el tiempo de operación.

Elaborar estudios más específicos para determinar el efecto de polarización de la membrana durante el tiempo de proceso.

Asegurar una buena lisis en la etapa de recuperación primaria del bioproceso, para facilitar la ultrafiltración en la etapa de recuperación intermedia.

Considerar que la solución de plásmido pre-purificado se encuentra diluida por los volúmenes de lavado, por lo cual podría ser necesario concentrarlo antes de someterlo a la etapa de purificación final.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS

- Birnboim H.C., Doly J. (1979), A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *J. Nucl. Acids Res.*, 7, 1513 – 1523.
- Carnes A. E. (2005) Fermentación design for manufacture. *Bioprocess International*, 3, 9, 36-42.
- Carnes, A. E., Williams J.A. (2007), Plasmid DNA manufacturing technology. *Recent Patents of Biotechnology*, 2, 151-166.
- Cejudo A. G., Tejada M., Camargo A., Higuera J.J., Mariscal V., Fernández E. (2009), Aislamiento y purificación del DNA de un plásmido recombinante. *Bioprocess Biosyst Eng.*, 39, 1-5.
- Diogo M.M., Ribeiro S.C., Queiroz J.A., Monteiro G.A., Tordo N., Perrin P., Prazeres D.M.F. (2001), Production, purification and analysis of an experimental DNA vaccine against rabies. *J. Gene Med.*, 3, 577 – 584.
- Eon-Duval A., Burke G. (2004), Purification of pharmaceutical-grade plasmid DNA by anion-exchange chromatography in an RNase-free process. *J. Chromatogr. B.*, 804, 327 – 335.
- 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. *Anal. Biochem.*, 316, 66 – 73.
- Feng C.Y., Li, Zhang X.Y., Dong K., Hu1 B.Y., Guo X.K. (2009), Immune strategies using single component LipL32 and multicomponent recombinant LipL32-42-OmpL1 vaccines against leptospira. *Braz.J.Med.Res.* 42, 9, 776-869.
- Freitas S., Canário S., Santos J. A. L., Prazeres D.M.F (2009), Alternatives for the intermediate recovery of plasmid DNA: Performance, economic viability and environmental impact. *Biotechnol. J.*, 4, 265–278.
- Freitas S.S., Santos J.L., Prazeres D.M.F. (2006), Optimization of isopropanol and ammonium sulfate precipitation steps in the purification of plasmid DNA. *Biotechnol. Prog.* 22, 1179 – 1186.

- Freitas S.S. (2007), Development and optimization of a scalable plasmid DNA production process based on hydrofobic interaction chromatography and aiming at gene therapy and DNA vaccination. Tesis Doctorado. Universidad de Técnica de Lisboa, Instituto Superior Técnico. Portugal.
- Guidice D., Ayala, Kiger, Maniatis. (1984), Ingeniería Genética o Tecnología del ADN recombinante. *SSNV*, 3-15.
- Grzenia D. L., Carlson J.O., Wickramasingha S.R. (2008), Tangential flow filtration for virus purification. *Journal of Membrane Science*, 321, 373-380.
- Harrison R.G. (1994), Protein Purification Process Engineering. *Marcel Decker Inc*, 57-87
- Jae-Young K., Chunghee C., Byung-Nam Cho (2010), Plasmid DNA of high quality purified by activated charcoal. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 110, 5, 608–613.
- Kendall D., Lye G.J., Levy M. S. (2002), Purification of plasmid DNA by an integrated operation comprising tangential flow filtration and nitrocellulose adsorption. *Biotechnol. Bioeng.*, 79, 816 – 822.
- Kahn D.W., Butler M.D., Cohen D.L., Gordon M., Kahn J. W., Winkler M E. (2000), Purification of plasmid DNA by tangential flow filtration. *Biotechnol. Bioeng.*, 69, 101–106.
- Mazonelli, D; E. Argento; J. Barriola; R. Caminoa; M. Draghi; M. Saravi. (1994). Comisión Científica permanente sobre Leptospirosis- SENASA. 11- 28.
- Motulsky y Christopoulos (2004), Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. *Oxford University Press*, 34-35.
- Munguía S.R. (2011), Producción de pVAX1-NH36 para uso terapéutico mediante un proceso por lote alimentado controlado. Tesis de Maestría en Ciencias de la Ingeniería. Universidad de Sonora. México.
- OIE, (2004), Manual para el diagnóstico de la Leptospirosis. Disponible en: http://int/eng/normes/mmanual/A_00041.html (20/11/2005).
- Perry R.H., Green D.W. (2003) *Manual del Ingeniero Químico*. McGraw -Hill, 4, 22-71, 22-72.
- Prather K.J., Sagar S., Murphy J., Chartain M. (2003), Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzyme Microb. Technol.*, 33, 865-883.

