

Lunes 13 de Octubre			
Ingeniería de Cultivos Celulares			
8:30-10:00	Fundamentos de Cultivos celulares ✓	Fernando Acevedo EIB, PUCV	OK
10:00-10:30	Café		
10:30-11:15	Cultivo por Lotes Alimentados ✓	Juan Carlos Gentina EIB, PUCV	OK
11:15-12:15	Agitación en reactores microbianos ✓	Fernando Acevedo EIB, PUCV	OK
12:15-13:00	Bioremediación de minerales <i>pend. del curso</i>	Juan Carlos Gentina EIB, PUCV	OK
13:00-15:00	Almuerzo		
15:00-15:45	Estrategias de manipulación ambiental y genética en cultivos de células animales ✓	Claudia Altamirano EIB, PUCV	OK
15:50-16:35	Desafíos a la ingeniería en la tecnología del cultivo de células animales <i>pend.</i> ✓	Ricardo Medronho EQ, UFRJ, Brasil	OK
16:35-17:00	Café		
17:00-17:45	Desarrollo de Productos Comerciales a partir de Cultivos de Células Mamíferas <i>pend.</i>	Ricardo Kratje UNL, Argentina	OK
17:50-18:35	Análisis de Control y Modulación Metabólica <i>pend.</i>	Raúl Conejeros EIB, PUCV	OK

Martes 14 de Octubre			
Biotecnología Ambiental			
8:30-10:00	Biología Ambiental : Tecnología de Punta Para un crecimiento sustentable ✓	Rolando Chamy EIB, PUCV	OK
10:00-10:30	Café		
10:30-11:15	Degradación de Compuestos Xenobióticos ○	Óscar Monroy, UNAM, México	OK
11:15-12:15	Eliminación Biológica de Nutrientes <i>pend.</i>	M.C. Schiappacasse EIB, PUCV	OK
12:15-13:00	Tratamiento Anaerobio de Efluentes con alto contenido de sulfato ✓	Lorna Guerrero UTFSM	OK
13:00-15:00	Almuerzo		
15:00-15:45	Tratamiento Biológico de Emisiones Industriales Gaseosas <i>pend.</i>	Germán Aroca EIB, PUCV	OK
15:50-16:35	Biorremediación de Suelos Contaminados con Metales Pesados ✓	Rolando Chamy EIB, PUCV	OK
16:35-17:00	Café		
17:00-17:45	Sistemas Avanzados para el Tratamiento de Desechos Domiciliarios <i>pend.</i>	Marcel Szantó, ICC, PUCV	X
17:50-18:35	Digestión Anaerobia de Desechos Sólidos ✓	Paola Poirrier, EIB, PUCV	OK

Miércoles 15 de Octubre

8:30-10:30	Taller "Ingeniería de Cultivos Celulares"	Juan Carlos Gentina Coordinador
10:30-11:00	Café	
11:00-13:00	Taller "Biotecnología Ambiental"	Rolando Chamy Coordinador

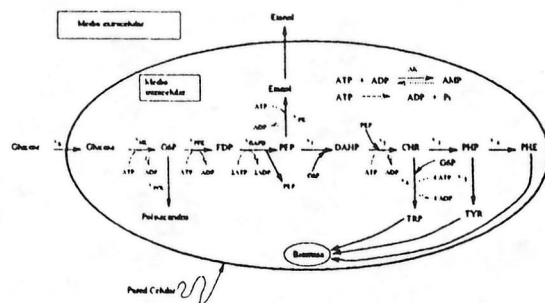
Jueves 16 de Octubre
Biocatálisis Enzimática

8:30-10:00	Fundamentos de Biocatálisis ✓	Andrés Illanes EIB, PUCV OK.
10:00-10:30	Café	
10:30-11:15	Enzimas en Reacciones de Síntesis en Fase Gaseosa ✓	Eduardo Bárzana UNAM, México. OK.
11:15-12:15	Enzimas en Reacciones de Síntesis en Medio Orgánico ✓	Andrés Illanes EIB, PUCV OK.
12:15-13:00	Innovaciones en la Aplicación de Enzimas	María Elvira Zúñiga EIB, PUCV
13:00-15:00	Almuerzo	
15:00-15:45	Hidrólisis Enzimática de Biopolímeros ✓	Andrea Ruiz EIB, PUCV
15:50-16:35	Inmovilización de Células para la Producción de Metabolitos	Vitalis Moritz Profesor Extraordinario, EIB, PUCV OK.
16:35-17:00	Café	
17:00-18:30	Taller "Biocatálisis Enzimática"	Andrés Illanes Coordinador X

