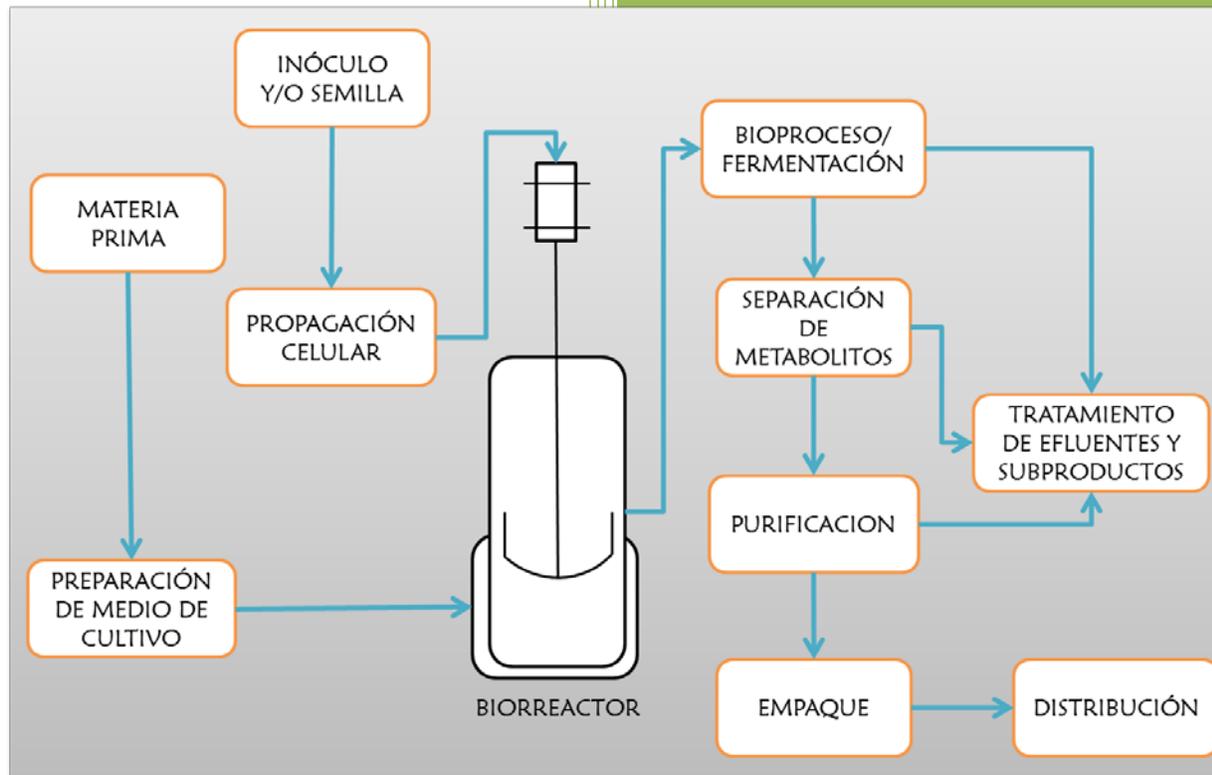




# APUNTES IMPRESOS

## DISEÑO Y ESCALAMIENTO DE PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

LICENCIATURA DE BIOINGENIERÍA

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

## Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño

### Campus Ensenada

#### APUNTES IMPRESOS (Sección Biológica)

#### DISEÑO Y ESCALAMIENTO DE PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

Dra. Tatiana N. Olivares Bañuelos

tatiana.olivares@uabc.edu.mx

#### Encuadre

1. Presentación
2. Expectativas
3. Diagnóstico
4. Presentación del Curso
5. Acuerdos

#### MISIÓN DE LA UABC MISIÓN DE LA UABC

La UABC, como protagonista crítica y constructiva de la sociedad bajacaliforniana, tiene como misión promover alternativas viables para el desarrollo social, económico, político y cultural de la entidad y del país, en condiciones de pluralidad, equidad, respeto y sustentabilidad; y con ello contribuir al logro de una sociedad más justa, democrática y respetuosa de su medio ambiente, mediante:

- La formación integral, capacitación y actualización de profesionistas autónomos, críticos y propositivos, con un alto sentido ético y de responsabilidad social y ecológica, que les permita convertirse en ciudadanos plenamente realizados, capaces de insertarse exitosamente en la dinámica de un mundo globalizado, y de enfrentar y resolver de manera creativa los retos que presenta su entorno actual y futuro
- La generación de conocimiento científico y humanístico, así como de aplicaciones y desarrollos tecnológicos pertinentes al desarrollo sustentable de Baja California, de México y de las demás naciones

- La creación, promoción y difusión de valores culturales y de expresiones artísticas, así como la divulgación de conocimiento, que enriquezcan la calidad de vida de los habitantes de Baja California, del país y del mundo en general

## **MISIÓN DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO**

La misión de la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño, es mejorar la calidad de vida de la entidad y del país, siendo un factor de desarrollo social, económico, político y cultural a través de:

- I. La formación integral de talento humano competente, capaz de desenvolverse en escenarios internacionales de la ingeniería, arquitectura y el diseño con un alto sentido de responsabilidad social y ambiental;
- II. La generación de conocimiento, su aplicación y extensión por medio de la reflexión continua, utilizando tecnología de vanguardia, dentro de un contexto de valores éticos, y
- III. El fomento y apoyo a la innovación tecnológica pertinente, privilegiando las necesidades regionales

## **PROPÓSITO GENERAL DEL CURSO**

El propósito general del curso es describir los conceptos biológicos y de diseño de birreactores para llevar a cabo el escalamiento a nivel industrial de procesos biotecnológicos.

## **COMPETENCIAS DEL CURSO**

Realizar el diseño de bioprocesos mediante la integración de principios biológicos y de ingeniería para llevar a cabo el escalamiento en proyectos de producción bioindustrial con una visión que integre la técnica, la ciencia y los negocios con una actitud de responsabilidad y compromiso social.

## **ACREDITACIÓN**

Obtener una calificación mínima de 80 en el promedio total, de lo contrario presentar un examen ordinario y obtener una calificación mínima de 60.

## **EVIDENCIAS DE DESEMPEÑO**

1. Presentación de exámenes parciales

2. Desarrollo de temas para exponer ante el grupo
3. Portafolio de resolución de problemas de medición, tanto en talleres como tareas

## **EVALUACIÓN DE ACUERDO ART. 76 EE-UABC**

El curso sería evaluado conforme al artículo 76 del Estatuto Escolar de la UABC ([http://sriagral.uabc.mx/Externos/AbogadoGeneral/index\\_htm\\_files/ESTATUTOESCOLARUABC\(REFORMASDEOCTUBRE2014\).pdf](http://sriagral.uabc.mx/Externos/AbogadoGeneral/index_htm_files/ESTATUTOESCOLARUABC(REFORMASDEOCTUBRE2014).pdf) )

ARTÍCULO 76. Las unidades de aprendizaje que no son susceptibles de medición cuantitativa y aquellas que por su naturaleza sean actividades académicas predominantemente prácticas, según lo determinen los planes de estudio, se evaluarán de conformidad con las reglas siguientes:

- I. El resultado de la evaluación se obtendrá siguiendo los criterios de evaluación señalados en el artículo 67, y
- II. Cuando el resultado no sea aprobatorio, el alumno se deberá inscribir nuevamente en la misma unidad de aprendizaje. En caso de no acreditarse por segunda ocasión, sólo podrá hacerlo mediante el examen de regularización en la modalidad de evaluación permanente
  1. Criterios de evaluación al inicio de clases, incluyendo los porcentajes que serán otorgados por la presentación de avance de proyecto, y momentos durante el ciclo escolar en que se realizarán las revisiones
  2. Deberá ser considerada una evaluación integral (como se establece en el artículo 68), incluyendo la realización del proyecto
  3. No se aplican exámenes tipo ordinario y extraordinario, la calificación de examen ordinario, se determina por la realización del proyecto. El alumno podrá exentar el curso, si cumple con el criterio de calificación mínima aprobatoria obtenida como resultado de la evaluación durante el período de clases (como se indica en la última parte del artículo 68)
  4. Se conservarán evidencias de las revisiones de avance de proyecto
  5. En el caso de que los alumnos no exenten el curso, la fecha límite de entrega de proyecto, para que los alumnos sean evaluados, sería la fecha en que se calendariza el examen tipo ordinario
  6. La calificación tipo ordinario, será determinada exclusivamente por la calificación que obtenga el estudiante por la realización del proyecto (ya no deben ser consideradas evaluaciones parciales, u otras calificaciones obtenidas durante el período de clases)

## **METODOLOGÍA DE TRABAJO**

- Exposición de temas teóricos por parte del educador utilizando material de apoyo en PowerPoint

- Discusión en comunidad de investigación
- Desarrollo de tareas y trabajos de investigación
- Lecturas en clase y extraclase

## **EVALUACIÓN PARCIAL**

- Exámenes parciales – 60%
- Tareas individuales por unidad – 10%
- Presentación Oral – 10%
- Laboratorio (Proyecto) – 20%

## **LIBROS DE REFERENCIA**

- Scheper, T. (2013). Measurement, Monitoring, Modelling and Control of Bioprocess. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 132.
- Clark, K. (2013). Bioprocess Engineering, An introductory engineering and life science approach. Woodhead Publishing, Cambridge CB22 3HJ, UK.
- Mukhopadhyay, S. (2008). Process Biotechnology Fundamentals. Electric Press, New Delhi.
- Kompala, D.S. (2007). Bioprocess Engineering Fundamentals And Applications. CPR.
- Fogler H.S. Elements of Chemical Reaction Engineering, Prentice Hall, New Jersey.
- Eibl, R. (2008). Cell and tissue reaction engineering. Principles and practice series. New York: Springer.
- Kragl, U. (2005). Technology Transfer in Biotechnology From Lab to Industry to Production.
- Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 92. Springer E-Books. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH. 136

## **Unidades**

1. Principios de diseño de bioprocesos
  - Producción de proteínas recombinantes y metabolitos en fábricas celulares
  - Monitoreo de bioprocesos
  - Herramientas de bioingeniería para diseño molecular
2. Producción a gran escala: escalamiento
  - Escalamiento de procesos biotecnológicos
3. Diseño de biorreactores
  - Biorreactores en bioprocesamiento de células
4. Operaciones unitarias
  - Recuperación celular

- Asepsia y esterilidad en bioprocesos
- Esterilización de medios

## **Formulación de Medios de Cultivo**

### **MEDIOS DE CULTIVO**

Es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de microorganismos, células o tejidos; es un soporte que proporciona sustancias nutritivas que permitan el desarrollo y/o reproducción.

Es toda preparación artificial, sólida, semisólida o líquida que suministra cada una de las sustancias fundamentales, una fuente de energía y condiciones ambientales adecuadas para la síntesis y mantenimiento del protoplasma celular.

- La diversidad metabólica de los microorganismos, células o tejidos es enorme, lo mismo que la variedad de medios de cultivo
- No existe un medio de cultivo universal adecuado para todos los organismos
- El conocimiento de las necesidades nutritivas y físicas de los organismos celulares es fundamental para seleccionar un medio de cultivo adecuado
- Los requisitos que debe reunir el cultivo tienden a reproducir el ambiente natural en el que se desarrollan

### **Clasificación de los medios de cultivo**

1. Por su estado físico. Depende de la inclusión o no de un agente solidificante
  - A. Sólidos (permiten el aislamiento y observación de colonias) 1.5-2% de agar
  - B. Semisólidos, 0.5 % de agar
  - C. Líquidos (no permiten el aislamiento de colonias), no contiene agar
  - D. Bifásicos, contiene fase sólida y fase líquida
2. Por su origen. Depende de que la fórmula se pueda describir químicamente con precisión
  - A. Naturales, se preparan a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal; existen como tales en la naturaleza (agua, suero, papa, huevos, leche, sangre, tierra, etc.)
  - B. Sintéticos o químicamente definidos, se conoce exactamente su composición química (solución de sales); generalmente se usan para cultivar organismos fototrofos y quimiolitotrofos
  - C. Vivos, contienen células u organismos vivos (células de riñón de mono, huevos embrionados, etc.)
3. Por su composición. Se desconoce su composición química exacta, tiene extractos de tejidos vegetales, animales o microbianos, cuya concentración no se conoce con exactitud

- A. Comunes, fórmula nutritiva básica que permite el crecimiento de microorganismos poco exigentes
  - B. Enriquecidos, mejoran su calidad nutritiva por el agregado de componentes muy ricos en nutrientes como leche, sangre, huevo, líquido ascítico, extracto proteico de cianobacterias, etc.; se utilizan en el cultivo de bacterias exigentes (caldo carne y agar carne)
4. Por su función
- A. Medios de enriquecimiento, medios líquidos que favorecen la multiplicación de ciertos grupos e inhiben el desarrollo de las especies restantes
  - B. Medios selectivos, permiten el desarrollo de ciertos microorganismos e impiden el desarrollo de otros; la selectividad se logra alterando las condiciones físicas del medio de cultivo o agregando inhibidores (agar sangre y el agar chocolate) compuestos químicos
  - C. Medios diferenciales, permiten demostrar características metabólicas de un determinado grupo de microorganismos (eosina azul de metileno)
  - D. Medios de transporte, se usan cuando transcurre cierto tiempo entre la toma de una muestra y su procesamiento; incluye compuestos que aseguran la supervivencia de las células hasta que sean sembradas en un medio de cultivo adecuado

### **Composición química de los medios de cultivo**

Un medio de cultivo está integrado por:

1. Elementos energéticos y constitutivos
  1. Macroelementos (g/l)
    - i. Fuente de carbono, puede ser CO<sub>2</sub> o compuestos orgánicos (hexosas, pentosas, disacáricos, alcoholes, etc.)
    - ii. Fuente de nitrógeno, muchos organismos pueden crecer utilizando moléculas sencillas como NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>3</sub> ó N<sub>2</sub>; otros microorganismos incorporan nitrógeno en forma de aminoácidos, bases púricas o pirimídicas
    - iii. Fuente de fósforo, se agregan fosfatos de sodio o potasio que también confieren poder buffer al medio de cultivo
    - iv. Fuente de azufre, se adiciona como SO<sub>4</sub><sup>=</sup>, cisteína o metionina
    - v. Fuente de calcio, magnesio y potasio: se adicionan como sales inorgánicas; son cationes que estabilizan macromoléculas aniónicas
    - vi. Fuente de sodio, se suministrar como NaCl y el sodio contribuye a equilibrar la presión osmótica del medio extracelular
  2. Microelementos o trazas (mg ó µg/mL), naturalmente presentes como contaminantes de los macroelementos
    - i. Frecuentemente esenciales
      - o Mn – estimula el crecimiento, favorece la esporulación