- Prazeres D.M.F., G.A. Monteiro, G.N.M. Ferreria, M.M. Diogo, S.C. Ribeiro, J.M.S. Cabral (2001), Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination, *Science Biotechnology Annual Review*, 7, 1-30.
- Prazeres D.M.F., Ferreira G.N.M., Monteiro G.A., Cooney C.L., Cabral J.M.S. (1999), Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottleneck. *Trends Biotechnol.*, 17, 169 – 174.
- Prazeres D.M.F., Shluep T., Cooney C. (1998), Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion exchange chromatography. *J. Chromatography A*, 31-45.
- Radostits O., Gay C., Blood D., Hinchcliff K. (2002), Medicina Veterinaria, tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. IX Ed., McGraw-Hill Interamericana. España. 1, 1150-1168.
- Robertson J.S., Griffiths E. (2001), Assuring the Quality, Safety, and Efficacy of DNA Vaccine. *Molecular Biotechnology*. 17, 143-149.
- Sánchez J. (2009), Vacunas de ADN: Inducción de la Respuesta Inmunitaria, *Scielo Public Health*. 51.
- Sandoval E. (2010), Bioproceso para la obtención de un vector de ADN plasmídico de uso potencial como vacuna contra leptospirosis en Sonora. Tesis de Maestría en Biociencias. Universidad de Sonora. México.
- Seader J.D., Henley E.J. (2006), *Separation Process Principles*. J. W. & Sons, Inc, USA.
- Shuler M.L., Kargi F. (2002), *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Prentice Hall.
- Sousa F., Prazeres D.M.F., Queiroz J.A. (2008), Affinity Chromatography Approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. *J. Chromatography*, 26, 9, 518-525.
- Schwartz L. (2003), Introduction to Tangential Flow Filtration for Laboratory and Process Development Applications. *Millipore Corporation*.
- Schwartz L. (2003), Diafiltration: A Fast, Efficient Method for Desalting, or Buffer Exchange of Biological Samples. *Life Science Pall*.
- Tejeda A., Montesino R.M., Guzmán R. (1995), *Bioseparaciones*. Ed. Universidad de Sonora, México.
- Vidal-Asaín L. (1999), Las técnicas de Filtración Tangencial y el Medio Ambiente. *Profilta*, 3.

Wankat P.C. (2008), Ingeniería de Procesos de Separación. Pearson Educación, México.

Zhu K., Jin H., Ma Y., Ren Z., Xiao C., He Z., Zhang F., Zhu Q., Wang B. (2005). A continuous thermal lysis procedure for the large-scale preparation of plasmid DNA. *J. Biotechnol.*, 118, 257 – 264.