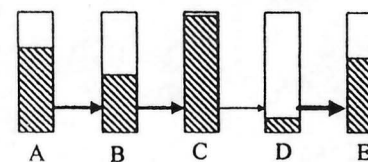
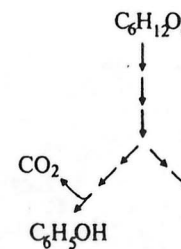
Viernes 17 de Octubre
Bioseparaciones

8:30-10:00	Fundamentos de Bioseparaciones ✓	Germán Aroca EIB, PUCV
10:00-10:30	Café	
10:30-11:15	Separación de Esteroides por Destilación Molecular ✓	Andrés Markovits EIB, PUCV
11:15-12:15	Recuperación de Enzimas Intracelulares ✓	María Elvira Zúñiga EIB, PUCV
12:15-13:00	Modelación de Cromatografía ✓	María Elena Lienqueo DIP, UChile
13:00-15:00	Almuerzo	
15:00-15:45	Recuperación y Purificación de Proteínas Terapéuticas ✓	Marina Etcheverrigaray UNL, Argentina
15:50-16:35	Recuperación de Proteínas por Membranas de Afinidad ✓	Leda Castillo COPPE, UFRJ, Brasil
16:35-17:00	Café	
17:00-18:30	Taller "Bioseparaciones"	Germán Aroca Coordinador X

Ingeniería de Cultivos Celulares



Esquema de célula y su relación con el medio intra y extracelular



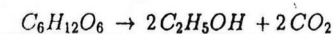
Análisis de control y modulación metabólica

R. Conejeros



VII Curso Latinoamericano de Biotecnología
Escuela de Ingeniería Bioquímica,
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

Valparaíso, 12 de Octubre de 2003

Balances de masa basados en *estequiometría*

Ejemplo

$$v = \frac{k \cdot E \cdot S \cdot A}{(K_S + S) \cdot (K_A + A) \cdot \left(1 + \frac{I}{K_I}\right)}$$

$$\epsilon_A = \frac{K_A}{K_A + A}$$

ahora si se expresa v como :

$$v = k \cdot E \cdot S^\alpha \cdot A^\beta \cdot I^\gamma$$

$$\epsilon_A = \beta$$

si ambas expresiones de la velocidad de reacción son equivalentes, entonces $\beta = \frac{K_A}{K_A + A}$

Notar que $C = 1$

Un punto de vista diferente

Ley de acción de masas

$$v = k \prod_{i=1}^n X_i$$

Ejemplo

$$v = k \cdot E \cdot S^\alpha \cdot A^\beta \cdot I^\gamma$$

$$v = k \cdot E \cdot S^{0.6} \cdot A^{1.2} \cdot I^{-0.3}$$

Balances de masa para cada metabolito

$$\dot{x} = Av - \mu x$$

Análisis de Flux (flujo molar)

$$v = A^{-1}(\dot{x} + \mu x)$$

Estado pseudo-estacionario

$$Av - \mu x = 0$$

Se puede adaptar la expresión de Michaelis-Menten a la ley de acción de masas

variables auxiliares:

$$y_1 = K_A + A$$

$$y_2 = K_S + S$$

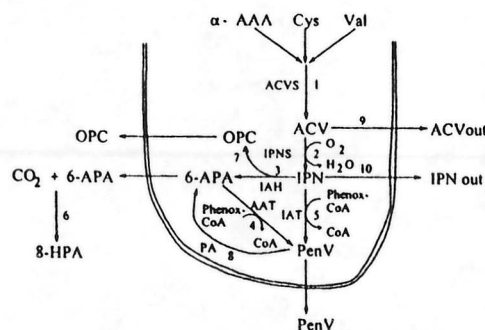
$$y_3 = 1 + \frac{I}{K_I}$$

entonces:

$$v = k \cdot E \cdot S \cdot A \cdot y_1^{-1} \cdot y_2^{-1} \cdot y_3^{-1}$$

$$\begin{aligned}
 v_1 &= \frac{k_1 \cdot X_{ACVS}}{\left(\frac{K_{AAA}}{AAA} + \frac{K_{CYS}}{CYS} + \frac{K_{VAL}}{VAL}\right) \cdot \left(1 + \frac{ACV}{K_{ACV}}\right)} \\
 v_2 &= \frac{k_2 \cdot X_{IPNS} \cdot ACV \cdot O_2}{\left(ACV + K_m \cdot \left(1 + \frac{GSH}{K_i}\right)\right)} \\
 v_3 &= \frac{k_3 \cdot X_{AT} \cdot IPN}{(IPN + K_{m_{IPN}})} \\
 v_4 &= \frac{k_4 \cdot X_{AT} \cdot 6APA \cdot PoaCoo}{(6APA \cdot PoaCoo + PoaCoo \cdot K_{m_{6APA-Poa}} + 6APA \cdot K_{m_{Poa}})} \\
 v_5 &= \frac{k_5 \cdot X_{AT} \cdot IPN \cdot PoaCoo}{(IPN \cdot PoaCoo + K_{m_{IPN-Poa}} \cdot PoaCoo + IPN \cdot K_{m_{Poa}})} \\
 v_6 &= k_6 \cdot 6APA \\
 v_7 &= \frac{k_7 \cdot X_{AT} \cdot PenV}{(K_{PenV} + PenV)} \\
 v_8 &= k_8 \cdot ACV \cdot (ACV - ACV_{OUT}) \\
 v_{10} &= k_{10} \cdot (IPN - IPN_{OUT})
 \end{aligned}$$

Para la ruta metabólica de la producción de Penicilina V de acuerdo a Pissara *et al.* 1996, se tiene entonces el siguiente sistema de ecuaciones:



$$\begin{aligned}
 \frac{dV}{dt} &= F \\
 \frac{d(xV)}{dt} &= \mu \cdot x \cdot V \\
 \frac{d(sV)}{dt} &= F \cdot s_F - \frac{\mu \cdot x \cdot V}{Y}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{d(ACV)}{dt} &= v_1 - v_2 - v_8 - \mu \cdot ACV \\
 \frac{d(IPN)}{dt} &= v_2 - v_3 - v_5 - v_{10} - \mu \cdot IPN \\
 \frac{d(6APA)}{dt} &= (v_3 - v_4 - v_6 + v_8) \cdot \rho_c \cdot x \\
 \frac{d(PenV)}{dt} &= (v_4 + v_5 - v_8) \cdot \rho_c \cdot x \\
 \frac{d(ACV_{OUT})}{dt} &= v_8 \cdot \rho_c \cdot x \\
 \frac{d(IPN_{OUT})}{dt} &= v_{10} \cdot \rho_c \cdot x \\
 \frac{d(8HPA)}{dt} &= v_6 \\
 \frac{d(OPC)}{dt} &= v_7 \cdot \rho_c \cdot x
 \end{aligned}$$

$$DAHP = v_1 - v_2 - v_{4p}$$

$$CHR = v_2 - v_3 - v_6 - v_{5p}$$

$$PHP = v_3 - v_4 - v_5 - v_{6p}$$

$$PHE = v_4 - v_{7p} - v_{3p}$$

$$TYR = v_5 - v_{2p} - v_{8p}$$

$$TRP = v_6 - v_{1p} - v_{9p}$$

$$C_1 = 0.723$$

$$C_2 = -0.516$$

$$C_3 = -0.102$$

$$C_4 = -0.504$$

$$C_5 = 0.307$$

$$C_6 = 1.092$$

$$\mu = \frac{0.014 \cdot A \cdot PHE \cdot TYR \cdot TRP \cdot PEP}{(0.25 + A)(18 + PHE)(13 + TYR)(5 + TRP)(0.005923 + PEP)}$$

$$A = \frac{ATP + 0.5 ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

Aminoácidos incorporados en biomasa

$$v_{1p} = 54 \mu \quad v_{2p} = 131 \mu \quad v_{3p} = 176 \mu$$

Dilución por crecimiento de biomasa

$$v_{4p} = DAHP \mu \quad v_{5p} = CHR \mu \quad v_{6p} = PHP \mu$$

$$v_{7p} = PHE \mu \quad v_{8p} = TYR \mu \quad v_{9p} = TRP \mu$$

$$PHE = 263.79$$

$$TYR = 321.82$$

$$TRP = 81.89$$

$$DAHP = 3.41$$

$$CHR = 30.99$$

$$PHP = 0.61$$

$$\begin{bmatrix} C_1 \\ C_2 \\ C_3 \\ C_4 \\ C_5 \\ C_6 \end{bmatrix}^T \begin{bmatrix} 1 & \epsilon_{dahp}^1 & 0 & \epsilon_{tyr}^1 & \epsilon_{trp}^1 & \epsilon_{phe}^1 \\ 1 & \epsilon_{dahp}^2 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & \epsilon_{tyr}^3 & 0 & \epsilon_{phe}^3 \\ 1 & 0 & \epsilon_{dahp}^4 & 0 & 0 & \epsilon_{phe}^4 \\ 1 & 0 & \epsilon_{dahp}^5 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & \epsilon_{trp}^6 & 0 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
Laboratorio de Cultivos Celulares