- Fe – cofactor de enzimas para la función respiratoria en citocromos, catalasa y flavoproteínas; favorece la síntesis de toxina diftérica
    - Co – interviene en la síntesis de vitamina B12
    - Cu – presente en oxidasa terminal de cadena respiratoria
  - ii. Esenciales en casos especiales –B,Al, Si,V, As, Se,Mo, Sn,Be, F, etc.
  - iii. Inhibidores del crecimiento – Au, Ag, Cd, Cr, Pb, y cualquier microelemento a concentración mayor que 10<sup>-4</sup>M puede resultar tóxico para el desarrollo de los microorganismos
2. Factores de crecimiento. Son compuestos orgánicos específicos requeridos en muy bajas concentraciones que no pueden ser sintetizados por la célula que los necesita
- a. Extractos, Proviene de ciertos órganos o tejidos animales o vegetales (carne, hígado, semillas, etc.) que son extraídos con agua y calor, y concentrados hasta la forma final de pasta o polvo
    - i. Extracto de carne, es complemento vitamínico de las peptonas y aporta sustancias nitrogenadas; la calidad de este extracto varía con la carne empleada, el tiempo y la temperatura de extracción
  - b. Peptonas, mezclas complejas de compuestos orgánicos nitrogenados y sales minerales que carecen de identidad química definida; se obtienen por digestión enzimática o química de proteínas animales o vegetales (soja, carne, gelatina, caseína, etc.)
  - c. Fluidos Corporales, sangre completa, sangre desfibrinada, plasma o suero sanguíneo, añadidos para el cultivo de algunos patógenos
3. Agentes solidificantes. Su agregado al medio de cultivo es opcional
- a. Agar, agente gelificante para dar solidez; compuesto de un polisacárido que se obtiene de ciertas algas marinas
  - b. Agarosa, transparente y libre de sulfatos; se usa para Inmunología y Biología Molecular
  - c. Silicagel, es silicato diluido en HCl; se emplea cuando debe excluirse materia orgánica del medio de cultivo
  - d. Gelatina, proteína obtenida por hidrólisis del colágeno; fue el primer solidificante usado en Microbiología, pero es degradado por la mayoría de las bacterias (lo comen, por lo que el medio inicialmente sólido termina convertido en medio líquido) y la temperatura de incubación no puede ser mayor a 22°C
  - e. Albúmina de huevo – suero, a 80°C estas proteínas coagulan y solidifican el medio de cultivo
4. Agua destilada o desionizada. Los medios de cultivo se preparan en el laboratorio con agua destilada lo que estandariza su composición y asegura la ausencia de iones como Ca<sup>2+</sup> yMg<sup>2+</sup> que pueden precipitar con fosfatos o generar reacciones indeseables
5. Factores reguladores
- a. Sistemas amortiguadores, para mantener el pH dentro del rango óptimo de crecimiento

- b. Indicadores de pH, indicadores ácido-base para detectar variaciones del pH
- c. Agentes reductores, cisteína, tioglicolato y otros son agentes reductores que se añaden gérmenes microaerófilos o anaerobios
- d. Agentes selectivos, la adición de determinadas sustancias lo convierte en selectivo, cristal violeta, sales biliares, azida sódica, telurito potásico, antibióticos, etc.

### **Condiciones físicas de un medio de cultivo**

1. Niveles de oxígeno, las bacterias requieren diferentes niveles
2. Temperatura, cada especie tiene una temperatura óptima de crecimiento
3. Presión osmótica, la mayoría de las bacterias crece en 0.1-1% de NaCl
4. Humedad, todas bacterias necesitan un ambiente más húmedo que los hongos
5. Luz, es importante para los microorganismos fotosintéticos
6. pH, la mayoría de las bacterias crece en medio neutro o ligeramente alcalino (7–7.6); los hongos crecen a pH menor que 7

### **Cultivos**

Son las poblaciones de microorganismos que se obtienen en los medios de cultivo. Pueden ser:

- a. Puros o axénicos, cuando la población está constituida por una única clase de microorganismos
- b. Mixtos, cuando la población está constituida por más de una clase de microorganismos

### **Consideraciones para preparar un medio de cultivo adecuado**

1. Tipo trófico – requerimientos de carbono y energía
  - Autótrofos (producen su masa celular y materia orgánica a partir del dióxido de carbono, como única fuente de carbono)
  - Heterótrofos (deben alimentarse con las sustancias orgánicas sintetizadas por otros organismos)
  - Quimiotrofos (litotrofos u organotrofos) (obtienen energía a partir de sustancias químicas y utilizan como donadores de electrones compuestos inorgánicos u orgánicos)
  - Fotótrofos (la energía se obtiene de la luz)
2. Tipo respiratorio
  - Aerobios
  - Anaerobios
  - Anaerobios facultativos
  - Microaerófilos

3. Temperatura óptima de crecimiento
  - Psicrófilos (óptima 0°C – 5°C; hasta 25°C)
  - Mesófilos (óptima 37°C; 25°C– 40°C)
  - Termófilos (óptima >40°C)

4. Rango de pH

Mayoría de las bacterias 6.6 – 7.2

### **Preparación de medios de cultivo**

La mayoría de los medios de cultivo se encuentran comercializados, normalmente como liofilizados que es preciso rehidratar. En general, la preparación de un medio de cultivo se reduce a pesar la cantidad deseada del mismo y disolverla en agua destilada, siguiendo las instrucciones del fabricante y luego esterilizarlo.

En caso que el medio de cultivo debamos hacerlo nosotros, la preparación comienza por hacer un estudio de la fórmula que constituye una receta que deberá respetarse estrictamente. Primero se agrega agua destilada o desionizada a un recipiente, luego se van incorporando todos los ingredientes de la lista en el orden en el que se encuentran (primero el amortiguador como el PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K). Disolver los ingredientes, enfriar y medir pH (se ajusta con CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> (1N) o ClH (1N)).

### **Características generales de un buen medio de cultivo**

Un buen medio provee los nutrientes indispensables en la concentración adecuada, cantidad necesaria de sales y agua, que tenga la consistencia y el pH correctos, que sea estéril y que no contenga sustancias inhibitorias.

La provisión de elementos nutritivos en concentración adecuada, depende del conocimiento que se tenga de las condiciones del desarrollo en el hábitat natural. La cantidad de sales y agua que se agregue a un medio de cultivo, se relaciona directamente con el pH, la fluidez y la presión osmótica que se le quiera brindar a los microorganismos.

## **ASEPSIA Y ESTERILIDAD EN BIOPROCESOS**

### **Asepsia y Esterilidad**

Asepsia –(Delfr. asepsie).

1. f. Med. Ausencia de materia séptica, estado libre de infección.
2. f. Med. Conjunto de procedimientos científicos destinados preservar de gérmenes infecciosos el organismo, aplicados principalmente a la esterilización del material quirúrgico.

Real Academia Española ©

Esterilidad –(Dellat. sterilitas, -atis).

1. f. Cualidad de estéril. Estéril –(Dellat. sterilis).
4. adj. Med. Libre de gérmenes patógenos.

Real Academia Española ©

### **Asepsia y esterilidad en bioprocesos**

#### **Conceptos**

Esterilización – eliminación o muerte de todos los microorganismos que contiene un objeto o sustancia, y que se encuentran acondicionados de tal forma que no pueden contaminarse nuevamente.

Sanitizante – agente que disminuye la carga microbiana total a un nivel el cual es seguro para la salud de la población. Sólo es aplicable sobre objetos inanimados.

Desinfectante – agente que elimina la carga microbiana total en superficies inanimadas tales como habitaciones.

Antiséptico – agente que controla y reduce la presencia de microorganismos potencialmente patógenos sobre piel y/mucosas (sólo pueden aplicarse externamente sobre seres vivos).

## **Esterilización**

Es un proceso a través del que se logra la destrucción total de los microorganismos viables presentes en un determinado material. Existen muchos procesos que requieren la utilización de materiales estériles:

- La esterilización de equipos quirúrgicos y otros materiales de uso médico
- Acondicionamiento de material (pipetas, tubos, placas de Petri, pinzas, etc.) de laboratorio
- Preparación de medios de cultivo (cultivo de microorganismos, control de ambiente, equipos o personal, análisis microbiológico de medicamentos, cosméticos, alimentos, etc.)
- La descontaminación de material utilizado

Existen diversos métodos de esterilización. La selección del método a aplicar está determinada por el tipo de producto a esterilizar.

1. Agentes Físicos
  - a. Calor
    - Húmedo (autoclave)
    - Seco (horno)
  - b. Radiaciones
2. Agentes Mecánicos
  - a. Filtración
3. Agentes Químicos
  - a. Gaseosos
    - Óxido de etileno
  - b. No Gaseosos
    - Aldehídos (glutaraldehído)
    - Ácido peracético
    - Peróxido de hidrógeno

## **Agentes antibacterianos**

1. Provocan pérdida de la viabilidad en los microorganismos
  - Físicos (calor, radiaciones)
  - Químicos (óxido de etileno, formaldehído, agentes oxidantes, soluciones antisépticas)
2. Provocan una separación de los microorganismos de la sustancia líquida
  - Filtración (se eliminan los microorganismos presentes en un fluido)

## Agentes Físicos

a. **CALOR.** El calor es el método de esterilización por excelencia siempre y cuando el material a esterilizar soporte altas temperaturas sin sufrir ningún tipo de daño. Todos los microorganismos son susceptibles, en distinto grado, a la acción del calor. El calor provoca desnaturalización de proteínas, fusión y desorganización de las membranas y/o procesos oxidativos irreversibles en los microorganismos. La efectividad del calor como método de esterilización depende de:

- Temperatura
- Tiempo de exposición

El calor se puede aplicar como agente esterilizante de dos formas:

- Calor húmedo – destruye a los microorganismos por desnaturalización de las proteínas
- Calor seco – destruye a los microorganismos por oxidación de sus componentes celulares

### Calor húmedo

El calor húmedo produce desnaturalización y coagulación de proteínas principalmente por dos razones:

- 1) El agua es una especie química muy reactiva y muchas estructuras biológicas (DNA, RNA, proteínas, etc.) son producidas por reacciones que eliminan agua. Reacciones inversas podrían dañar a la célula a causa de la producción de productos tóxicos. Las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas se estabilizan mediante uniones puente de hidrógeno intramoleculares que pueden ser reemplazadas y rotos por el agua a altas temperaturas.
- 2) El vapor de agua posee un coeficiente de transferencia de calor mucho más elevado que el aire. Los materiales húmedos conducen el calor mucho más rápidamente que los materiales secos debido a la energía liberada durante la condensación.

La autoclave es el aparato más comúnmente utilizado en los laboratorios para esterilizar cultivos y soluciones que no formen emulsiones con el agua y que no se desnaturalicen a temperaturas mayores a 100 °C .

Una temperatura de 121 °C (una atmósfera de sobrepresión) con un tiempo de exposición mayor a 15 minutos sirve para destruir organismos formadores de esporas.

Ventajas:

- Rápido calentamiento y penetración
- Destrucción de bacterias y esporas en corto tiempo
- No deja residuos tóxicos
- Hay un bajo deterioro del material expuesto
- Económico

**Desventajas:**

- No permite esterilizar soluciones que formen emulsiones con el agua
- Es corrosivo sobre ciertos instrumentos metálicos

**Calor seco**

Produce desecación de la célula, efectos tóxicos por niveles elevados de electrolitos, procesos oxidativos y fusión de membranas. Estos efectos se deben a la transferencia de calor desde los materiales a los microorganismos que están en contacto con éstos. El aire es mal conductor del calor, y el aire caliente penetra más lentamente que el vapor de agua en materiales porosos. La acción destructiva del calor sobre proteínas y lípidos requiere mayor temperatura cuando el material está seco o la actividad de agua del medio es baja. Esto se debe a que las proteínas se estabilizan mediante uniones puente de hidrógeno intramoleculares que son más difíciles de romper por el calor seco.

La estufa de esterilización es el artefacto utilizado en los laboratorios para esterilizar por calor seco. Se requiere mayor temperatura y tiempo de exposición que el autoclave. La temperatura varía entre 120° y 180°C, requiriéndose distintos tiempos de exposición. A 140°C se necesitan por lo menos 5 horas de exposición, mientras que a 160°C se requieren al menos 2 horas de exposición. Sirve para esterilizar material de vidrio. El papel y el algodón no pueden ser esterilizados a más de 160°C .

**Ventajas:**

- No es corrosivo para metales e instrumentos
- Permite la esterilización de sustancias en polvo y no acuosas, y de sustancias viscosas no volátiles

**Desventajas:**

- Requiere mayor tiempo de esterilización, respecto al calor húmedo, debido a la baja penetración del calor

Existen otras formas de eliminar microorganismos por calor seco. La incineración se utiliza para destruir material descartable contaminado. La acción directa de la llama elimina a los

microorganismos cuando se lleva al rojo el material de metal como ansas, lancetas, agujas de disección.

- b. **RADIACIÓN.** La radiación, o emisión y propagación de la energía a través de un medio, puede ser utilizada como agente para la eliminación de microorganismos. Su acción depende de:
- Tipo de radiación
  - Tiempo de exposición
  - Dosis

**Radiaciones ionizantes** – se pueden utilizar para la esterilización de materiales termolábiles, como materiales plásticos (rayos  $\alpha$ ,  $\beta$ ). Producen iones y radicales libres que alteran las bases de los ácidos nucleicos, estructuras proteicas y lipídicas, y componentes esenciales de los microorganismos para la viabilidad. Tienen gran penetrabilidad y se las utiliza para esterilizar materiales termolábiles (termosensibles) como jeringas descartables, sondas, etc. Se utilizan a escala industrial por sus costos. No se utilizan para medios de cultivo o soluciones proteicas porque producen alteraciones de los componentes.

**Radiaciones no ionizantes** – puede ser empleada en el control de áreas cerradas (luz ultravioleta). Afectan a las moléculas de DNA de los microorganismos debido a que forman dímeros de pirimidinas adyacentes que inducen errores en la duplicación y por lo tanto la pérdida de la viabilidad de las células. Son escasamente penetrantes y se utilizan para superficies

### **Agentes Mecánicos**

- a. **FILTRACIÓN.** Permite la remoción de todos los microorganismos presentes en un líquido, o un gas, reteniéndolos sobre la superficie de un material. Se usan membranas filtrantes con poros de un tamaño determinado. El tamaño del poro dependerá del uso al que se va a someter la muestra. Hay que tener en cuenta que los filtros que se utilizan generalmente en los laboratorios no retienen virus ni micoplasmas, estos últimos están en el límite de separación según el diámetro de poro que se utilice.

Existen tres tipos básicos de filtros:

1. Filtros profundos o Filtros de profundidad – consisten de un material fibroso o granular prensado, plegado, activado, o pegado dentro de los canales de flujo. En este tipo de filtros la retención de las partículas se produce por una combinación de absorción y de retención mecánica en la matriz.