ANEXOS

ANEXO A. Manual de Operación del Sistema de Ultrafiltración con Flujo Tangencial (MidJet Benchtop System)

ADVERTENCIAS

1. El sistema debe de estar desconectado para cualquier inspección o modificación de algún elemento del sistema. La bomba puede encenderse accidentalmente provocando algún daño en la persona o una liberación de presión inesperada.
2. Para prevenir una fuga inesperada y posiblemente daños físicos, usar conectores en todas las tuberías.
3. Usar mangueras que no están diseñadas para bombas peristálticas provocará fallas constantes en la tubería, exponiendo al operador de daños físicos o derrames del fluido. Utilizar en todo momento mangueras especiales para usarse en bombas peristálticas.
4. Mantener la válvula de pellizco abierta cada vez que se va a iniciar la operación de alimentación al sistema. Si se enciende la bomba con la válvula cerrada, ejercerá una fuerte contrapresión provocando fugas o derrames del fluido en las tuberías.
5. La bomba de alimentación del sistema MidJet se calienta al permanecer mucho tiempo encendida. No tocar la bomba

- Plataforma para montaje

PRECAUCIONES

1. Para evitar daños al equipo, planear cuidadosamente la instalación del sistema. Ver las instrucciones de instalación en la guía.
2. Las membranas de cartuchos de fibra hueca son fuertes y seguras. Un mal manejo de ellas puede dañar la membrana. Seguir la guía de prevención de daño a la membrana:
 - a) Si la membrana de fibra hueca se seca, difícilmente se puede volver a humedecer. No permita que la membrana de ultrafiltración se seque.
 - b) Manipular los cartuchos cuidadosamente y no someter la membrana a presiones muy altas durante su uso.
 - c) Evitar apretar demasiado los conectores de las tuberías al momento de instalar el sistema.

- Bomba peristáltica para utilizar dos diferentes tamaños de tubería
- Kit de accesorios para el sistema incluyendo:
 - Seis tanques de 30 ml y doce tanques de 120 ml cada uno con tapa y tuberías de entrada al tanque.
 - 1 válvula de pellizco
 - 10 adaptadores para tuberías de 1/8" (Luer- Lok)
 - 10 adaptadores para tuberías de 3/32"(Luer - Lok)
 - 6 adaptadores tipo tapadera (Luer-Lok)
 - 1.5 m (3 pies) de manguera de silicón tamaño 14
 - 1.5 m (3 pies) de manguera de silicón tamaño 16
- Manual de Instrucciones de uso/Instalación/ Seguridad

2. Aplicaciones

El sistema MidJet puede concentrar y diafiltrar soluciones biológicas de manera rápida y precisa. El sistema acepta membrana de cartucho de fibra hueca (MidGee o MidGee Hoop). Este tipo de membranas minimiza el efecto de polarización debido a la velocidad de flujo cruzado generado por la bomba de alimentación. Esto resulta en la recuperación efectiva y alta del producto que se desee obtener utilizando las condiciones de presión y flujo óptimas.

3. Descripción del Equipo y Accesorios del Sistema MidJet Benchtop

a. Plataforma para montaje

La plataforma incluye un soporte para instalar la bomba peristáltica y el cartucho. También tiene espacio para colocar dos recipientes de 120 ml y uno de 30 ml.

b. Bomba Peristáltica

El sistema incluye una bomba peristáltica de 24 volts DC de una sola velocidad. Al ajustar el seguro que está ubicado encima del cabezal de la bomba aumenta la velocidad de flujo, de lo contrario disminuye el flujo. La bomba permite utilizar tubería de tamaño 14 y 16.

c. Tanques de Deposito

El sistema MidJet incluye tanques de 30 ml y 120 ml, con sus respectivas tapas adaptadas con las tuberías de entrada al tanque. Los recipientes no pueden ser sometidos a alta presión por lo que son NO autoclavables. Dentro de los tanques se crea vacío permitiendo alimentar el fluido de un tanque a otro y al interior de la membrana. Además, permite que la solución retenida ingrese al tanque de alimentación por debajo del nivel del líquido evitando la formación de espumas. Cada tanque indica el volumen con el cual se está trabajando. El volumen exacto del sistema dependerá del tamaño de membrana que se esté utilizando.

d. Accesorios para Tuberías

El sistema incluye accesorios para tuberías, mangueras y una válvula de contrapresión.

Los accesorios para tuberías permiten conectar la tubería a los tanques de depósito.