Desarrollo de Productos Comerciales a partir de Cultivos de Células Mamíferas

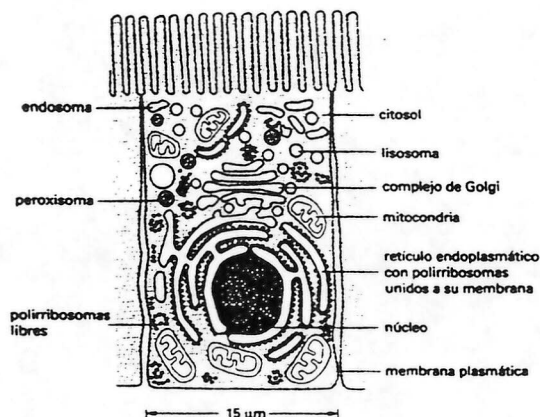
Dr. Ricardo Kratje

RESUMEN:

1. El proceso de síntesis de proteínas.
2. Glucosilación: principal modificación de proteínas secretadas en células eucariotes.
3. Factores que afectan la glucosilación:
 - Secuencia de aminoácidos en sí misma.
 - Célula huésped: ¿Por qué cultivos de células mamíferas?
 - Entorno celular y método de cultivo.
4. Efectos de la glucosilación sobre la bio-actividad, la farmacocinética y la antigenicidad.

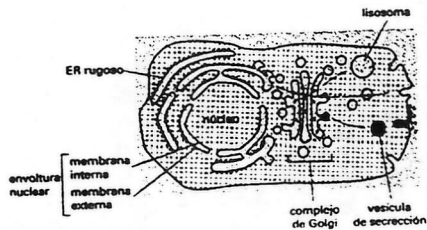
Laboratorio de Cultivos Celulares, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral,
C.C. 242 - (26000ZAA) Santa Fe, Pcia. Santa Fe, ARGENTINA.
Tel./Fax: + 54 (0) 342 - 455 29 28
E-mail: rkratje@fcb.unl.edu.ar

Principales compartimientos intracelulares de una célula animal

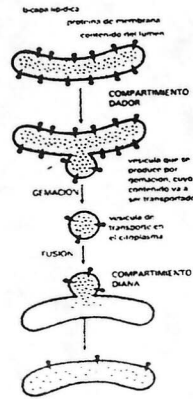


Tomado de Alberts et al (1996) Biología Molecular de LA CÉLULA (7ª Ed.) Ed. Omega, Barcelona, España.

Relaciones topológicas entre los compartimientos de una célula eucariota

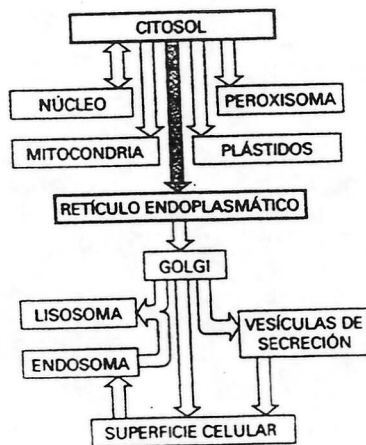


Durante el transporte de las vesículas se mantienen la polaridad de la membrana



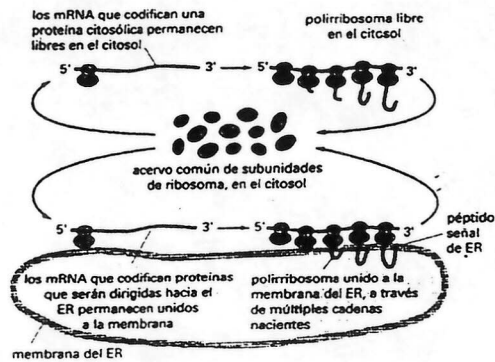
Tomado de Alberts et al (1996) *Biología Molecular de LA CÉLULA* (3ª Ed.) Ed. Omega, Barcelona, España.

“Mapa de carreteras” del tráfico proteico



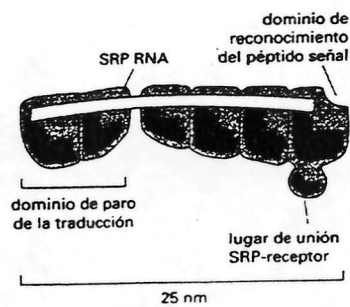
Tomado de Alberts et al (1996) *Biología Molecular de LA CÉLULA* (3ª Ed.) Ed. Omega, Barcelona, España.