2. Membranas filtrantes – tienen una estructura continua, y la retención se debe principalmente al tamaño de la partícula. Partículas más pequeñas al tamaño del poro quedan retenidas en la matriz del filtro debido a efectos electrostáticos.
3. Filtros de huella de nucleación (Nucleoporo) – son películas muy delgadas de policarbonato que son perforadas por un tratamiento conjunto con radiación y sustancias químicas. Son filtros con orificios muy regulares que atraviesan la membrana verticalmente. Funcionan como tamices, evitando el paso de toda partícula con un tamaño mayor al del poro. Se utiliza para emulsiones oleosas o soluciones termolábiles. Su uso para esterilizar aceites, algunos tipos de pomadas, soluciones oftálmicas, soluciones intravenosas, drogas diagnósticas, radiofármacos, medios para cultivos celulares, y soluciones de antibióticos y vitaminas.

### **Agentes Químicos**

Algunas sustancias químicas pueden ser usadas como agentes esterilizantes porque tienen la capacidad de promover una o más reacciones químicas capaces de dañar los componentes celulares de los microorganismos (proteínas, membranas, etc.). Dentro de los compuestos químicos podemos encontrar agentes esterilizantes, desinfectantes y antisépticos. La efectividad de estos agentes depende de las condiciones bajo las que actúan.

**Concentración** – varía con el tipo de agente y de microorganismo, una misma concentración del agente puede producir un efecto diferente en distintos microorganismos.

**Tiempo** – los microorganismos no son susceptibles a un agente en la misma forma, por lo que no todos los microorganismos mueren al mismo tiempo.

**pH** – afecta tanto a los microorganismos como a los agentes químicos. El aumento de pH >7 incrementa la carga negativa de los microorganismos afectando la concentración del agente sobre la célula. El pH determina el grado de disociación y la permeabilidad, a menor disociación mayor efectividad del agente químico.

- a. NO GASEOSOS. Lesionan la membrana celular de los microorganismos y desnaturalizan proteínas celulares. Desorganizan la estructura fosfolipídica. No destruyen esporas y tienen una acción germicida lenta
  - o Antisépticos
    - i. Alcoholes. Los alcoholes de cadena corta tienen un efecto nocivo mayor que los de cadena larga. Se utilizan en concentraciones del 50 al 70%. Los más utilizados son el etanol e isopropílico
    - ii. Iodo. Es un agente oxidante que modifica grupos funcionales de proteínas y ácidos nucleicos. Inactiva proteínas y enzimas por oxidación de los grupos -SH a S-S, pudiendo atacar también grupos amino, indoles, etc. Se utiliza como desinfectante de la piel (tintura de iodo: yodo molecular 2% y yoduro de sodio 2% en alcohol),

- irritante. Es efectivo contra esporas en una concentración de 1600 ppm de yodo libre
- iii. Agentes iónicos y anfóteros. Son sustancias que lesionan la membrana celular ya que desordenan la disposición de las proteínas y de los fosfolípidos, se liberan metabolitos desde la célula, interfiere con el metabolismo energético y el transporte activo. No son esporicidas ni tuberculicidas aún en altas concentraciones. Sus principales ventajas se hallan en que son inodoros, no tiñen, no son corrosivos de metales, estables, no tóxicos y baratos
  - iv. Catiónicos: Sales de amonio cuaternarias. Tienen mayor actividad a pH alcalino y los Gram + son más susceptibles
  - v. Aniónicos: Jabones y ácidos grasos. Tienen mayor actividad a pH ácido y son eficaces contra Gram +
  - vi. Anfóteros: Actúan como catiónicos o aniónicos según el pH
  - vii. Organo Mercuriales. Estos tipos de compuestos se combinan con los grupos -SH de las proteínas, inactivando enzimas. Dentro de los mercuriales orgánicos se encuentran el metafen y el mertiolate
  - viii. Peróxido de hidrógeno. Es un antiséptico débil, con capacidad oxidante y formadora de radicales libres. Actualmente, el peróxido de hidrógeno gaseoso se está utilizando como desinfectante de superficies o descontaminante de gabinetes biológicos, ya que no posee las propiedades tóxicas y cancerígenas del óxido de etileno y formaldehído
  - ix. Colorantes. Interfieren en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (acridina) o interfieren en la síntesis de la pared celular (derivados del trifenilmetano). La acridina se inserta entre dos bases sucesivas del DNA separándolas físicamente. Esto provoca errores en la duplicación del DNA. Los derivados del trifenilmetano (violeta de genciana, verde de malaquita y verde brillante) bloquean la conversión del ácido UDP-acetilmurámico en UDP acetilmuramil-péptido
- o Desinfectantes y/o esterilizantes
    - i. Cloro. El cloro, los hipocloritos y las cloraminas son desinfectantes que actúan sobre proteínas y ácidos nucleicos de los microorganismos. Oxidan grupos -SH, y atacan grupos aminos, indoles y al hidroxifenol de la tirosina. El producto clorado más utilizado en desinfección es el hipoclorito de sodio (agua lavandina), que es activo sobre todas las bacterias, incluyendo esporas, y además es efectivo en un amplio rango de temperaturas. La actividad bactericida del hipoclorito de sodio se debe al ácido hipocloroso (HClO) y al Cl<sub>2</sub> que se forman cuando el hipoclorito es diluido en agua. La actividad germicida del ion hipocloroso es muy reducida debido a que por su carga no puede penetrar fácilmente en la célula a través de la membrana citoplasmática. El ácido hipocloroso es neutro y penetra fácilmente en la célula, mientras que el Cl<sub>2</sub> ingresa como gas. El hipoclorito de sodio se comercializa en soluciones concentradas (50-100 g/L de cloro activo), a pH alcalino y en envases oscuros que favorecen su estabilidad, pero es inactivo como

desinfectante (por esto deben utilizarse soluciones diluidas en agua corriente, que tiene un pH ligeramente ácido, con el objeto de obtener ácido hipocloroso). Generalmente se utilizan soluciones con una concentración de 0.1-0.5% de cloro activo. Su actividad está influida por la presencia de materia orgánica, pues puede haber en el medio sustancias capaces de reaccionar con los compuestos clorados que disminuyan la concentración efectiva de éstos

- ii. Aldehídos. Son agentes alquilantes que actúan sobre proteínas, lo que provoca modificación irreversible de enzimas e inhibición de la actividad enzimática (adición nucleofílica de grupos  $-NH_2$  y  $-SH$ ). Se utilizan como desinfectantes y esterilizantes. Destruyen esporas. El glutaraldehído es el único esterilizante efectivo en frío. El formaldehído como gas se utiliza para descontaminar edificios, ambientes, etc.; se obtiene por calentamiento del paraformaldehído ( $(CH_2O)_n$ ), lo que produce la despolimerización de este compuesto y la liberación de formaldehído. El formaldehído tiene la desventaja de ser muy irritante y pierde actividad en ambientes refrigerados
- iii. Compuestos fenólicos. Son desinfectantes que provocan lesiones en la membrana citoplasmática porque desordenan la disposición de las proteínas y fosfolípidos. Esto causa filtración de compuestos celulares, inactivación de enzimas y lisis. El fenol no es usado a menudo como desinfectante por su olor desagradable, por ser muy irritante y por el residuo que queda luego de tratar las superficies. Los derivados del fenol más utilizados son el hexaclorofeno (compuesto difenílico) y los cresoles (alquil fenoles). Son muy efectivos a bajas concentraciones contra formas vegetativas de bacterias. No son efectivos contra esporas
- iv. Óxido de etileno. Es un agente alquilante que se une a compuestos con hidrógenos lábiles como los que tienen grupos carboxilos, amino, sulfhidrilos, hidroxilos, etc. Es utilizado en la esterilización gaseosa, generalmente en la industria farmacéutica. Sirve para esterilizar material termosensibles como el descartable y plástico, equipos electrónicos, bombas cardiorrespiratorias, etc. Es muy peligroso por ser altamente inflamable y explosivo, y además cancerígeno

## Control del proceso de esterilización

Todos los procesos de esterilización se deben controlar para asegurar que han sido efectivos. Se pueden utilizar indicadores físicos, químicos y/o biológicos, los cuales deben ser colocados en cada carga de esterilización.

- Son controles que se realizan sobre el método de esterilización
- Monitorean o controlan si el proceso de esterilización funciona correctamente

Se clasifican en:

### 1. Indicadores físicos

- Medidores de presión y los termómetros. Permiten constatar las condiciones físicas dentro de la cámara de esterilización
- Termógrafos. Además de registrar la temperatura alcanzada en el proceso, permiten conocer durante cuánto tiempo ésta se mantuvo

## **2. Indicadores fisicoquímicos**

- Termocuplas: son métodos directos que registran la temperatura a la que se desarrolla la esterilización
- Sustancias de punto de fusión conocido: se utilizan en autoclaves generalmente, son sustancias con un punto de fusión similar al de la temperatura de esterilización del proceso. Estas sustancias están mezcladas con un colorante y al fundir indican si se alcanzó la temperatura óptima de esterilización y el tiempo que se mantuvo

## **3. Indicadores químicos**

La mayoría son cintas adhesivas que se adhieren al material a esterilizar. Las cintas están impregnadas con una sustancia química que cambia de color cuando el material ha sido sometido al proceso de esterilización. Este tipo de cintas no son completamente confiables debido a que muchas veces sólo indican que se llegó a la temperatura deseada, pero no indican por cuánto tiempo ésta se mantuvo.

Existen cintas diseñadas de manera que el cambio de color es progresivo, estas cintas son un poco más seguras porque permiten estimar el tiempo de esterilización.

## **4. Indicadores biológicos**

Con este tipo de indicadores se controlan la esterilización por vapor a presión, por calor seco y la esterilización con óxido de etileno. Son preparaciones de una población específica de esporas de un microorganismo, las cuales son altamente resistentes.

Se colocan junto con la carga de esterilización, en el sitio que se considera que es más difícil que llegue el vapor y después se deben incubar durante 24 horas en condiciones adecuadas. Si después de este periodo hay evidencia de crecimiento microbiano (cambio de color del medio de cultivo), el proceso de esterilización no fue satisfactorio.

Son preparaciones estandarizadas de microorganismos relativamente resistentes al método de esterilización que se emplea. Los indicadores se procesan en forma conjunta con el material a esterilizar y el número de microorganismos presentes en el indicador es mayor que el que se encuentra en el material. Una vez concluido el proceso de esterilización los indicadores son inoculados en medios de cultivo adecuados e incubados durante un determinado período de tiempo. Si el proceso de esterilización fue correctamente empleado y funciona bien no debe observarse desarrollo del indicador incubado.

Cuando se utilizan indicadores biológicos se debe verificar:

- Tipo de microorganismo
- Tipo de proceso de esterilización
- Número de lote
- Fecha de expiración
- Medio de cultivo utilizado
- Condiciones de incubación del indicador después de aplicado el proceso de esterilización
- Métodos de descontaminación para evitar la diseminación de esporas en el medio ambiente

Los controles de esterilidad permiten controlar en forma probabilística si el material quedó completamente esterilizado. Se muestrea un porcentaje representativo de todo el material.

### **Transferencia Directa a Medios de Cultivo**

Se transfiere una parte de la muestra a medios de cultivos apropiados que permitan el crecimiento de cualquier contaminante. Se utiliza Tioglicolato para anaerobios y aerobios (37°C ) y Trypticase-Soja para aerobios (25°C ). Las muestras representativas se incuban en estos medios durante un período de 14 días, al cabo del cual no se debe observar ningún tipo de crecimiento. Puede ocurrir que la muestra no se encuentre estéril pero que no se produzca crecimiento durante la incubación por algún motivo inherente al medio o a la muestra, por ejemplo presencia de algún inhibidor, etc.

### **Prueba de Promoción del Crecimiento**

Es un testigo del control de esterilidad. Son testigos que se utilizan para los medios de crecimiento del control ya que estos medios tienen capacidad de promover el crecimiento. Para estos testigos se utilizan microorganismos con exigencias nutricionales. Los medios deben ser inoculados con un bajo número de microorganismos, se incuban durante 7 días, al cabo de los que se debe observar un abundante crecimiento.

### **Prueba de Bacteriostasis**

Es un control que se realiza para determinar si la muestra supuestamente estéril no posee propiedades bacteriostáticas. Se previenen falsos negativos pues no se produce crecimiento habiendo en la muestra microorganismos viables. Se toman los medios de cultivo con microorganismos de ensayo y se siembran en las muestras a probar. Se incuban durante 7 días. Si se produce crecimiento esto indica que el material no contenía inhibidores.

### **Filtración por membranas**

Se utiliza para determinar la esterilidad de medios de cultivo, soluciones de antibióticos, etc. Se filtran los medios y se procesa el filtro como en un control de esterilidad para determinar si hay microorganismos presentes.

## Concepto estadístico

Cuando una población bacteriana es sometida a un proceso de esterilización que le provoca la pérdida de la viabilidad, se observa una disminución progresiva en el número de microorganismos sobrevivientes en función del tiempo de exposición al agente esterilizante. La muerte microbiana sigue un comportamiento de tipo exponencial, por lo que se hace asintótico y nunca se llega a un número de microorganismos igual a cero.

$$N = N_0 \cdot e^{-Kt}$$

Donde N es el número de microorganismos viables,  $N_0$  es el número de microorganismos viables iniciales, k es la tasa de muerte ( $\text{min}^{-1}$ ) y t es el tiempo de exposición al agente.

El coeficiente k es función de las condiciones de esterilización (temperatura, tenor de humedad, concentración del agente químico) y de la resistencia del microorganismo al proceso de esterilización.

Si esta ecuación se transforma a base 10 resulta:  $N = N_0 \cdot 10^{-t/D}$

En donde D (min)s se denomina Tiempo de reducción decimal, esto es el tiempo requerido para reducir la población microbiana un 90% o un orden de magnitud.

El valor de D se deduce cuando  $t=D$  y por lo tanto  $N=0.1 N_0$

Comparando las ecuaciones anteriores se llega a que:  $D = \ln 10 / K = 2.303 / K$

Esto significa que D está inversamente relacionado con k

Entonces, menores valores de D significan una mayor tasa de muerte o una muerte más rápida.

Graficando el logaritmo del número de microorganismos sobrevivientes en función del tiempo de exposición a un determinado agente esterilizante se obtiene una recta. La pendiente está dada por  $-1/D$  y la ordenada al origen es  $\log N_0$ .

Por lo explicado anteriormente, la pendiente de la recta está determinada por las condiciones de esterilización y de la resistencia del microorganismo.

Cuando el log del número de sobrevivientes es menor a cero se habla de probabilidad de sobrevivencia. Cuando el valor de la probabilidad sea  $-1$  significa que hay 0.1 microorganismos viables por unidad, o correctamente expresado una unidad contaminada por cada 10 unidades idénticas procesadas.

Un producto se considera estéril cuando la probabilidad de encontrar unidades contaminadas es menor o igual a  $10^{-6}$ , esto es una unidad contaminada cada millón de unidades idénticas procesadas. A mayor número de microorganismos y/o resistencia de la población se necesitará mayor tiempo de esterilización, o lo que es lo mismo mayor tiempo para alcanzar la probabilidad de sobrevivencia.

Durante el proceso de esterilización por calor debe tenerse en cuenta que el tiempo de esterilización comienza cuando se ha alcanzado la temperatura óptima en el interior del aparato (autoclave o estufa) y que generalmente el contenido de un autoclave puede requerir tiempos más largos para alcanzar la temperatura de esterilización.