Las mangueras de silicona son de 14 y 16", especiales para bombas peristálticas. La velocidad de flujo máxima para la tubería de 14" es de 50 ml/min y la de tamaño 16" permite un flujo máximo de 140 ml/min.

La válvula permite regular y controlar la contrapresión a través de la membrana de cartucho de fibra hueca. La válvula debe instalarse en la línea de retenido, ésta, permite un ajuste preciso en la tubería para controlar la presión.

e. Membranas de Fibra Hueca de Polisulfona

Leer la guía para el uso y manipulación de membranas de fibra hueca. Anexo B

4. Instalación del Sistema MidJet System

- a. Seleccionar un espacio adecuado para instalar el equipo. Asegúrese que el lugar este cerca de un toma corriente.
- b. Instalar la bomba peristáltica



Figura 35.Bomba peristáltica de 24 volts DC de una sola velocidad.

1. Colocar la bomba encima de la plataforma para montaje y conectar el cable de corriente de la bomba



Figura 36.Plataforma de montaje y bomba peristáltica.

2. Desajustar la perilla que está encima del cabezal de la bomba. Girarla en cualquier dirección.



Figura 37. Perilla para ajustar la velocidad de flujo de alimentación al sistema.

3. Seleccionar el tamaño de tubería con el que se trabajará y cortar la manguera de 35 a 45 cm. Colocar los adaptadores (Luer Lok) en ambos extremos de la manguera.



Figura 38. Kit de accesorios para tuberías, mangueras y una válvula de contrapresión.

3. Instalar la válvula de tres vías en la tubería de alimentación a la membrana.

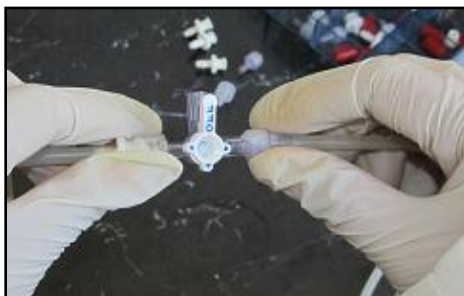


Figura 39. Válvula de tres vías para la toma de muestras de la solución retenida.

4. Colocar la manguera en el cabezal de la bomba. Cubrir la manguera y girar la perilla hasta que quede ajustada.



Figura 40. Ajuste de la manguera de alimentación en la bomba peristáltica.

c. Posición de los tanques de depósito

Tomar un tanque de 120 mL con su respectiva tapadera que tiene tres entradas. Colocar el tanque en el espacio derecho que está frente a la bomba. Este tanque será el tanque que contendrá la solución de alimentación.



Figura 41. Tanque de 120 mL para la solución de alimentación.

Si se planea realizar una diafiltración. Tomar otro tanque de 120 mL con su respectiva tapadera que tiene tres entradas. Colocar el recipiente en el espacio que está en el centro frente a la bomba. (Lado izquierdo del tanque de alimentación). En este tanque se colocará la solución de lavado (buffer) que será alimentada constantemente al tanque de alimentación.

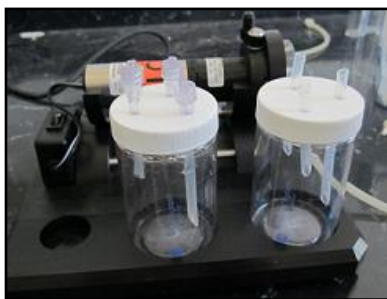


Figura 42. Tanque de 120 mL para la solución de lavado (Buffer TE) y solución de alimentación.

Tomar un recipiente de 30 mL con su respectiva tapadera que tiene tres entradas. Colocarlo en el espacio izquierdo del tanque de lavado. Este será el tanque de recolección de la solución permeada o filtrada.



Figura 43. Tanque de 30 mL para solución de filtrado, Tanques de 120 mL para solución de lavado y alimentación.