Ribosomas libres y unidos a membrana



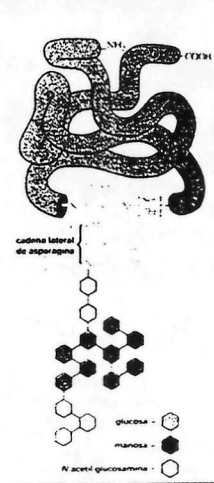
Tomado de Alberts et al (1996) *Biología Molecular de LA CÉLULA* (3ª Ed.) Ed. Omega, Barcelona, España.

Partícula de reconocimiento de la señal (SRP)



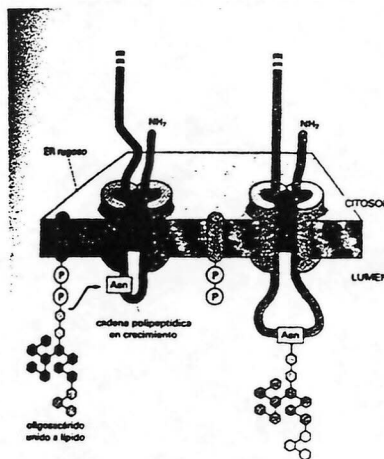
Tomado de Alberts et al (1996) *Biología Molecular de LA CÉLULA* (3ª Ed.) Ed. Omega, Barcelona, España.

Estructura del N-oligosacárido unido a asparagina que es añadido en la membrana del ER rugoso



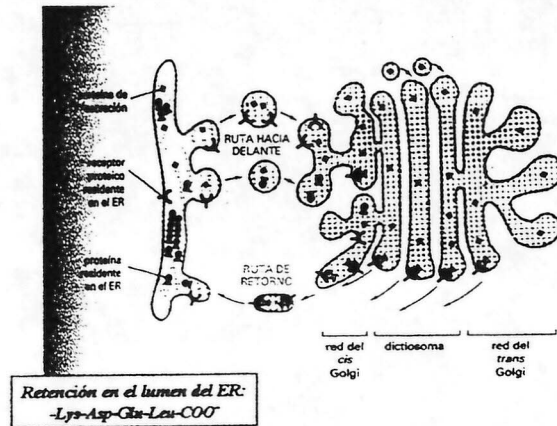
Tomado de Alberts et al (1996) Biología Molecular de LA CÉLULA (3ª Ed.) Ed. Omega, Barcelona, España.

Glucosilación de una proteína en el ER



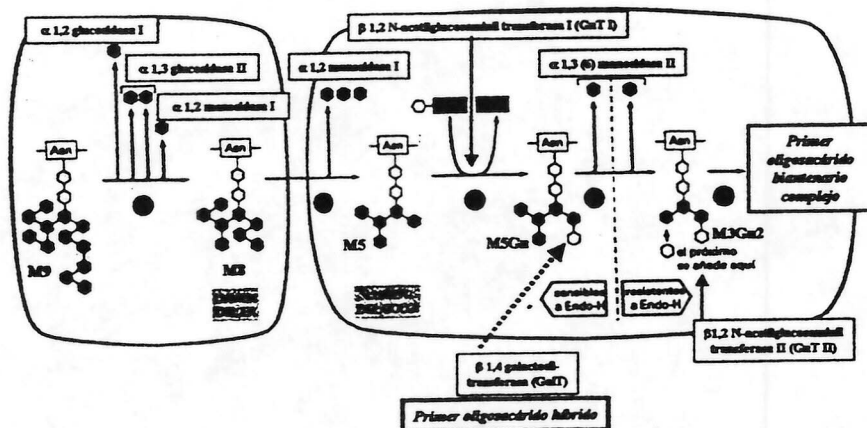
Tomado de Alberts et al (1996) Biología Molecular de LA CÉLULA (3ª Ed.) Ed. Omega, Barcelona, España.

Mecanismo utilizado para retener las proteínas en el ER.
El ER como "control de calidad" por BiP



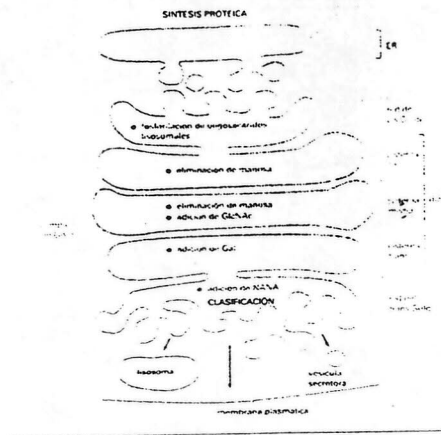
Tomado de: Alberts et al (1996) Biología Molecular de LA CÉLULA (3ª Ed.) Ed. Omega, Barcelona, España.