### **Almacenamiento del material estéril**

Una vez que un material está estéril puede mantener esta condición si está protegido en la forma apropiada. La duración de la esterilidad de un material no está relacionada directamente con el tiempo, sino con factores que comprometen su exposición al medio ambiente.

Los materiales estériles pierden su esterilidad:

- Cuando se produce cualquier ruptura, accidental o no, del material que lo recubre durante su transporte o almacenamiento
- Al humedecerse el material de empaque
- Es importante no manipular los materiales estériles con las manos húmedas, ni colocarlos sobre superficies mojadas

Precauciones:

- Controlar el acceso a las áreas de almacenamiento de materiales estériles
- Mantener el área de almacenamiento limpia, libre de polvo, sucio e insectos
- Controlar la temperatura y la humedad de las áreas de almacenamiento
- La temperatura ideal debe estar por debajo de los 26°C y la humedad relativa entre 30 y 60%
- Los periodos prolongados de almacenamiento en lugares tibios y húmedos, pueden producir condensación de humedad sobre el material de empaque
- Utilizar, preferiblemente, estantes cerrados para colocar el material
- Dejar que los materiales que salen del horno o el autoclave alcancen la temperatura ambiente antes de ser almacenados; de esta forma se evita la condensación dentro del empaque

## **BIOPROCESO**

Es todo proceso industrial que involucra la manipulación de organismos vivos o sus componentes celulares para proveer bienes o servicios.

- Bienes: antibióticos, hormonas, fermentos, vacunas, ácidos orgánicos, amino ácidos, biocombustibles, biomasa, etc.
- Servicios: biorremediación, biolixiviación, tratamiento de efluentes

Son los procesos mediante los cuales determinados SUSTRATOS (nutrientes) son transformados por acción biológica (microorganismos, células, tejidos) en BIOMASA y diversos PRODUCTOS

### **Biocatalizador**

Glucosa + amonio + sales + oxígeno →BIOMASA + PRODUCTOS + calor

Moléculas sencillas →Moléculas complejas

Fuentes de carbono y energía, Antibióticos, drogas, vacunas, efluente fuente de Nitrógeno y sales tratado, vitaminas, ácidos orgánicos, aminoácidos, proteínas, hormonas

### **Biotransformación**

Son los procesos en los que sustratos naturales o sintéticos son MODIFICADOS por medio de una actividad enzimática.

Características de un Bioproceso:

- Uso de un catalizador biológico: enzima, microorganismos, células vegetales, células animales, células insecto, hongos filamentosos, algas, plantas y animales
- Uso de un biorreactor: la reacción ocurre en forma controlada
- Generación de un producto o servicio

Pre Proceso

- Elección del microorganismo u organismo celular
- Preparación de medio (formulación)

- Esterilización
- Preparación del inóculo

#### Proceso

- Elección del reactor
- Elección del sistema de operación: Batch, alimentado, sistema continuo, etc.
- Estequiometría y cinética
- Instrumentación y control

#### Post Proceso

- Recuperación del producto por medio de operaciones unitarias (físicas/químicas)
- Acondicionamiento y estabilización del producto
- Formulación del producto

### **Factores para el diseño y operación**

Los procesos biotecnológicos son cada vez más importantes en el desarrollo de nuevos productos. Los principales factores que intervienen en el diseño y operación de biorreactores y fermentadores son:

1. Requerimientos de los bioprocesos
2. Características e impacto del diseño del proceso
3. Geometría de un reactor y selección del agitador
4. Selección y diseño de los accesorios
5. CIP/SIP
6. Optimización de costos de producción

#### **1. Requerimientos de los bioprocesos**

Los bioprocesos tienen como objetivo el crecimiento de células vivas. Es preciso la utilización de un entorno donde las condiciones de crecimiento puedan ser controladas en todo momento. Los biorreactores son los recipientes o sistemas que ofrecen un ambiente biológicamente activo y controlado. Para que el bioproceso tenga éxito, el diseño del biorreactor debe tener en cuenta tres aspectos principales:

- Características de la célula
- Modo de operación
- Condiciones de esterilidad

#### **Características de la célula**

Influyen en el diseño del biorreactor de acuerdo con los siguientes factores:

- a. Metabolismo celular. En función del tipo de metabolismo celular, el medio de cultivo será rico en oxígeno (metabolismo aerobio) o carente de oxígeno (metabolismo anaerobio) y determinará la aireación o el control de pH en el interior del biorreactor
- b. Tipo de célula. El tipo de célula (procariota o eucariota), la sensibilidad de la pared celular y sus características frente a la transferencia de fluidos influirán directamente en el tipo de agitación o el control de temperatura en el interior del biorreactor

### **CÉLULAS DE BACTERIAS Y EUCARIOTAS INFERIORES**

- Su cultivo es relativamente más sencillo
- Presentan requerimientos nutricionales sencillos
- Crecen rápidamente dentro de amplios intervalos de pH, temperatura y osmolaridad
- Los equipos, instalaciones y bioprocesos necesarios para cultivar células de éste tipo son simples y generalmente poco costosos
- Las concentraciones máximas de células y de productos son muy altas lo mismo que sus productividades

### **CÉLULAS DE MICROORGANISMOS**

Para su cultivo existen varias opciones:

- A. Microorganismo productor wild type. Generalmente suele ser el mejor productor (selección natural). La manipulación genética es mínima o nula, esto ahorra tiempo y dinero. Posibles desventajas: Puede que no cumpla con las normas GRAS (Generally recognized as safe). Su utilización pueden presentar dificultades al momento del escalado y etapas de recuperación (ejemplo hongos filamentosos)
- B. Microorganismos modificados genéticamente para tal fin, sistemas de expresión heteróloga. Son utilizados para la producción de proteínas recombinantes. Ventajas: Sistemas preparados para una finalidad determinada

Para la elección del sistema se debe tener en cuenta:

- Productividad
- Complejidad estructural
- Modificaciones postraduccionales
- Bioactividad de la proteína de interés
- Manipulación del sistema de expresión
- Bioseguridad del sistema de expresión

### ***Escherichia coli***

Ventajas:

- Alta tasa de crecimiento
- Amplio conocimiento de su genética y fisiología
- Fácil manipulación genética: gran variedad de vectores y cepas disponibles, alta eficiencia de transformación, etc.)
- Fácil de cultivar
- Bajo costo de cultivo
- Alta acumulación de proteínas recombinantes (30% del total celular)
- Lisis y recuperación relativamente sencilla

Desventajas:

- Contaminación con endotoxinas
- Proteínas intracelulares con formación de cuerpos de inclusión
- No posee modificaciones postranducionales

**Levaduras: (*S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris*)**

Ventajas:

- Unicelular eucariota, fácil crecimiento y manipulación
- Capacidad para realizar modificaciones postranducionales (glicosilación, acetilación, fosforilación, eliminación del Met-1, procesamiento proteolítico de precursores)
- Fácilmente escalable
- Bajo o nulo nivel de endotoxinas
- Proteínas extracelulares e intracelulares

Desventajas:

- Baja eficiencia de transformación
- Hiperglicosilación (*S. cerevisiae* principalmente)

## **CÉLULAS ANIMALES**

Tienen varias características que las diferencian de otras células u organismos utilizados en la biotecnología. Son células de eucariotes superiores, por lo que poseen núcleo y diversos organelos, tales como retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Carecen de pared celular y son más grandes que las levaduras o bacterias, con un diámetro aproximado de entre 10 y 20  $\mu\text{m}$ .

Se pueden derivar de tejido epitelial, conectivo, muscular o nervioso. Generalmente crecen en forma de huso o poligonal, adheridas a una superficie y formando una monocapa durante su

cultivo in vitro (dependencia al anclaje). Células derivadas del sistema hematopoyético, médula ósea o tejido linfoide, son independientes al anclaje, crecen suspendidas con forma esférica.

Los cultivos primarios se generan directamente de células obtenidas de tejidos animales y tienen una vida finita, sólo se les puede mantener por cierto tiempo en cultivo. Se pueden obtener líneas celulares continuas mediante transformaciones que surgen espontáneamente durante el subcultivo o por inducción con ciertos virus o carcinógenos. Las líneas continuas o transformadas son “inmortales” (crecen en cultivo indefinidamente).

Las células animales provienen de organismos multicelulares y, en contraste con las bacterias o levaduras, han evolucionado para vivir en un ambiente altamente regulado por los varios sistemas que componen el cuerpo del que se originaron. In vitro están expuestas a ambientes cambiantes, carecen de los sistemas de regulación y protección presentes en el organismo completo, y del abasto continuo y óptimo de nutrientes y eliminación de subproductos tóxicos.

El cultivo representa retos enormes, ya que las células animales son muy sensibles a estresores comúnmente encontrados en biorreactores. Presentan requerimientos nutricionales complejos. Crecen lentamente dentro de intervalos estrechos de pH, temperatura y osmolaridad.

Los equipos, instalaciones y bioprocesos necesarios para cultivar son sofisticados y costosos, ya que, entre otras cosas, requieren garantizar esterilidad absoluta a lo largo de la operación. Las concentraciones máximas de células y de productos son muy bajas (varios órdenes de magnitud por debajo obtenidos con bacterias y eucariotes inferiores). Las productividades son bajas

Son capaces de producir proteínas altamente parecidas a las que sintetiza el cuerpo humano, pues están más cerca evolutivamente que las bacterias o levaduras. Algunas proteínas son muy grandes y son procesadas de distintas formas por las células que las producen. Los procesamientos pueden ser complejos, como la glicosilación (adición de oligosacáridos a las proteínas) y típicamente no suceden en levaduras o bacterias.

Muchas proteínas requieren diversos procesamientos para ser funcionales:

- Eritropoyetina (utilizada en caso de anemia por disfunción renal)
- Los factores VIII y IX (utilizados para el tratamiento de la hemofilia)
- El factor activador de plasminógeno (utilizado para la disolución de coágulos en problemas circulatorios)
- Los anticuerpos monoclonales

Aproximadamente la mitad de los más de 500 productos biofarmacéuticos que actualmente se encuentran en pruebas clínicas, requerirán ser producidos por células animales. En términos económicos, los productos derivados de células animales tienen actualmente un mercado de más de diez mil millones de dólares anuales, mientras que su impacto en el incremento de la calidad de vida y salud humana es incalculable.

Debido a su mayor tamaño y ausencia de pared celular, las células animales son más sensibles al daño hidrodinámico que las bacterias o levaduras. Cuando se agita un biorreactor se generan fuerzas, producto del movimiento del líquido, que pueden dañar las células.

### **Modo de operación**

Los bioprocesos o fermentaciones pueden ser clasificados en función de su operatividad en 4 grupos:

**Operación discontinua (batch).** Sistema cerrado en el que en el inicio de la operación se añade la solución esterilizada de nutrientes y se inocula con el microorganismo, permitiendo que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación.

En los procesos a escala industrial, se interrumpe la fermentación al final de la fase logarítmica (metabolitos primarios) o antes de que comience la fase de muerte (metabolitos secundarios). Se trata de un método robusto, bien conocido y que precisa de instalaciones simples.

**Operación alimentada (fed-batch).** Es básicamente similar a la fermentación discontinua, pero algunos sustratos se añaden escalonadamente a lo largo del proceso. Es un método robusto, bien conocido, que precisa de instalaciones simples. Ofrece una mejora en la producción.

**Operación continua.** En la fermentación continua se establece un sistema abierto. La solución nutritiva estéril se añade continuamente al biorreactor y una cantidad equivalente de cultivo con los microorganismos, se saca simultáneamente del sistema. Permite una buena utilización de los recursos materiales y humanos. Requiere una atención mucho mayor que los modos de operación anteriores para lograr el mantenimiento de la estabilidad (composición del sustrato y esterilidad del sistema).

**Biorreactores de enzimas o de células inmovilizadas.** Se trata de un sistema de producción continuo. Consiste en pasar el medio fresco a través de un biorreactor en el que hemos inmovilizado células (o enzimas). Se eliminan los problemas de desequilibrio e inestabilidad de los sistemas abiertos y continuos. Tiene el inconveniente de que no todos los organismos vivos pueden inmovilizarse.

### **Condiciones de esterilidad**

El diseño del biorreactor deberá garantizar las condiciones de esterilidad, evitando la aparición de contaminación, ya sea química o microbiológica. La selección de materiales debe garantizar la inocuidad total, deben ser inertes químicamente y deben ser resistentes a las soluciones de lavado y los procesos de desinfección. El diseño de los equipos deberá garantizar la esterilidad del proceso y la selección de los accesorios, deberá permitir la operación en condiciones asépticas.

## **2. Características e impacto del diseño del proceso**

El diseño del proceso debe permitir que tanto el rendimiento del equipo como la capacidad de producción sean los óptimos. El diseño del sistema deberá garantizar en todo el volumen del equipo los siguientes aspectos:

- Distribución uniforme de células
- Temperatura constante y homogénea
- Mínimo gradiente de concentración de nutrientes
- Ausencia de sedimentación y de floculación
- Difusión de gases nutrientes fácil y controlada

Para conseguir estos objetivos, que permitirán optimizar los rendimientos productivos, deberán estudiarse los siguientes aspectos del proceso:

- Método de mezcla y agitación
- Método de control de temperatura
- Método de control de pH
- Método de control de [O<sub>2</sub>] o método de aireación
- Método de eliminación de espumas

### **Método de mezcla y agitación**

La agitación es la operación que crea o que acelera el contacto entre dos o varias fases. Una fermentación microbiana puede ser considerada como un sistema de tres fases:

- 1) Fase líquida: sales disueltas, sustratos y metabolitos
- 2) Fase sólida: células individuales, agregados celulares, sustratos insolubles o productos del metabolismo que precipitan
- 3) Fase gaseosa: proporciona un reservorio para el suministro de oxígeno, para la eliminación del CO<sub>2</sub> para el ajuste de pH.

La agitación permite la dispersión del gas en la solución de nutrientes, la homogeneización de la temperatura, del pH y de la concentración de nutrientes en el fermentador. Gracias a la agitación se consigue la suspensión de los microorganismos y de los nutrientes sólidos, así como de la dispersión de los líquidos inmiscibles. Los tipos de agitación pueden ser: columna de burbujas, agitación rotativa o recirculación.

### **Método de control de temperatura**

El control de la temperatura en el interior de los fermentadores es un factor físico que afecta al rendimiento del proceso. Una temperatura inferior a la óptima provoca el retardo en el

crecimiento y la reducción de la producción celular. Una temperatura superior a la óptima produce choque térmico, inducción a una respuesta de estrés celular, producción de proteasas celulares y reducción de los productos proteicos.

La fermentación debe llevarse a cabo en un estrecho margen de temperatura y a ser posible constante. En un proceso de fermentación, la producción de calor deriva de la agitación y de la actividad metabólica. Este calentamiento puede provocar evaporaciones. Para evitarlo, se emplean camisas de refrigeración con agua.