ADVERTENCIA

➤ Los tanques no están diseñados para ser sometidos a altas presiones. Son NO-AUTOCLAVABLES. Los recipientes pueden quebrarse exponiendo al operador a daños ocasionados por derrame de la solución contenida.

d. Instalar el Cartucho de Membrana de Fibra Hueca

Tapar una de las salidas de la línea de permeado con un adaptador solido Luer- Lok que se encuentra dentro del kit de accesorios para el sistema MidJet.



Figura 44. Membrana de fibra hueca para el sistema de ultrafiltración tangencial.

Cortar un tramo de manguera de una longitud de 30 cm (12 pulgadas). Colocar en ambos extremos un adaptador Luer Lok. Acoplar uno de los extremos en la salida de la línea de permeado del cartucho. Conectar el otro extremo de la manguera a una de las entradas del tanque de 30 ml.



Figura 45. Salida de la membrana para la solución filtrada.

Cortar un tramo de manguera de una longitud de 40 cm (16 pulgadas). Instalar la válvula de contrapresión o de retención en la tubería. Colocar en ambos extremos un adaptador Luer Lok. Acoplar en la salida de la línea de retenido uno de los extremos. Conectar el otro extremo en una de las entradas del tanque de alimentación.



Figura 46. Válvula de retención o contrapresión en la línea de retroalimentación.

TIP

➤ No sobre ajustar los conectores Luer Lok. Tratar de mantener la longitud de las mangueras lo más corto posible. Utilizar mangueras de corta longitud minimiza el error del sistema.

e. Consideraciones para la Diafiltración

La conexión entre el tanque de alimentación y el tanque de la solución de lavado debe de estar bien cerrada para permitir que se cree vacío. De esta manera la solución de lavado fluirá con facilidad hacia el tanque de alimentación. Tapar los dos orificios restantes del tanque de lavado. Si no se va a realizar una diafiltración, remover la línea de diafiltración del proceso.

f. Conectar la corriente eléctrica

Conectar el cable de corriente de la bomba a 110-volt, 60 Hz o 220 volt, 50 Hz.

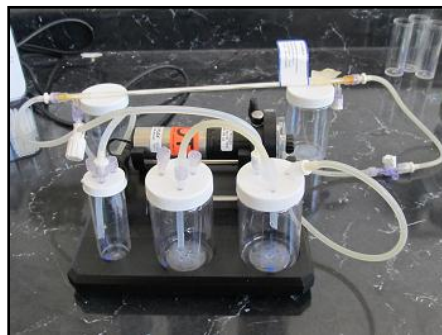


Figura 47. Sistema de ultrafiltración con flujo tangencial (MidJet Benchtop System).

TIP

- Trabajar con agua hasta familiarizarse con la operación del sistema. Esto permitirá identificar si hay alguna fuga en alguna tubería.

5. Operación del Sistema MidJet Benchtop System

Antes de utilizar el sistema de ultrafiltración asegúrese de haber leído la guía para membranas de cartucho de fibra hueca. Leer bien las especificaciones de la misma y procedimiento para lavar y almacenar la membrana. (Anexo B)

ADVERTENCIA

- Usar mangueras que no están diseñadas para bombas peristálticas provocará fallas constantes en la tubería, exponiendo al operador de daños físicos o derrames del fluido. Utilizar en todo momento mangueras especiales para usarse en bombas peristálticas.

5.1 Procedimiento para iniciar el sistema:

1. Encender el transductor de presión (en caso de tenerlo)
2. Agregar la solución de alimentación al tanque de alimentación (120 ml) y la solución de lavado en el tanque ubicado enseguida.
3. Abrir 100% la válvula de contrapresión
4. Encender la bomba peristáltica presionando el botón que está en la plataforma.
5. Ajuste el flujo de alimentación utilizando la perilla ubicada encima del cabezal de la bomba.
6. Ajuste la presión utilizando la válvula de contrapresión ubicada en la línea de retenido.