Procesamiento de los oligosacáridos en el ER y en el complejo de Golgi



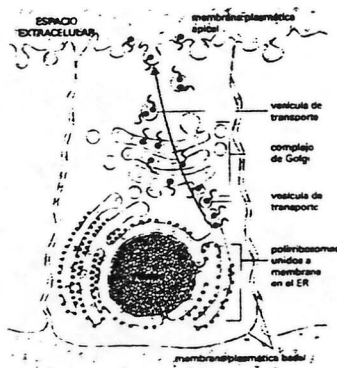
Adaptado de: Alberts et al (1996) Biología Molecular de LA CÉLULA (7ª Ed.) Ed. Omega, Barcelona, España.

Compartimentación funcional del complejo de Golgi



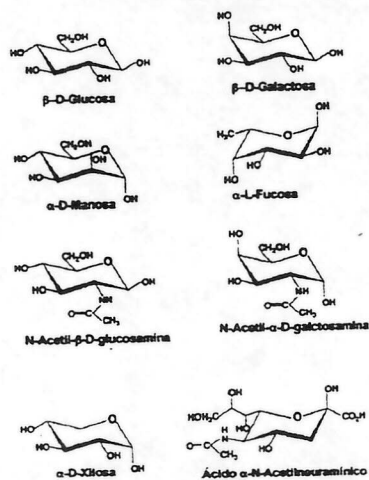
Tomado de Alberts et al (1996) Biología Molecular de LA CÉLULA (3ª Ed.) Ed. Omega, Barcelona, España.

Los azúcares de las glucoproteínas de membrana y de los glucolípidos están orientados hacia fuera del citosol

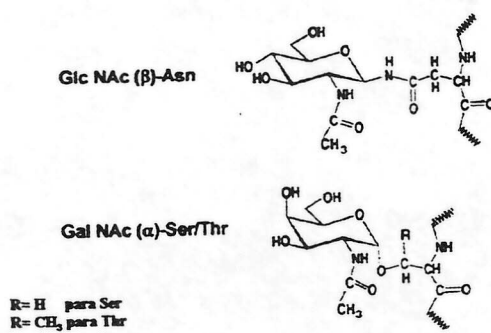


Tomado de Alberts et al (1996) Biología Molecular de LA CÉLULA (3ª Ed.) Ed. Omega, Barcelona, España.

Estructuras de monosacáridos encontradas en células eucariotas

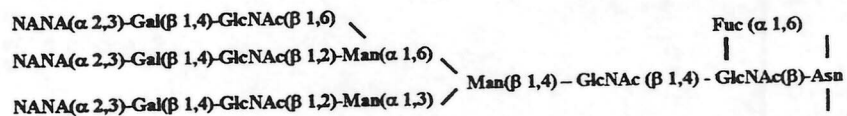


Los oligosacáridos se unen a las proteínas mediante enlaces N- y O- glucosídicos

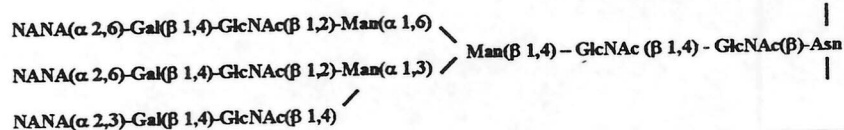


Estructuras de N-oligosacáridos más comunes

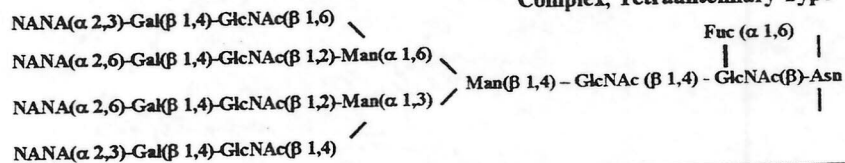
Complex, Tri'-antennary Type



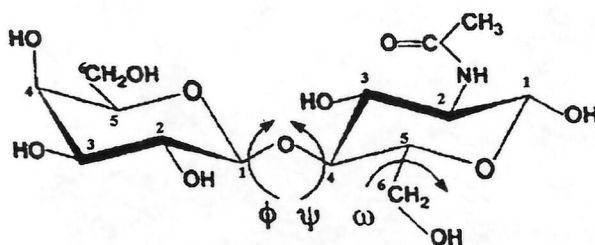
Complex, Triantennary Type



Complex, Tetraantennary Type



Conformación de oligosacáridos



Definición de los ángulos de torsión para la unión Gal β 1-4 GlcNAc:

ϕ = H1-C1-O1-CX

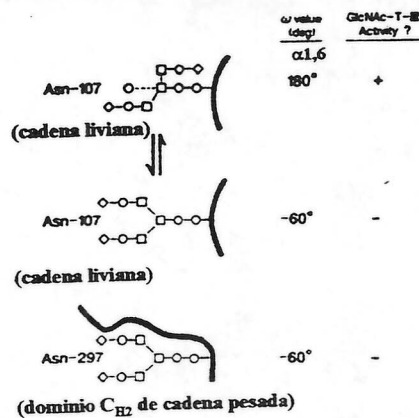
ψ = C1-O1-CX-HX

ω = H5-C5-C6-O6

Adaptado de Savage (1977) *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production* (Hamer & Wagner, eds.) Walter de Gruyter, Berlin, Alemania.

2 - ¿Cómo afecta la secuencia de aminoácido en sí misma la ocupación de un sitio?

c) Arreglos espaciales del péptido alrededor del *sequon*



Carver & Cummings (1987) *Pure Appl. Chem.* 59: 1465-1476.

2 - ¿Cómo afecta la secuencia de aminoácido en sí misma la ocupación de un sitio?

d) Consistencia de estructura básica de oligosacáridos en diferentes células

Proteína	Sitio	Línea Celular			
		A	B	C	D
EPO (3N-; 10-)	Asn-83	Tetra-antenario (EPO urinaria)	Tetra-antenario (rec-BHK)	Tetra-antenario (rec-CHO)	-
TPA (3N-; 10-) Asn-184 y 448	Asn-117	Elevada manosa (Melanoma Bowes)	Elevada manosa (Fibroblastos de Colon)	Elevada manosa (rec-CHO)	Elevada manosa (rec-C127 Murina)
Ovalbúmina (2N-) Asn-312	Asn-293	Híbrido / Elevada manosa (oviducto)	Híbrido / Elevada manosa (rec-L-célinas marinas)	-	-
IFN- β 1 (1N-)	Asn-80	Biantenaria (fibroblasto humano)	Biantenaria (rec-tumor pulmonar humano)	Biantenaria (Rec-CHO)	Biantenaria (rec-cél. C127 murinas)
IL-2 (10-)	Thr-3	S36(S6)Gal Nac* (Linfocitos periféricos)	S36(S6)Gal Nac (Cél. Jurkat)	S36(S6)Gal Nac (rec-CHO)	-

* NANA (α 2,3) - Gal (β 1,3) - Gal NAc (α) y NANA (α 2,3) - Gal (β 1,3) - [NANA (α 2,6)] Gal NAc (α)

Tamada Cummings (1991) *Glycobiology* (1) 2: 115-136.

Factores que afectan la glucosilación

1. Disponibilidad de todos los precursores y nivel de expresión de las enzimas
2. La secuencia de aminoácido en sí misma:
 - a) Secuencia consenso (*sequon*) de N-gluco proteínas
 - b) Posición del *sequon* en la cadena polipeptídica
 - c) Arreglos espaciales del péptido alrededor del *sequon*
 - d) Consistencia de estructura básica de oligosacáridos en diferentes células
 - e) ¿Cómo se afecta la O-glucosilación?
3. Tipo celular
4. Entorno extracelular y método de cultivo

Sistema de expresión y sus capacidades de glucosilación

PROCARIOTAS

EUCARIOTAS

INSECTOS

PLANTAS

MAMÍFEROS

LEVADURAS

Comparten las características de procesamiento de los oligosacáridos tipo N en el RE: precursor $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -PP-Dol y truncación a $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$

• Células de insectos:

Alto nivel de expresión y alta velocidad de crecimiento.

Escasa capacidad de procesamiento más allá de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (GT casi ausentes).

Incapaces de sintetizar oligosacáridos complejos tipo N o sialilados tipo O.

• Levaduras:

Precursor $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -PP-Dol. En *S. cerevisiae* sólo un residuo Man es clivado para formar $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$.