### **Método de control de pH**

Durante el crecimiento en un fermentador, los metabolitos celulares son liberados al medio lo que puede originar un cambio de pH del medio de cultivo. La mayor parte de los microorganismos crecen óptimamente a pH comprendidos entre 5.5 y 8.5. Las bacterias crecen a pH neutro y los hongos a pH ácido. Para mantener constante el pH y que su variación no perjudique el crecimiento, debe realizarse la medida de pH in situ y el ajuste con reactivos ácidos o básicos, en caso de que sea necesario.

### **Método de control de concentración de oxígeno o método de aireación**

Otro factor que afecta al rendimiento de las fermentaciones industriales es la concentración de oxígeno. En el caso de los microorganismos aerobios, debe asegurarse una perfecta transferencia gas-líquido del oxígeno que se burbujea desde la parte inferior del biorreactor. En el caso de los microorganismos anaerobios, deberá controlarse la ausencia de este gas, ya sea mediante el burbujeo de CO<sub>2</sub> o de N<sub>2</sub>.

Para el burbujeo del gas desde la parte inferior del recipiente se utilizará un sparger o tubo taladrado, de fácil limpieza.

El control de la correcta aireación se llevará a cabo mediante la medida de oxígeno in situ. La transferencia de masa gas líquido podrá mejorarse con el control de la presión en el interior del recipiente, así como con el control de la temperatura. El incremento de temperatura disminuye la transferencia de masa gas-líquido.

Se hace necesaria la eliminación de espumas durante el proceso de fermentación porque alteran la transferencia de masa entre la fase líquida y la gaseosa de la parte superior del recipiente. El método para el control de espumas se basa, por un lado, en la adición controlada de antiespumantes y, por otro lado, en la detección de estas espumas mediante sensores específicos y su eliminación mediante vacío. ser: columna de burbujas, agitación rotativa o recirculación

## **3. Geometría de un reactor y selección del agitador**

### **Geometría del reactor**

Sabiendo que la altura HL es la altura de líquido dentro del recipiente y que DT es el diámetro total, la relación geométrica (HL/DT) habitual en un biorreactor es la siguiente:

- Cultivo celular: desde 1 – 1.5
- Microbiológico: desde 2 – 2.5

El recipiente destinado al crecimiento celular debe disponer de un diseño que sea completamente drenable. Por ese motivo, la configuración es cilíndrica vertical, con fondos toriesféricos. Normalmente se trata de fondos tipo Klöpfer

### **Materiales y acabados**

Los materiales empleados en su construcción deben ser no reactivos y resistentes a la esterilización y los reactivos de limpieza. Los más habituales son aceros inoxidable de alta calidad. Para las partes en contacto con producto, se emplea desde AISI-316L hasta Hastelloy. Para el resto de partes, como patas, camisa de refrigeración o cobertura final del aislamiento, se suele utilizar acero inoxidable AISI 304.

Deben presentar un acabado, tanto interior como exterior, que evite la acumulación de partículas. Es habitual que estos equipos dispongan de acabados exteriores matizados o pulidos mecánicos (GR-180 a GR-320), incluidos los cordones de soldadura.

Interiormente, el acabado superficial habitual consta de un pulido mecánico con rugosidad media Ra menor de 0,5 micras. Este pulido mecánico se ve sustituido a menudo por un electropulido que mejora la rugosidad máxima (Rmax), disminuyendo las distancias máximas entre valles y crestas. Cuanto mejor sea el acabado superficial del recipiente, más fácil será mantener las condiciones de esterilidad.

### **Selección del agitador**

Para la selección del tamaño del agitador deben tenerse en cuenta varios factores:

- a) La relación geométrica entre el tamaño del agitador y el del biorreactor
- b) La relación entre el tamaño de la pala del agitador y la eficiencia de la mezcla

Si estudiamos la geometría del impulsor, siendo Di el diámetro un biorreactor es la siguiente:

- Cultivo celular: de 0.5 a 0.6
- Microbiológico: de 0.3 a 0.4

En la selección del tamaño de pala también debe tenerse en cuenta que agitadores con el mismo diámetro de pala tienen la misma eficiencia, mismo tiempo de mezcla para conseguir un grado concreto de homogeneidad con el mismo volumen.

Por tanto, a mayor diámetro de pala, menor tiempo de mezcla para el mismo volumen. Los impulsores de los agitadores pueden ser principalmente de dos tipos:

- Flujo radial, como la turbina Rushton
- Flujo axial, como las hélices marinas

Para que los patrones de flujo en el interior de los biorreactores o fermentadores permitan la homogeneidad del contenido, se hace necesaria en algunos casos la instalación de baffles o deflectores en la pared interna del recipiente.

Estos deflectores crean las turbulencias necesarias para la correcta mezcla. Sin embargo, es muy importante que estos dispositivos puedan limpiarse correctamente para que no provoquen un problema de contaminación.

### **Ubicación del agitador**

La ubicación del agitador en un fermentador puede ser tanto en el fondo superior como en el fondo inferior. La instalación del agitador mecánico centrado en el fondo superior presenta ventajas a la hora del funcionamiento del cierre mecánico, que no exige ser lubricado, y también ventajas en su limpieza. La ubicación del agitador mecánico descentrado en el fondo inferior permite que el tanque pueda prescindir de los deflectores.

Una alternativa a los agitadores mecánicos descentrados en fondo inferior, son los agitadores magnéticos descentrados en fondo inferior. Por su concepción, no presentan las desventajas de los mecánicos, sin embargo, tienen limitaciones en cuanto a las características del producto a mezclar, sobre todo en relación con la densidad, viscosidad máxima, volumen y presencia de sólidos en suspensión.

## **4. Selección y diseño de los accesorios**

La selección del resto de elementos que forman parte de un biorreactor o fermentador deberán respetar las mismas premisas de durabilidad y fácil limpieza. Tanto las válvulas en contacto directo con el producto, como las tomamuestras, los instrumentos y los accesorios, deberán respetar la selección de materiales y acabados establecida en el caso del recipiente y del agitador.

Las válvulas en contacto directo con el producto empleadas serán fundamentalmente de diafragma, resistente a los ciclos de esterilización. Los toma muestras deberán permitir su total esterilización previa a la propia toma de muestra.

## **5. CIP & SIP**

### **Cleaning In Place (CIP)**

La limpieza de un fermentador (CIP) tras su uso se lleva a cabo mediante una bola o cabezal de limpieza. El dimensionamiento de este dispositivo debe garantizar que su alcance llegue al 100%

de la superficie interior del depósito. El caudal y la presión del agua de alimentación deben ser verificados y adecuados al tipo de cabezal seleccionado (fijo, rotativo, etc...)

En grandes fermentadores con deflectores, puede ser necesaria la instalación de más de un cabezal, para asegurar el rociado total. Para alimentar el cabezal de limpieza se utiliza un sistema de bombeo en recirculación, que puede incluir la adición de agentes de limpieza específicos. La receta de la limpieza depende en cada caso del bioproceso realizado y la geometría del recipiente.

### **Sterilisation In Place (SIP)**

La esterilización en un fermentador es necesaria en varias fases del bioproceso. Se utiliza para:

- Asegurar que sólo nuestro producto está presente en el medio de producción
- Proteger el producto durante el proceso
- Proteger el producto después del proceso
- Proteger al paciente

El tipo de esterilización más frecuente se lleva a cabo mediante vapor puro. Para verificar que la esterilización ha sido efectiva, deberán controlarse la temperatura y el tiempo, como parámetros físicos, así como factores biológicos como el bioburden presenta antes de la esterilización (NO) o el tiempo en minutos requerido a una temperatura T para lograr un 90% de reducción de la población de microorganismos, también conocido como DT, siendo T normalmente 121.1°C

Para conseguir los objetivos de la esterilización en sus diferentes aplicaciones, será imprescindible que el sistema permita esterilizaciones independientes de los distintos elementos que componen el sistema:

- Recipiente
- Cierre mecánico del agitador
- Filtros de venteo
- Filtros de aireación
- Sistemas de dosificación

## **6. Optimización de costos de producción**

El diseño final del equipo debe ser versátil para la aplicación en diversas modalidades de procesos, de tal forma que, las operaciones a llevar a cabo durante el funcionamiento, recolección, limpieza y mantenimiento sean las mínimas. Se pretende minimizar el tiempo para cada etapa del ciclo.

El equipo debe estar diseñado para que el consumo de energía sea lo más bajo posible, disminuyendo así los gastos de producción. Los materiales seleccionados deberán ser los

adecuados para que los resultados sean satisfactorios, pero sin caer en aspectos superfluos que puedan incluso complicar las tareas de limpieza y desinfección.

## **COMPORTAMIENTO CELULAR EN CULTIVOS**

### **Crecimiento celular**

Crecimiento: aumento ordenado de todos los componentes químicos de un sistema biológico.

El crecimiento de una población bacteriana sigue una cinética de primer orden:

$$\text{Vaumento cél.} = k * [\text{n}^\circ \text{ o masa de células}]$$

Siendo  $k$  la constante de velocidad de crecimiento.

El crecimiento celular engloba la conversión metabólica de un substrato en sus productos, lo que hace que se libere energía en forma de ATP (ruta catabólica), que será utilizada para la síntesis celular (ruta anabólica).

La cantidad de masa celular, o biomasa formada, es proporcional a la cantidad de substrato y de producto. Se puede definir un coeficiente para cada tipo de bacterias, llamado coeficiente de producción ( $Y$ ) que puede ser determinado experimentalmente.

Como ejemplo, el proceso metanogénico a partir de acético se puede expresar como el resultado general de la reacción de respiración y la síntesis celular, expresado por las reacciones de Mosey, 1983.

El crecimiento de la población de microorganismos se puede asociar al consumo de substrato.

### **Tasa de crecimiento celular**

En condiciones ideales, el crecimiento de las poblaciones bacterianas sigue un crecimiento exponencial en el tiempo. En la práctica existen limitaciones al crecimiento, dadas por ejemplo, por la limitación del substrato disponible o por la presencia de tóxicos. La concentración de substrato disponible limita la velocidad de crecimiento de las poblaciones bacterianas.

La forma de simular esta influencia ha sido objeto de controversia, siendo diferente en función de las condiciones y del grupo de microorganismos. En general se acepta que se cumple la cinética de Monod (1950), quien propuso una expresión similar a la ecuación de Michaelis-Menten de velocidad de reacción enzimática: donde  $\mu$ : tasa de crecimiento específica;  $\mu_m$ : tasa máxima de crecimiento específica;  $S$ : concentración de substrato;  $K_S$ : constante de saturación.

La dependencia del substrato de la velocidad de crecimiento específica ( $\mu$ ) es de forma que si la cantidad de substrato es muy grande la tasa específica se aproxima al valor máximo y si la concentración del substrato tiende a cero, se aproxima a cero.

### **Cinética del crecimiento microbiano**

Hace referencia al aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo y no al aumento de tamaño de un microorganismo. El aumento del número de microorganismos permite la formación de colonias o de poblaciones. En microbiología el crecimiento se estudia por poblaciones no en microorganismos individuales.

Las bacterias se reproducen generalmente por fisión binaria. El resultado de la fisión binaria son dos células hijas por cada célula madre, así, una célula se divide en dos, dos en cuatro y cuatro en ocho y así sucesivamente.

El intervalo de tiempo que transcurre para la formación de dos células a partir de la célula madre se llama tiempo de generación o tiempo generacional y al igual que la tasa de crecimiento o cambio en el número de células por unidad de tiempo, varía en dependencia de las condiciones genéticas de las bacterias y de los factores nutricionales.

Si partimos de una célula al cabo de una generación habrá duplicado su número y así sucesivamente en cada generación. El crecimiento se produce en progresión geométrica y no aritmética.

En algunas bacterias como en el caso la *E. coli*, en condiciones óptimas la duplicación celular se realiza cada 20 minutos. En 10 horas se habrán producido 30 generaciones – 1000 millones de células bacterianas. A partir de una célula de *E. coli*, se obtiene al cabo de 10 horas (600 minutos)  $600/20=30$  generaciones. El número de células sería=230

Conceptos:

Generación (n) – Es el número de divisiones celulares que ocurren en un determinado tiempo en un cultivo microbiano.

Velocidad de crecimiento  $vc=n/t$

Tiempo de Generación – Tiempo requerido para que a partir de una célula se formen dos, sea el tiempo requerido para duplicar el número de células de una población.

### **Fases del crecimiento microbiano**

El incremento en el número de las células en una población se denomina como crecimiento exponencial o logarítmico. Si se inoculan unas bacterias en un medio de cultivo fresco y se cuantifica la población en intervalos de tiempo se puede obtener una curva que represente el crecimiento bacteriano.

La curva puede estar determinada por la comparación del número total de los microorganismos vivos presentes en la población en un período de tiempo.

La curva de crecimiento de la población tiene cuatro fases:

1. **Fase lag o fase de latencia** es el periodo de adaptación de los microorganismos a un nuevo ambiente, en este periodo el número de células no se incrementa, sino que se mantiene constante por un largo período que puede durar desde 1 hora hasta varios días. En esta fase las células presentan gran actividad metabólica. Al final de la fase la mayoría de las células aumentan su tamaño.
2. **Fase log o logarítmica o de crecimiento exponencial.** Durante este periodo las células se empiezan a dividir en forma constante, la actividad metabólica (respiración celular, síntesis de proteínas, etc.) es máxima. El número de células vivas en reproducción es mucho mayor que las células vivas de la población que comienzan a morir. En el momento final de esta fase y como resultado de la alta tasa de reproducción, comienzan a escasear los nutrientes y el ambiente se torna tóxico por el exceso de productos de desecho. Es el momento en el cual las células son más sensibles a los antimicrobianos o a las radiaciones que pueden intervenir negativamente en su crecimiento. Esta fase se representa por una línea recta ascendente.
3. **Fase estacionaria**, en este periodo se genera un factor limitante del crecimiento, razón por la cual se detiene el crecimiento de los microorganismos, generando una tasa reproductiva igual a la tasa de mortalidad. Si la población no se reproduce ni muere, el número de células permanece constante y la longitud de la fase varía y depende del balance que logren las células con el medio ambiente. Es un periodo de equilibrio.
4. **Fase de muerte**, o de declive logarítmico. La muerte se define en Microbiología como la pérdida irreversible de la capacidad de reproducirse. La cinética de muerte sigue también una disminución exponencial del número de supervivientes con el tiempo. En esta fase las células no se reproducen, solo mueren y son destruidas por lisis en forma exponencial a causa del incremento en las cantidades de ácido y otros desechos dañinos en el ambiente.

### **Cinéticas de inhibición celular**

La presencia de un compuesto tóxico para los microorganismos se refleja en una menor tasa de crecimiento de los mismos. No todos los microorganismos se ven afectados de la misma forma por los mismos compuestos. Se dice que hay tres tipos básicos de inhibición, en función de la reversibilidad y del parámetro cinético al que afecta. A través de las constantes “biocinéticas” de la ecuación de Monod para la tasa de crecimiento específico y de utilización de substrato, se puede ajustar el modelo para tener en cuenta los factores inhibidores.