5.2 Parámetros de Operación

Velocidad de Flujo de recirculación típico – 50-140 ml/min

Máxima presión de entrada – 30 psig (2 barg)

Presión de entrada típica para Microfiltración – 3-10 psig (0.2-0.7 barg)

Presión de entrada típica para Ultrafiltración – 10-20 psig (0.7-1.4 barg)

Máxima temperatura de operación- 60°C (140 °F)

Rango de pH – 2 a 13

ADVERTENCIA

- Mantener la válvula de retención abierta cada vez que se va a iniciar la operación de alimentación al sistema. Si se enciende la bomba con la válvula cerrada, ejercerá una fuerte contrapresión provocando fugas o derrames del fluido en las tuberías.

5.3 Volumen de Diafiltrado Constante

El sistema MIDJET es adecuado para alcanzar un volumen de diafiltrado constante, ya que la bomba permitirá la succión de la solución del tanque de alimentación y creará vacío permitiendo el fluido del tanque de la solución de lavado hacia el tanque de alimentación. Seguir los siguientes pasos para una buena diafiltración:

1. Llenar el tanque de depósito de la solución de lavado (Buffer) y cerrarlo con la tapa correspondiente. (Asegurar que este bien cerrado).
2. Conectar el tubo del tanque hacia una de las entradas del tanque de alimentación. (Conectarlo a la manguera más larga de la tapadera del tanque de alimentación).
3. Encender la bomba para circular la solución a través de la membrana. Una vez que la solución se esté permeando, se creará vacío permitiendo que la solución de lavado fluya hacia el tanque de alimentación.

5.4 Procedimiento durante el Experimento

Una vez instalado el equipo de ultrafiltración con flujo tangencial (MidJet Benchtop System) acoplado al equipo BiologicBio-Rad seguir el siguiente procedimiento durante cada corrida:

1. Encender el equipo Biologic Bio-Rad y el software LPData View.
2. Medir el volumen inicial de Lisado Clarificado (Solución de Alimentación a la Membrana)
3. Medir el volumen inicial de solución Buffer (Solución de Lavado)
4. Encender el equipo con la válvula de retención abierta.
5. Iniciar el programa LPData View presionando el botón Iniciar. (En este momento los datos de absorbancia y conductividad del flujo de permeado serán registrados mediante un detector de UV y un conductímetro con unidades de absorbancia (AU) y milisiemens (mS) respectivamente.
6. Ajustar la válvula hasta lograr regular el flujo de lavado y el flujo de retroalimentación. Los flujos deben de ser aproximadamente iguales para mantener el nivel del tanque de alimentación.
7. Dejar correr el sistema hasta que el tanque de depósito de la solución filtrada se llene. Apagar el sistema de ultrafiltración y presionar el botón Detener en el software LPData.
8. Medir el volumen del filtrado y tomar una muestra.
9. Medir el volumen de la solución buffer y del tanque de alimentación. (Este último debe de permanecer constante)
10. Las muestras de retenido deben de tomarse cada 10 minutos utilizando la válvula de tres vías ubicada en la línea de alimentación.
11. Repetir el procedimiento desde el paso 4 hasta obtener una conductividad cercana a la de la solución buffer.
12. Guardar la gráfica en el programa LPData View. Si se requiere, el software LPData View permite exportar los datos capturados durante la corrida a una base de datos en Excel.
13. Lavar la membrana recirculando agua alrededor de 15 minutos. Si se va a guardar por más de 2 semanas seguir las indicaciones de lavado. (Anexo B)
14. A cada muestra de retenido se hace pasar por el UV a 260 nm para medir densidad óptica de ácidos nucleicos y a una longitud de 280 nm para medir proteínas.
15. Los datos registrados durante el experimento se ajustaron al modelo obtenido en el capítulo II.