Lo más común en los modelos consultados en la bibliografía es que sea la velocidad de crecimiento específica  $\mu$  la variable afectada, aunque algunas sustancias pueden afectar al coeficiente de producción o a la tasa de lisis.

### **Cultivos continuos en reactores**

Las poblaciones microbianas pueden ser mantenidas en estado de crecimiento exponencial durante largo tiempo utilizando sistemas de cultivo continuo, como los reactores.

La velocidad de crecimiento de las bacterias está en función del nutriente limitante: la velocidad de adición de medio determina la velocidad de crecimiento bacteriano y el sistema está autorregulado.

### **Comportamiento celular en cultivos**

Diauxia

Si el medio contiene dos fuentes de C diferentes, las bacterias tienden a utilizar aquella que les proporcione mayor rendimiento energético. Cuando ésta se acaba, hay un tiempo de adaptación al segundo substrato que, a continuación, es consumido. El rendimiento y velocidad de crecimiento es mayor para el primer substrato que para el segundo.

### **Rendimiento**

Es la cantidad de biomasa producida por unidad de substrato consumido ( $Y$ ). Es muy variable, desde un 20-50% para bacterias heterotróficas aerobias hasta un 2-4% para anaerobias (metanobacterias), y refleja la eficiencia con que se genera ATP a partir de un substrato. Todas estas ecuaciones y parámetros son fundamentales en diferentes procesos de Biotecnología.

Células cuantificables en bioprocesos:

- Bacterias
- Levaduras
- Hongos filamentosos
- Microalgas

## **FUNDAMENTOS DE FERMENTACIÓN**

### **Fermentación**

(Del lat. fermentatio, -onis) 1. f. Acción y efecto de fermentar. (RAE)

### **FERMENTAR**

(Del lat. fermentare) 1. intr. Dicho de los hidratos de carbono: Degradarse por acción enzimática, dando lugar a productos sencillos, como el alcohol etílico.

### **Fermentación**

Es un proceso catabólico (rompimiento de compuestos complejos a compuesto sencillos) oxidativo (intercambio de electrones) de cuyo resultado obtenemos un compuesto orgánico. El producto final varía según el sustrato.

En los seres vivos, la fermentación es un proceso anaeróbico donde no interviene el proceso de respiración celular. Son propias de los microorganismos, como las bacterias y las levaduras.

Bajo ciertas condiciones este proceso puede darse en el tejido muscular de los animales, esto ocurre cuando hay insuficiencia de oxígeno a las células musculares. Bajo estas circunstancias se produce ácido láctico, el cual se acumula en nuestros músculos y es el causante de dolor.

La fermentación puede ser en presencia de cantidades limitadas de oxígeno, esto se conoce como una oxidación aeróbica incompleta. Un ejemplo del producto obtenido por este tipo de fermentación es el ácido acético a partir de etanol.

Las fermentaciones pueden ser:

- a. Naturales, cuando las condiciones ambientales permiten la interacción de los microorganismos y los sustratos orgánicos necesarios.
- b. Artificiales, cuando el hombre favorece estas las condiciones

Un proceso de fermentación típico es esencialmente un proceso que se lleva a cabo en un recipiente llamado fermentador o en general, biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa.

El microorganismo va aumentando en su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas. Los dos fenómenos crecimiento y formación de producto, tienen lugar durante el desarrollo del proceso simultáneamente o no según los casos.

El proceso de fermentación es importante en la industria para convertir granos a bebidas alcohólicas (el mosto en vino y la cebada en cerveza). Además, convierte carbohidratos en CO<sub>2</sub>, esto es para hacer pan.

Los objetivos para fermentar los alimentos son:

1. Desarrollar una diversidad de sabores, aromas y texturas en los substratos de los alimentos.
2. Preservar los alimentos a través de diferentes ácidos como por ejemplo: el ácido láctico y el ácido acético.
3. Enriquecer los substratos de los alimentos con proteínas, amino ácidos, ácidos grasos esenciales y vitaminas.

Se llevan a cabo en fermentadores o bioreactores. En estos fermentadores el sustrato es convertido a un compuesto o metabolito con la ayuda de un microorganismo.

El esquema general de un proceso de fermentación incluye:

- A. **Propagación del cultivo.** El microorganismo a ser utilizado en la fermentación debe ser cultivado y transferido a envases con mayor cantidad de medios para así obtener un gran número de microorganismos que será inoculada en los tanques de fermentación. El gran número de microorganismos se obtiene mediante sucesivas inoculaciones.
- B. **Fermentación.** Tanque de inóculo-aquí se inocula el cultivo inicial. Este tanque tiene un volumen desde 50 hasta 1,000 L. Tanque de fermentación industrial. Tiene una capacidad desde 10,000-100,000 L. Algunos pueden tener una capacidad de hasta 1,000,000 L.

Entre los factores que regulan el proceso de fermentación se encuentran los factores internos y los factores externos.

- 1) **Factores internos** – genética del organismo y sus mecanismos de regulación metabólica. Se pueden cambiar por medio de tratamientos físicos, químicos, alterarán la genética del organismo a través de mutaciones. La mutación puede aumentar, disminuir o suprimir la producción de un metabolito (ingeniería genética).
- 2) **Factores externos** – son de naturaleza física y química: temperatura, agitación y aireación. Incluimos los componentes de los medios de fermentación, el oxígeno y los tanques de fermentación o bioreactores. Los factores químicos son importantes para el manejo de los factores externos ya que pueden influenciar la expresión celular.

Productos de fermentación (metabolitos primarios y secundarios). Hay dos tipos fundamentales de productos metabólicos: primarios y secundarios.

Un metabolito primario es el que se forma durante la fase primaria del crecimiento del microorganismo.

Un metabolito secundario es el que se forma en la fase estacionaria del crecimiento

- 1) Metabolitos primarios microbianos. Son de menor importancia a nivel industrial, como el etanol, etc.
- 2) Metabolitos secundarios microbianos. Se producen durante la fase estacionaria. Son los que mayor importancia a nivel industrial tienen: antibióticos, como la penicilina. En el metabolismo secundario encontramos diferencias entre un organismo y otro y se caracterizan porque:
  - Se cree que los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento y la reproducción
  - La composición del medio es extremadamente importante para producir el metabolito secundario
  - Generalmente se producen como un grupo relacionado entre sí, por ejemplo, en *Streptomyces* se ha observado que una sola cepa de una especie produce 32 antibióticos diferentes del tipo antraciclina

### **Diferencias entre el metabolismo primario y el secundario**

La mayoría de los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas complejas las cuales requieren un gran número de reacciones enzimáticas específicas. Ejemplo, para producir tetraciclina se necesitan 72 reacciones químicas y para sintetizar eritromicina más de 25.

## **PRODUCCIÓN EN FÁBRICAS CELULARES**

Producción de proteínas recombinantes y metabolitos. Los compuestos generados por la industria química, los aromáticos y los combustibles se distinguen por tener un gran número de aplicaciones en los sectores farmacéutico, de alimentos y energético.

Estas moléculas se obtienen mediante procesos basados en refinación y síntesis química a partir del petróleo y derivados. Esto permite producir compuestos aromáticos y combustibles útiles con un costo de producción relativamente bajo. La mayoría de estos procesos generan subproductos que contaminan el medio ambiente. Dependiendo del petróleo como materia prima tiene la desventaja de que no es renovable, y en el futuro su disponibilidad será limitada.

Motivos por el cual surge el interés en la búsqueda de alternativas tecnológicas para producir compuestos útiles mediante procesos no contaminantes y no dependientes del petróleo. Una de las alternativas más promisorias es la biotecnología.

Área de uso de tecnología que puede definirse como el organismo o sus componentes, con el fin de generar bienes y servicios.

Todos los seres vivos tienen la capacidad de realizar transformaciones químicas debido a que poseen proteínas especializadas llamadas enzimas que funcionan como catalizadores.

La biotecnología estudia y aprovecha esta capacidad catalítica natural de los organismos para generar procesos biológicos de producción de moléculas útiles.

### **Metabolismo**

El conjunto de reacciones químicas que ocurren en un organismo se conoce como metabolismo. Son transformaciones químicas que tienen el propósito de generar diversas moléculas que serán unidas en diferentes configuraciones y así se generarán nuevos componentes celulares.

Mediante este proceso la célula crece hasta llegar a un punto en que se divide dando lugar a nuevas células. Mediante reacciones específicas, la energía química para llevar a cabo estos procesos es extraída de las moléculas orgánicas, principalmente azúcares. Cualquier célula puede considerarse como una fábrica microscópica, capaz de realizar un gran número de reacciones químicas diferentes.

En su estado natural las células generalmente no producen cantidades elevadas de los compuestos útiles desde el punto de vista industrial. Por eso es necesario modificar su metabolismo para que adquieran la capacidad de convertirse en fábricas químicas.

Las proteínas son las responsables de llevar a cabo la mayoría de las funciones celulares; por lo tanto, el tipo y la cantidad de proteínas específicas (proteoma) presentes en una célula determinan qué funciones celulares estarán activas.

### **Metabolismo y Proteínas**

El metabolismo es un proceso celular en que participan un gran número de proteínas diferentes. La célula posee mecanismos para coordinar cuáles proteínas y en qué cantidad son necesarias dependiendo de las condiciones externas. Cualquier célula microbiana típica tiene el potencial genético en su genoma para sintetizar un número considerable de proteínas.

Durante la segunda mitad del siglo XX se lograron importantes avances en la biología, que fueron esenciales para el desarrollo de la biotecnología: uno de los más importantes fue la determinación de la estructura de doble hélice del DNA.

A comienzos de los años 70 se descubrieron diversas enzimas en bacterias y virus, que fueron de gran ayuda para la biotecnología:

- Endonucleasas de restricción, enzimas bacterianas que reconocen secuencias específicas del DNA, y cortan la cadena cada vez que esta secuencia aparece
- DNA ligasas, enzimas que “pegan” fragmentos de DNA
- Transcriptasas inversas, enzimas virales que puede invertir la dirección normal de la transferencia de información

En ingeniería genética o tecnología del DNA recombinante, se utilizan estas enzimas para cortar y aislar un gen determinado -que tiene información para fabricar una proteína particular- e introducirlo en las células de un organismo distinto del inicial.

### **Metabolismo, proteínas y Biotecnología**

Se considera proteína recombinante o proteína heteróloga aquella proteína cuya síntesis se realiza en un organismo distinto al organismo nativo (Walsh and Headon, 1995). El desarrollo de la tecnología del DNA recombinante y el avance en los bioprocesos con organismos recombinantes ofrece una gama amplia de posibilidades para la producción de proteínas nativas o modificadas con nuevas y mejores propiedades.

Para la producción de proteínas recombinantes se utiliza uno de los múltiples sistemas de expresión disponibles comercialmente o desarrollado con fines de investigación o bien, se puede diseñar y construir sistemas de expresión para necesidades específicas.

Un sistema de expresión lo conforma:

- A. Un organismo hospedero
- B. Un vector de expresión o fragmentos de DNA que poseen los elementos génicos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción en dicho organismo hospedero

A escala industrial, la producción de proteínas recombinantes involucra las etapas de:

1. Fermentación – las bacterias son cultivadas en tanques sellados (fermentadores) que contienen un medio de cultivo nutritivo
2. Extracción – las células son centrifugadas para recuperar las proteínas de su interior
3. Purificación – se separa la proteína recombinante de las otras proteínas bacterianas
4. Formulación – la proteína recombinante es modificada para conseguir una forma estable y estéril que puede administrarse terapéuticamente

Cada una de las fases de la elaboración implica un manejo muy cuidadoso de los materiales y un estricto control de calidad para optimizar la extracción, la pureza, la actividad y la estabilidad del fármaco.

Dependiendo del producto y del tipo de célula utilizada, la producción de proteínas recombinantes puede ser un proceso simple o más complejo.

La complejidad del proceso aumenta el costo final del producto, pero el valor nunca sobrepasa el gasto de aislar el compuesto desde su fuente original (por ejemplo, obtención de insulina a partir de páncreas de porcinos o bovinos) para llegar a cantidades medicinales.

## PRODUCTO

- Factores de coagulación

## SISTEMA DE PRODUCCIÓN INDICACIÓN TERAPÉUTICA

- Factor VIII Cultivo de células de mamífero Hemofilia A
- Factor IX Cultivo de células de mamífero Hemofilia B
- Factor VIIa Cultivo de células de mamífero Ciertas formas de hemofilia
- Anticoagulantes
- Activador del plasminógeno tisular Cultivo de células de mamífero Infarto de miocardio
- Activador del plasminógeno tisular *E. coli* Infarto de miocardio
- Hirudina Levaduras Trombocitopenia y prevención de trombosis
- Hormonas
- Insulina Levaduras Diabetes mellitus
- *E. coli*

- Hormona de crecimiento *E. coli*. Deficiencia de la hormona en niños, acromegalia, síndrome de Turner
- Folículo-estimulante Cultivo de células de mamífero Infertilidad, anovulación y superovulación
- Paratiróidea *E. coli* Osteoporosis
- Gonadotrofina coriónica
- Cultivo de células de mamífero Reproducción asistida
- Tirotrófina Cultivo de células de mamífero Detección /tratamiento de cáncer de tiroides
- Luteinizante Cultivo de células de mamífero Ciertas formas de infertilidad
- Calcitonina *E. coli* Enfermedad de Paget
- Glucagon Levaduras Hipoglucemia
- Factores hematopoyéticos
- Eritropoyetina (EPO) Cultivo de células de mamífero Anemia
- Factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF)
- *coli* Netropenia, trasplante autólogo de médula
- Interferón e interleuquinas
- Interferón alfa (IFN alfa) *E. coli* Hepatitis B y C, distintos tipos de cáncer
- Interferón beta (IFN beta) Cultivo de células de mamífero Esclerosis múltiple
- Interferón gamma (IFN gamma 1b) *E. coli* Enfermedad granulomatosa crónica
- Interleuquina 2 (IL-2) *E. coli* Cáncer de riñón
- Vacunas
- Anti-hepatitis B Levaduras Inmunización contra la hepatitis B
- Anti-hepatitis A Levaduras Inmunización contra la hepatitis A
- Anti-enfermedad de Lyme *E. coli* Inmunización contra la enfermedad de Lyme
- Anticuerpos monoclonales recombinantes
- Anti-IgE (recombinante) Cultivo de células de mamífero Asma
- Anti-TNF (recombinante) Cultivo de células de mamífero Artritis reumatoidea
- Anti-IL2 Cultivo de células de mamífero Prevención del rechazo agudo de trasplante de riñón
- Otros productos recombinantes
- Proteína morfogénica del hueso-2 Cultivo de células de mamífero Fractura de tibia
- Galactosidasa Cultivo de células de mamífero Enfermedad de Fabry (deficiencia en alfa-galactosidasa)
- Iaronidasa Cultivo de células de mamífero Mucopolisacaridosis
- Proteína C Cultivo de células de mamífero Sepsis severa

El área de la biotecnología que se relaciona al estudio y la modificación del metabolismo es la ingeniería de vías metabólicas (IVM). Ésta puede definirse como la modificación racional y directa de las reacciones que constituyen el metabolismo de un organismo, con el propósito de mejorar sus propiedades o su productividad (Bailey, 1991).

La IVM surge como una nueva área dentro de la biotecnología como resultado del cúmulo de conocimientos generados por varias disciplinas biológicas que incluyen a la bioquímica, la genética, la biología molecular y las ciencias genómicas.

La ingeniería genética y sus técnicas de DNA recombinante surge en los años setenta como resultado del conocimiento acumulado en el campo de la biología molecular.

La ingeniería genética:

- Abre la posibilidad de aislar, editar y modificar el material genético, lográndose incluso el trasplante de genes entre especies diferentes. Aplicación: desarrollo de cepas bacterianas con la capacidad de producir cantidades elevadas de proteínas terapéuticas, como la insulina y la hormona de crecimiento humano (Olmos et al., 1994)

La biología estructural y las técnicas de DNA recombinante han sido aplicadas al estudio y modificación de proteínas, desarrollándose la ingeniería de proteínas. Tiene como objetivo la modificación racional de las propiedades de una proteína, tomando como base la información funcional y estructural.

La ingeniería de proteínas generalmente se aplica al mejoramiento de enzimas. Incrementar la actividad específica, cambiar la especificidad hacia nuevos sustratos, eliminar la inhibición alostérica, etc.

El análisis de flujos metabólicos tiene como objetivo determinar la célula (Stephanopoulos et al., 1999). Es posible debido a que se conoce prácticamente la totalidad de las reacciones químicas que constituyen el metabolismo.

La complejidad del metabolismo ha generado el desarrollo de métodos de estudio basados en enfoques teóricos y experimentales. Un método es el diseño de modelos del metabolismo celular in silico, simulados en una computadora. Se fusionan la informática y la bioquímica.

Es posible simular, mediante algoritmos implementados en programas, los flujos en las reacciones metabólicas de una célula. Se pueden calcular los efectos sobre esta distribución de flujos por cambios en la composición de nutrientes, o la ausencia de una o varias enzimas.

Se pueden calcular los efectos sobre esta distribución de flujos por cambios en la composición de nutrientes, o la ausencia de una o varias enzimas.

Estos estudios ayudan a entender cuáles son los límites teóricos en la capacidad de producción de algunos metabolitos y las distribuciones de flujos que permiten llegar a dicho resultado. La determinación de flujos metabólicos en una célula viva es otra aproximación al estudio del metabolismo celular. Se basa en la utilización de moléculas marcadas con isótopos. Permite determinar la mayoría de los flujos metabólicos intracelulares. Requiere de equipos costosos y cálculos muy complejos.

La determinación de flujos metabólicos se basa en el uso de moléculas de azúcares en las cuales uno o varios de sus átomos de carbono son el isótopo  $^{13}\text{C}$ . Los isótopos son átomos de un elemento que difieren en el número de neutrones en su núcleo. En el caso del carbono, el isótopo más abundante es el  $^{12}\text{C}$ . Utilizando técnicas analíticas es posible determinar si una molécula contiene átomos del isótopo  $^{12}\text{C}$   $^{13}\text{C}$ . Generalmente se utiliza glucosa marcada. La glucosa es alimentada en un cultivo bacteriano y sus átomos de carbono terminan formando parte de la mayoría de los componentes celulares.

Con esta información y el conocimiento de la estequiometría en la red metabólica del organismo, es posible calcular los flujos internos en la célula (Flores et al., 2002).

El objetivo del análisis de control metabólico (ACM) es definir la relación cuantitativa de una reacción enzimática sobre el flujo en una vía metabólica completa.

Cuando se desea modificar el metabolismo de un microorganismo, la principal pregunta es: ¿cuál o cuáles de las actividades enzimáticas deberán ser modificadas para lograr un efecto específico?

El ACM es la principal herramienta que permite identificar las enzimas clave dentro de vías metabólicas específicas. La aplicación más frecuente de la IVM es la modificación del metabolismo con el fin de generar cepas microbianas que puedan producir una cantidad elevada de un metabolito particular.

Existen estrategias generales de IVM que se pueden aplicar independientemente del metabolito que se desee producir:

1. Con base en el conocimiento bioquímico de la vía metabólica que sintetiza al compuesto de interés, identificar a las enzimas que son sujetas a control por inhibición alostérica (por sus productos u otros metabolitos celulares). Son enzimas clave que regulan el flujo de carbono hacia una vía específica.
2. Para incrementar el flujo de carbono hacia la vía biosintética de interés, identificar y eliminar los controles alostéricos y transcripcionales en las enzimas clave de esa vía y en los genes que las codifican
3. Lograr un alto nivel de expresión de los genes que codifican para las enzimas clave a las que ya se les eliminó el control alostérico. Se logra insertando los genes de interés en plásmidos
4. Identificar y eliminar posibles pasos limitantes dentro de la vía de interés
5. Incrementar la disponibilidad metabólica intermediarios del metabolismo central que precursores del metabolito que se desea producir

### **Síntesis en organismos unicelulares**

Utilizando la ingeniería genética de vías metabólicas y de proteínas, es posible desarrollar cepas de organismos con el potencial para sintetizar moléculas útiles, hasta ahora sólo obtenidas mediante síntesis química. Las cepas utilizarán a la glucosa u otras fuentes renovables de carbono como materia prima en procesos biotecnológicos no contaminantes.

Algunas cepas pueden producir moléculas precursoras de diversos compuestos, los cuales, mediante transformaciones químicas, dan lugar a los compuestos (LaDuca et al., 1999):

- hidroquinona
- benzoquinona
- ácido adípico
- aspartamo
- benzocaína
- ácido gálico
- pirogalol

Otras cepas pueden producir moléculas que son utilizadas por otros organismos y su producción se puede incrementar mediante transformaciones o modificaciones genéticas.

El repertorio metabólico de compuestos derivados de la vía aromática es amplio en la totalidad de los organismos que poseen esta vía.

- Tienen un papel en el metabolismo primario del organismo
- Funciones de protección contra competidores, patógenos depredadores
- Función estructural en plantas (lignina)

Entre los compuestos aromáticos con un papel protector se encuentran las melaninas. Son pigmentos que se han identificado en muchos organismos (bacterias, hombre). Existen varios tipos de melaninas:

- Las eumelaninas provienen de la transformación de la tirosina por medio de la acción de la enzima tirosinasa (Cabrera-Valladares et al., 2006)

La eumelanina es un polímero aromático. Tiene un amplio rango de absorción dentro del espectro electromagnético. Se han identificado algunas propiedades fisicoquímicas importantes ya que actúa como:

- fotoprotector
- intercambiador catiónico
- agente quelante
- semiconductor amorfo
- posee actividad antioxidante y antiviral

#### **Síntesis en organismos unicelulares: *E. coli***

En el caso de la bacteria *Escherichia coli*, se estima un número cercano a 4400 proteínas diferentes.

El control sobre cuáles proteínas se sintetizan ocurre principalmente a nivel de la síntesis del RNA.

Mediante la regulación genética, la célula tiene mecanismos para controlar que sólo se sintetizen las proteínas necesarias para una condición ambiental determinada.

La posibilidad de modificar de manera directa el metabolismo es el resultado del conocimiento actual sobre las reacciones químicas que lo constituyen, las enzimas que catalizan dichas reacciones y los genes que las codifican.

En *E. coli* se sabe que participan aproximadamente 994 enzimas y 794 metabolitos. En esta red metabólica algunas reacciones siempre están activas y otras se inducen o reprimen dependiendo de las condiciones donde se encuentre la bacteria.

Ha sido posible generar cepas de *E. coli* con la capacidad de sintetizar proteínas humanas de uso terapéutico. De la misma manera, se ha logrado la transferencia a *E. coli* de genes que codifican para enzimas y con esto modificar su metabolismo.

Se han construido cepas de *E. coli* con la capacidad de producir directamente a partir de glucosa:

- ácido quínico
- catecol
- melanina
- índigo

### **Síntesis en organismos unicelulares: levaduras**

La especie *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más utilizada en la industria alimentaria. Participa activamente en la elaboración del pan, bebidas alcohólicas y creación de nuevos productos. Este organismo no puede utilizar almidón como fuente de carbono porque carece de amilasas.

Uno de los objetivos de la Biotecnología de Microorganismos la construcción de levaduras industriales con capacidad amilolítica. En cervecería estos organismos darían lugar a cervezas tipo "light" de escaso contenido en amilodextrinas, compatibles con dietas de bajo contenido calórico.

En panadería, la biosíntesis de amilasas por levaduras permitiría su crecimiento en almidón, una fuente de carbono relativamente barata. Al hidrolizar el polisacárido presente en la harina se obtendría una mayor producción de CO<sub>2</sub>, limitando el tiempo de tratamiento de la pasta y permitiendo modificar el proceso de hinchamiento durante el horneado.

La levadura *Schwanniomyces occidentalis* (no utilizada a nivel industrial) destaca porque hidroliza la molécula de almidón de forma muy eficiente gracias a la producción y exportación de actividades  $\alpha$ -amilasa, glucoamilasa y desramificante. Se han utilizado los genes de *Sw. occidentalis* SWA1 y SWA2 que codifican para enzimas con actividad  $\alpha$ -amilasa ( $\alpha$ 1-4 glucan 4 glucanohidrolasa).

- El fenotipo amilolítico se visualiza fácilmente utilizando medios sólidos con almidón
- Un halo de hidrólisis del polisacárido rodea a la colonia que ha adquirido esta característica
- El halo se hace más nítido si tras el crecimiento celular se precipita el almidón a 4°C

## **Insectos**

### Síntesis celular

El cultivo de células de insecto tiene diversas aplicaciones:

- Investigación
- Producción comercial de insumos
- Vacunas veterinarias

Los insectos y otros artrópodos tienen patógenos naturales llamados baculovirus. Se utilizaron por primera vez como bioinsecticidas en los 40's. Tienen un rango de hospedero muy específico, siendo seguro para el ambiente.

En 1983 Smith y colaboradores propusieron su uso como vectores para la expresión de proteínas recombinantes en líneas celulares de insecto. Surgió el sistema de expresión células de insecto-baculovirus. (SCI-B)

Una de las principales ventajas de este sistema es que produce altas concentraciones de proteína recombinante, principalmente porque utiliza el promotor del gen de la poliedrina (polh), uno de los promotores más fuertes de la naturaleza.

La poliedrina puede constituir hasta un 50% de la proteína en una célula infectada por el virus silvestre.

La función de la poliedrina in vivo es proteger al virus del ambiente, pero in vitro no es necesario por lo cual se puede sustituir el gen por uno recombinante de interés sin afectar la replicación viral. Se han obtenido concentraciones de proteína recombinante de hasta 1 g/L. Se han expresado proteínas para la producción comercial de vacunas con uso veterinario, enzimas para investigación y proteínas para diagnóstico.

Usos del baculovirus:

- Se ha utilizado como vector de terapia génica
- Para expresar genes de células de riñón, de páncreas, de carcinoma de cérvix humano, de cáncer gástrico, neuronas, queratinocitos humanos, fibroblastos de médula ósea y de sarcoma osteogénico

Cuando se requiere expresar una proteína en células de insecto es necesario identificar:

- La línea celular
- El modo de cultivo
- La concentración celular del inóculo
- El medio de cultivo
- De estos aspectos dependerá el producto a expresar, ya que la producción de proteínas secretadas versus proteínas intracelulares es distinta.

Una de las principales razones para utilizar células de eucariotes superiores para la producción de proteínas recombinantes es su capacidad de realizar modificaciones posttraduccionales similares a las de las proteínas humanas (importante para medicamentos).

La N-glicosilación es la más importante e involucra decenas de enzimas. Una sola proteína tiene un perfil de glicosilación que puede incluir hasta más de 30 estructuras distintas.

En insecto, las glicoproteínas obtenidas están glicosiladas eficientemente pero las estructuras de sus azúcares son diferentes a aquellas presentes en proteínas de mamíferos (Palomares y Ramírez, 2002).

Normalmente se obtiene un muy alto porcentaje de estructuras paucimanosa, que son producto de degradación de azúcares complejos o híbridos en el aparato de Golgi.

La línea DpN1, obtenida de la mariposa monarca *Danaus plexippus*, es capaz de producir en condiciones de cultivo estándar hasta un 26% de glicanos complejos.

Además, puede producir hasta un 13% de glicanos con ácido siálico terminal, actividad rara vez observada en células de insecto.

## **Plantas**

Las plantas han sido empleadas por cientos de años para propósitos medicinales. El desarrollo de herramientas de ingeniería genética, biología molecular, cultivo de tejidos y técnicas de fermentación han permitido el crecimiento de las células bajo condiciones controladas, para la producción de materiales de alto potencial clínico e industrial.

La agricultura molecular de plantas es una nueva rama de la biotecnología donde las plantas, por medio de la ingeniería genética, son modificadas para producir proteínas terapéuticas como vacunas, citocinas, anticuerpos, factores de crecimiento y enzimas, disminuyendo riesgos de contaminación, tiempos y costos de producción.

### **Síntesis celular: plantas**

A partir de los años 80, con la producción de las primeras plantas de tabaco transgénicas se forjaron los inicios de la tecnología del DNA recombinante dando vía a la producción en 1986 y 1989 de la hormona de crecimiento humana y el primer anticuerpo en plantas transgénicas de tabaco, respectivamente.

Una planta transgénica ha sido modificada genéticamente con la incorporación en su genoma del gen foráneo que codifica una proteína específica (ejemplo, el gen del colágeno) bajo el control de un promotor constitutivo o inducible; el gen producirá el colágeno que posteriormente será aislado de un órgano específico de la planta.

Actualmente se generan plantas genéticamente modificadas no solo para uso en alimentación (incrementando su contenido nutricional en vitaminas o minerales) sino también para la producción de otros compuestos como proteínas o diversos metabolitos de uso farmacéutico y/o industrial con potencial comercial como enzimas, anticuerpos, vacunas, hormonas, proteínas sanguíneas como albuminas, citocinas, diversas moléculas de señalización, suplementos nutricionales y nuevos polímeros de interés clínico e industrial.

El conocimiento, relativa facilidad y eficiencia de transformación, la disminución de riesgos de contaminación ambiental por flujo genético y fácil escalamiento hacen que plantas como tabaco, arroz, soya, trigo, canola y cebada sean las principales plataformas empleadas para la producción de proteínas recombinantes.

Otros sistemas vegetales como papa, zanahoria, lechuga, alfalfa, arabidopsis y frijol también han sido empleados para expresión de proteínas heterólogas.

Como eucariotes superiores, la presencia de sistemas de glicosilación y mecanismos post-traduccionales de las plantas, permiten la síntesis de péptidos pequeños, polipéptidos y complejos multiprotéicos funcionales.

Las células vegetales presentan chaperonas (proteínas que ayudan a otras proteínas en su plegamiento, ensamble y movilidad dentro de la célula) homólogas a las presentes en células humanas facilitando la producción, ensamble y mantenimiento de la proteína, facilitando que una gran diversidad de biomoléculas puedan ser potencialmente producidas en sistemas vegetales.