5.5 Para apagar el Sistema seguir los siguientes pasos:

1. Apagar el traductor de presión
2. Apagar la bomba
3. Desajustar la perilla ubicada encima del cabezal de la bomba
4. Limpiar el sistema siguiendo las indicaciones de la guía para membranas de cartucho de fibra hueca (Anexo B)

6. Mantenimiento del Sistema

- Inspección
Revisar y cambiar la tubería de la bomba las veces que sean necesarias
Verificar que todas las tuberías estén en las mejores condiciones

ADVERTENCIA

- Usar mangueras que no están diseñadas para bombas peristálticas provocara fallas constantes en la tubería, exponiendo al operador de daños físicos o derrames del fluido.
Utilizar en todo momento mangueras especiales para usarse en bombas peristálticas.

7. Especificaciones del Sistema MidJet Benchtop

- Modelo MDG-3SP
- Dimensiones aproximadas: 20 x 18 x 12 cm (8 x 7 x 5 pulgadas)
- Peso: 1.6 kg (3.5 lbs)
- Material:
 - Tubería – silicona
 - Tanques de Deposito: poliestireno
- Accesorios de Tubería: nylon y policarbonato

ANEXO B. Instrucciones de Operación de Membranas de Fibra Hueca en el Sistema de Flujo Tangencial MidJet Benchtop

Las membranas se utilizan para operar en flujo cruzado. En comparación con las membranas de filtración normal, filtración con flujo cruzado involucra una línea de recirculación de la solución de alimentación a través de la superficie de la membrana impulsada por una bomba peristáltica.

1.Procedimiento para el uso de una nueva membrana de fibra hueca

Remoción del glicerol de la membrana

Las membranas de ultrafiltración requieren de un pre tratamiento con una solución de alcohol/glicerol para evitar el secado de las membranas durante su transporte. Es necesario remover todo el glicerol de la membrana antes de usarse. Además, el glicerol minimiza la entrada de aire hacia los poros formando una capa la cual reduce permeabilidad hasta que el aire haya sido completamente desplazado por el líquido. Seguir los siguientes pasos para realizar una buena limpieza de la membrana antes de utilizarse:

1. Utilizar agua limpia y tibia a una temperatura máxima de 50°C. Si el agua esta fría la limpieza de la membrana será menos efectiva. Agregar 100 ppm de NaOCl para ayudar a la remoción de glicerol.
2. Ajustar la presión transmembrana del cartucho a 15 psig para membrana de tamaño de poro de 100 kDa y 300 kDa; para membranas de 500 – 30000 kDa ajustar la presión a 10 psig y una presión de 5 psig para tamaño de poro más grande.
3. El flujo de retenido debe de ser aproximadamente 1/10 del flujo de filtrado o permeado.
4. Desechar ambos el filtrado y retenido al drenaje.

5. Continuar limpiado la membrana hasta haber obtenido por lo menos 100 ml de filtrado. Asegúrese de que todo el NaOCl haya sido removido por completo antes de introducir la solución deseada.
6. Realizar una última evaluación de limpieza utilizando agua desionizada. Registrar los datos y condiciones del fluido (presión, flujo, temperatura) para asegurar que la membrana este completamente limpia. **Un flujo muy lento de agua indica que aún existen contaminantes y que no se realizó una limpieza adecuada a la membrana.**
7. Acondicionar la membrana antes de empezar el experimento. Introducir al sistema una solución buffer por 10 minutos para lograr humedecer y homogenizar todas las áreas del sistema.

2. Flujo de Alimentación al sistema

La corriente de alimentación tiene un gran efecto sobre el flux del permeado. Una guía sobre el flujo de recirculación a través de la membrana se presenta en la Tabla 5. Los datos propuestos están en función del tipo de membrana, diámetro interno y esfuerzo de corte. La caída de presión a lo largo de la membrana está en función del flujo de alimentación y puede utilizarse para determinar el flujo de retroalimentación. La suma del flujo de filtrado y flujo de recirculación provee el flujo de alimentación.