Características como la disminución de los riesgos de contaminación por patógenos humanos, practicidad, disminución de costos y tiempos de producción hacen que las plantas se consideren como invaluable y convenientes sistemas para la producción a gran escala de múltiples proteínas recombinantes.

Factores como la cantidad de biomasa, la producción de proteína recombinante por hectárea, facilidad para la transformación y escalado son considerados en el momento de seleccionar la plataforma para la expresión de una proteína recombinante.

Las semillas de algunos cereales como maíz, arroz, cebada y trigo son consideradas como buenos órganos para la acumulación de proteínas recombinantes. Estas pueden ser almacenadas por largos periodos y gracias a la ausencia de compuestos fenólicos puede mantener la estabilidad de la proteína.

### **Síntesis celular de proteínas recombinantes**

- Sistemas de expresión en E. coli
- Sistemas de expresión en Levaduras

- Variedad de vectores y hospederos
- Expresión transitoria y expresión estable
- Expresión en Células de Mamíferos
- Producción de multicopias
- Expresión intracelular y extracelular
- Alto título en protección
- Sistemas de expresión en Baculo
- Variedad de métodos de purificación
- Variedad de vectores y hospederos
- Proporciona varias líneas celulares de insectos y vectores
- Expresión de proteínas de gran escala

# ESCALAMIENTO DE PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

## Escalamiento

Significa un cambio en la escala de volumen de proceso. El cambio generalmente viene acompañado de dificultades debido a que muchos de los parámetros de proceso se encuentran directamente relacionados con el tamaño y geometría del reactor.

El objetivo principal es cambiar la escala de una reacción biológica aumentando o disminuyendo el volumen de trabajo, evitando que se reduzca su productividad (Parra, 2004).

Dependiendo de las necesidades, el escalamiento puede hacerse desde el laboratorio a nivel de producción industrial. Es necesario determinar el tamaño mínimo a utilizarse a nivel de laboratorio o planta piloto, que posteriormente pueda trasladarse a escala industrial.

Por lo general el escalamiento consta de tres etapas:

1. A nivel de laboratorio se opera en frascos agitados (500 mL) o pequeños fermentadores, donde se buscan nuevos productos, se estudian mecanismos de control, se mejoran las cepas de producción y se ajustan las condiciones óptimas para el crecimiento del microorganismo (temperatura, pH y composición del medio de cultivo).
2. En la planta piloto (5-500 L), se selecciona un parámetro de escalamiento y se estudian efectos de aireación, agitación, temperatura y control de pH.
3. En los fermentadores de producción (5,000-400,000 L) se validan los resultados obtenidos en la planta piloto y se debe operar siguiendo un calendario fijo (Jiménez y Rojas, 2003).

El problema del paso de una escala a otra (escalamiento) es uno de los de mayor importancia no sólo en bioprocesos, sino en la industria en general.

En el caso de la fermentación aeróbica, el predecir resultados a escala de producción basados en el escalamiento de datos obtenidos en el laboratorio o en la planta piloto requiere un análisis cuidadoso de cada una de las escalas, tanto en sus variables fisicoquímicas como biológicas.

Para entender el proceso de escalamiento se deben tener en cuenta todos los fenómenos que ocurren en el biorreactor como la cinética de las reacciones, termodinámica y los fenómenos de transferencia de masa, calor y fluidos (Jiménez y Rojas, 2003).

Es necesario conocer las herramientas de trabajo que se tienen para iniciar el escalamiento. Los diferentes escenarios que pueden presentarse son (Parra, 2004; Quintero, 1981):

- Un proceso nuevo y una planta nueva
- Un proceso nuevo en un equipo existente

- La modificación del equipo existente para lograr una optimización del proceso

Lo importante es establecer relaciones entre las variables que aseguren la similitud en el medio ambiente al cambiar de escala. Desde el punto de vista de diseño se debe tratar de delinear las variables físicas (geometría, número de impulsores, etc.) del fermentador y procurar que se mantengan las mismas condiciones de mezclado, agitación y aireación, aunque esta no es una tarea fácil debido a las limitaciones dimensionales y económicas que restringen los procedimientos de escalamiento (Quintero, 1981).

La metodología del cambio de escala se fundamenta en la selección de una estrategia con el propósito de predecir el comportamiento de las variables no controladas y su consecuencia sobre el diseño global del proceso (Duarte, 1998).

Dentro de estas metodologías se encuentran los métodos:

- a) Fundamentales (ecuaciones de microbalances de transferencia de momento, masa y calor)
- b) Semifundamentales (ecuaciones simplificadas de transporte), análisis de régimen (análisis de proceso para encontrar las etapas limitantes)
- c) Análisis dimensional (basada en analogías de las ecuaciones generadas de los balances de momento, masa y calor)
- d) Reglas empíricas (de acuerdo con la experiencia se fijan condiciones que son factores limitantes del proceso)

El parámetro de operación se elige de acuerdo a cada microorganismo, sus necesidades y las limitaciones que se presentan en la fermentación y el valor en el cual se debe mantener constante se selecciona cuando el valor de la variable de respuesta se vuelve independiente de este o presenta un máximo.

El escalamiento, puede verse perturbado por las condiciones que afectan el crecimiento de los microorganismos y la formación de productos en un proceso bioquímico (temperatura, presión, pH, velocidad de agitación y concentración de nutrientes) (Duarte, 1998).

Las variables más críticas son la temperatura y la concentración de oxígeno porque al incrementar el volumen se hace más difícil la transferencia de calor y la transferencia de masa, siendo necesarios sistemas más eficientes de calentamiento, agitación y aireación (Asenjo, 1995; Shuler, 2001).

Existen diversos criterios de escalamiento, que se encuentran directamente vinculados con las variables que afectan de manera importante el sistema de producción.

- Número de Reynolds
- Tiempo de mezcla
- Velocidad en la punta del impulsor
- Potencia por unidad de volumen (P/V)
- Coeficiente volumétrico de transferencia de masa

- Similitud geométrica del reactor

Al parecer los mejores criterios para pasar de una escala a otra son la relación P/V y el kL a (Quintero, 1981). En los casos de procesos donde el producto es muy viscoso (plásticos, polisacáridos) o el crecimiento es filamentoso, la limitación la plantea la relación P/V (o la agitación) del fluido.

En general en el caso de procesos aeróbicos (como producción de amino ácidos, levaduras de panificación y antibióticos) se debe mantener constante la transferencia de oxígeno (kLa) como objetivo del escalado.

Se estima que un tercio de los proyectos de producción emplean la regla de mantener P/V, aproximadamente 20% usan la velocidad de la punta del agitador, otro 20% de las plantas industriales realiza sus escalados en base al tiempo de mezclado. El resto de los escalados utiliza la concentración de sustrato o producto limitante o inhibitorio, más comúnmente sobre la base de la concentración del oxígeno disuelto.

El desempeño de los bioprocesos es afectado por varios parámetros:

- El diseño geométrico
- Las variables de operación
- Propiedades del fluido
- Procesos de transporte
- Cinética de los organismos

Efectos que puede tener el cambio de escala:

- Disminución del rendimiento
- Cambio de cinética
- Efecto de la esterilización
- Efecto del inóculo
- Problemas de transporte (homogenización)

La información sobre la cinética referido al metabolismo del cultivo o microorganismo obtenido a pequeña escala es independiente de la escala (pH, temp, medio de cultivo, calidad de las materias primas) y no es necesario tenerlas en cuenta para determinar la estrategia de escalado (de hecho, los fenómenos de transporte son los únicos fenómenos que son dependientes del escalado).

Las reglas generales para el escalado son una extensión de las utilizadas en los reactores químicos, y están basados en aquellos parámetros que se pueden mantener constantes (números adimensionales y correlaciones empíricas).

Para asegurar la similitud, del reactor de producción con el prototipo, se debe cumplir con la condición de ser geoméricamente similares en sus límites físicos (mismo tipos de reactores) y en sus dimensiones, xej H/D.

Basado en la historia práctica del escalado, la mayoría de los procesos fermentativos para la producción de alcohol y ácidos orgánicos han seguido el concepto de la similitud geométrica y mantener constante la relación de potencia por volumen.

## **Operaciones de Recuperación**

La secuencia de etapas envueltas en la obtención de un producto o de células enteras, son las siguientes:

1. Producción del biocatalizador (célula o enzima) o starter.
2. Preparación del medio de cultivo (pretratamiento de la materia prima, adición de nutrientes, ajuste de pH).
3. Esterilización del medio de cultivo.
4. Síntesis del producto.
5. Separación del medio y del catalizador.
6. Purificación del producto.
7. Tratamiento de efluentes.

### **5. Separación del medio y del catalizador**

Se requiere conocimiento de la proteína o producto:

- De que tipo de célula proviene
- De que parte de la célula
- Qué hace esa proteína

Es necesario conocer:

- Tamaño
- Composición

El producto puede encontrarse:

- a) Dentro de la célula (producto intracelular), como en el caso de la vitamina la enzima glucosa isomerasa, los B12, productos en *Escherichia coli* obtenidos por transformación genética
- b) Liberado al medio de cultivo (extracelular), como es el caso de la penicilina, amilasa, aminoácidos y otros

En el caso de E. coli los productos son intracelulares y se hace lo siguiente:

- I. Concentrar las bacterias por filtración o centrifugación
- II. Romper las bacterias para obtener el producto, el cual queda mezclado con todos los constituyentes celulares
- III. Precipitación con sales o alcohol y/o técnicas cromatográficas, (que separan las moléculas de acuerdo a tamaño, carga eléctrica o por su afinidad por algún reactivo químico) para separar el producto

## 6. Purificación del producto

Esta etapa comprende en forma general y sucesivamente:

- a. Separación de insolubles por filtración, centrifugación, o decantación
- b. Separaciones primarias por extracción, absorción, adsorción, ultrafiltración
- c. Purificación por extracción líquido-líquido, o extracción a dos fases acuosas, o cromatografía de afinidad, y finalmente
- d. Aislamiento del producto

La solubilización es el primer paso obligado de la purificación, la proteína debe estar en solución.

Agentes que provocan un daño irreversible al producto recuperado:

- pH
- T°C
- Proteasas
- Interfase agua-aire
- Adsorción a la pared de los recipientes
- Crecimiento de microorganismos

Si el producto es extracelular, es decir, es excretado al medio por la bacteria, se encontrará relativamente puro, pero diluido en un gran volumen de agua.

Si es intracelular (no excretado al medio) estará mezclado con todos los constituyentes celulares y habrá que separarlo de ellos.

En el caso de proteína intracelular muy baja concentración y acompañada de millares de proteínas y otras macromoléculas.

En el caso de proteínas extracelulares pueden estar en baja concentración y también acompañada o ser el principal producto extracelular.

En cada caso, hay que adaptar las diversas alternativas de purificación y extracción. La estrategia es remover del organismo la proteína pura en la menor cantidad de pasos con la menor pérdida de actividad posible.

Métodos de purificación:

Los métodos se utilizan en etapas. Serie de pasos independientes que utilizan las características fisicoquímicas de las proteínas para separarlas de otras proteínas o de otras sustancias.

Métodos de purificación basado en las siguientes propiedades proteicas:

- Tamaño
- Solubilidad
- Carga
- Adsorción
- Afinidad

Característica Procedimientos

- Tamaño. Dialisis – ultrafiltración
- .Electroforesis en gel
- .Cromatografía de exclusión molecular
- .Ultracentrifugación
- Solubilidad. Precipitación con Sales
- .Precipitación con solventes orgánicos
- .Precipitación por pH
- Polaridad. Cromatografía de absorción
- .C. En papel
- .C. En fase reversa
- .C. De interacción hidrofóbica
- Carga. Cromatografía de intercambio iónico
- .Electroforesis
- .Isoelectroenfoque
- Selectividad. Cromatografía de afinidad

Métodos de purificación por tamaño:

**Diálisis.** Utiliza membrana semipermeable donde las moléculas de agua y las de solutos pequeños la atraviesen y las proteínas son retenidas

**Ultrafiltración.** Se utiliza una membrana semipermeable que retiene las proteínas. La presión o fuerza centrífuga se usa para separar por filtración el medio acuoso y las moléculas de tamaño pequeño.

**Ultracentrifugación.** Los componentes de la mezcla se separan por:

- Peso

- Tamaño
- Densidad
- Forma

Centrifugación en gradiente de densidad son gradientes continuos, por ejemplo, de sacarosa.

Recuperación del material: se perfora el tubo o bien se congela y se corta en capas

### **Métodos de purificación por solubilidad:**

Muy utilizados en los primeros pasos de la purificación. Mantiene nativa a la proteína. Redisolucion sin perdida de actividad.

La composición de aa de la proteína le otorga un comportamiento diferente. La solubilidad de la proteína depende:

- Interacción intraproteína
- Interacción proteína-proteína
- Interacción proteína-disolvente

Las interacciones mencionadas dependen de:

- pH
- Fuerza iónica
- Disolvente
- Temperatura

La carga neta de las proteínas depende de:

- I. El contenido de aa ácidos y de aa básicos.
- II. El valor del pH donde la carga neta de la proteína es cero
- III. pI (punto isoelectrico)
- IV. Solubilidad es mínima

Ej: .contenido de aa ácidos .pI bajo (4-5)

Al aumentar la [sales] la .proteina se rodea de con iones más soluble por > interacción proteína-solvente.

Las proteínas en H<sub>2</sub>O tienden a formar COMPLEJOS electrostáticos que precipitan.

0-40°C >T > solubilidad 40-50°C inestabilidad DESNATURALIZAN (solubilidad)

Con anticuerpos monoclonales hay una gran especificidad y sensibilidad.

Sin embargo, esta última propiedad trae problemas en el caso de productos lábiles, ya que la separación final del complejo antígeno-anticuerpo es difícil de romper y requiere de tratamientos drásticos y muchas veces denaturalizantes.

## **7. Tratamiento de efluentes**

Si bien no tiene una relación directa con el producto, que es la razón de ser de la industria de bioprocesos, representa una etapa imprescindible porque es fundamental controlar la calidad del efluente que sale de la fábrica y que es enviado generalmente a un curso de agua, sea un canal, arroyo, un río o al mar.

## **REFERENCIAS**

Bolívar Zapata Francisco. Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI: retos y oportunidades, Volume 1. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 2002 - 339 pag.

Guerrero Germán Patricia, Rosa María Montesinos Cisneros, ArmandoTejeda Mansir. Bioprocesos Para la Producción de DNA Plasmídico Para Uso Médico: Análisis Y Diseño. Lap Lambert Academic Publishing GmbH KG, 2010. 144 pag.

Manacorda A. M., Cuadros D. P y Álvarez A. S. MANUAL PRÁCTICO DE MICROBIOLOGÍA - Tomo I: Microbiología Ambiental I. 2007.

Possani Lourival D. (2003). The past, present, and future of biotechnology in Mexico. Nature Biotechnology 21, 582 - 583