Parámetros de operación para la membrana

Presión máxima de entrada: 3.5 barg (50 psig)

Presión típica de entrada: 0.7-1.4 barg (10-20 psig)

Temperatura máxima: 60°C (140°F)

Rango de pH: 2-13

Tabla5. Propiedades Físicas de membranas de fibra hueca de polisulfona para un sistema de flujo tangencial (Midjet System)

Estilo	Nominal ID (mm)	Número de Fibras	Longitud Nominal(cm)	Área de la membrana cm ²
MM	0.5	6	30	26
	0.75	4	30	24
	1	2	30	16
H22L	0.75	2	60	29
	1	2	60	38
H24L	0.5	4	60	42
H42L	0.5	2	110	0.6
	1	2	110	2

Tabla 6. Flujo Nominal de Alimentación y Caída de Presión en función de esfuerzo de corte

Esfuerzo de corte	200		2000		8000		16000		
	Nominal ID (mm)	Flujo (ml/min)	Flujo (ml/min)	ΔP (psig)	Flujo (ml/min)	ΔP (psig)	Flujo (ml/min)	ΔP (psig)	
MM	0.5	12.5	0.7	25	1.5	50	2.5	100	5.5
	0.75	20	0.5	40	1	80	2	160	4
	1	25	0.5	50	0.75	100	1.5	200	4.5
H22L	0.75	10	1	20	2	40	4	80	8
	1	25	0.8	50	1.5	100	3	200	9
H24L	0.5	8.5	1.5	17	3	33	5	66	10
H42L	0.5	4	2.5	8.5	5	17	10	33	19
	1	25	1.5	1.5	3	100	6	200	16

El esfuerzo de corte y el flujo de alimentación son directamente proporcionales. Los valores de esfuerzo de corte se basaron en viscosidad de 1 cp.

3. Almacenamiento de la Membrana

Los cartuchos de ultrafiltración deben de humedecerse antes de ser guardados o almacenados. Si se va a guardar un periodo de corto, máximo de dos semanas, se puede dejar la membrana humedecida en agua. Para almacenar un periodo más largo llenar los cartuchos con alguna de las siguientes soluciones:

1. Agua con 5-10 ppm de cloro. (se debe monitorear cada semana)
2. 0.1 N de hidróxido de sodio
3. 3% de formalina
4. Solución de etanol 30%.

Asegurar que la membrana permanezca húmeda para evitar que se seque.

ANEXO C. Programa utilizado para Regresión no Lineal

```

function Problema
clear, clc, format short g, format compact
xyData=[29.7    0.24692
34.65    0.25383
39.6    0.25306
44.55    0.28334
54.45    0.38257
64.35    0.55864
72.27    0.56325
84.15    0.60801
100.98    0.62799
133.65    0.70739
183.15    0.78583
217.8    0.81772
232.65    0.84225
287.1    0.87904];
X = xyData(:,1);
m = size(X,1); %Determina el numero de puntos
Y=xyData(:,2);
problema = (['Regresion no lineal']);
var_dep = ['Sigma'];
var_indep = ['V_D'];
parm = [1 90]; % valores iniciales de los parametros
npar = size(parm,2); % Determina el nuenmro de parametros
options = optimset('MaxFunEvals',1000); % Cambia los valores de la funcion
MaxFunEvals
Beta = fminsearch(@sigma,parm,options,X,Y); % Encuentra los valores optimos
usando la fncion fminsearch
[f,Ycalc] = sigma(Beta,X,Y); % Calcula los valores de Y (Ycal)
disp([' Results,' problema]);
Res = [];
for i=1:npar
    Res=[Res; i Beta(i)];
end
disp(' Valor de los parametros ');
disp(Res);
plot(X,Ycalc,'r-',X,Y,'b+' ) %grafica los valores experimentales de y y los
valores calculados
xlabel([var_indep])
ylabel([var_dep])
function [f,Ycalc]=sigma(parm,X,Y) % Define la funcion de Sigma
sm=parm(1);
k=parm(2);
% c=parm(3);
for i=1:size(X,1);
Ycalc(i,1)= sm*X(i)/(k + X(i));
end
resid(:,1)=Y-Ycalc;
f=resid'*resid;

```