En la mayoría de levaduras y hongos filamentosos: oligosacáridos tipo alta Man (hasta 50 residuos Man)

• Plantas:

Los oligosacáridos no poseen ácido siálico y frecuentemente presentan Xil (altamente inmunogénicos)

Control del procesamiento de oligosacáridos en cultivos de células de mamífero	
Célula Huésped:	
Diferencias en la actividad relativa de las enzimas glucosiltransferasas en diversas especies y tejidos determinan variaciones de los oligosacáridos presentes. Respecto al de células humanas se encontraron las siguientes diferencias:	
Cél. de cabra, oveja, vaca:	Ácido siálico terminal es N-glicosil-neuramínico (NGNA) en lugar de NANA
Células murinas:	• Expresan la enzima α 1,3 galactosil transferasa, que genera residuos Gal (α 1,3)-Gal (β 1,4) – GlcNAc altamente inmunogénicos. • Carecen de la enzima α 2,3 sialil transferasa, generándose únicamente la sialilación mediante uniones α 2,6 a la Gal terminal.
Células de hámster: (CHO, BHK)	• Carecen de la enzima α 2,6 sialil transferasa, generándose únicamente la sialilación mediante uniones α 2,3 a la Gal terminal. • Incapaces de sulfatar residuos Gal Nac (importante p/hormonas) • Carece la enzima α 1,3 fucosil transferasa, de manera de no formarse la unión de fucosa periférica (fuc α 1,3-GlcNAc) • Carece de la enzima β-1,4 –N-acetilglucosaminil transferasa III, de manera de no formarse la unión de GlcNAc al core de manosa bisectante.

Factores que afectan la Glucosilación

1. Disponibilidad de todos los precursores y nivel de expresión de las enzimas
2. La secuencia de aminoácido en sí misma:
 - a) Secuencia consenso (*sequon*) de N-gluco proteínas
 - b) Posición del *sequon* en la cadena polipeptídica
 - c) Arreglos espaciales del péptido alrededor del *sequon*
 - d) Consistencia de estructura básica de oligosacáridos en diferentes células
 - e) ¿Cómo se afecta la O-glucosilación?
3. Tipo celular
4. Entorno extracelular y método de cultivo

Efectos de la composición química del cultivo sobre la glucosilación

- Limitación de Glucosa:
 - ✓ Ocupación de sitios reducida para cadenas livianas de IgG
Stalk & Heath (1979) Arch. Biochem. Biophys. 192: 599-609.
 - ✓ Glucosilación anormal de proteínas virales en células CHO
Davidson & Hunt (1985) J. Gen. Virol. 66: 1457-1468.
 - ✓ Aumento de isoformas no glucosiladas de rhIFN- γ en células CHO
Hayter et al. (1993) Biotech. Bioeng. 42: 1077-1085.
- Limitación de O_2 :
 - ✓ Disminución de Fc-galactosilación de MAbs secretados por hibridomas
Kunkel et al. (1998) J. Biotechnol. 62: 55-71.
 - ✓ Disminución de la sialilación de rhFSH en células CHO
Chotigeat et al. (1994) Cytotechnol. 15: 217-221.

Efectos de la composición química del cultivo sobre la glucosilación

- Adición de suplementos:
 - ✓ ManNAc aumenta la sialilación de rhIFN- γ en células CHO
Gu & Wang (1998) Biotechnol. Bioeng. 58: 642-648.
 - ✓ Butirato aumenta la α 2,6 sialilación de rhIFN- γ en células CHO
Lamotte et al. (1999) Cytotechnol. 29: 55-64.
- Aumento de Amonio:
 - ✓ Aumento de la proporción de rhIFN- γ biglucosilado en células CHO.
Castro et al. (1995) Biotech. Appl. Biochem. 21: 87-100.
 - ✓ Aumento de antenaridad y disminución de ácido siálico de rhIL-Mu6 en células BHK
Cawltzsek et al. (1998) Biotechnol. Bioeng. 57: 512-528.
 - ✓ Disminución de sialilación de O-Glucanos en rhG-CSF de células CHO
Andersen & Goeche (1995) Biotechnol. Bioeng. 47: 96-105.
 - ✓ Disminución de sialilación y antenaridad en rhEPO de células CHO
Yang & Butler (2000) Biotechnol. Bioeng. 68: 370-380.

Células huésped con nuevas propiedades de glucosilación por incorporación de genes de glucosil-transferasas

➤ α 2,6 Sialil transferasa (α 2,6 ST):

- ✓ Cél. BHK se produce un aumento del nivel de sialilación con mezclas de α 2,3 / α 2,6 NANA-oligosacáridos en rhAT-III, rhEPO y β -Trace Protein. Grabenhorst *et al.* (1995) *Eur. J. Biochem.* 232: 718-725.
- ✓ Cél. CHO se produce un aumento del 100% de la sialilación con un 68% de α 2,6 NANA en rhIFN- γ . Lamotte *et al.* (1999) *Cytotechnol.* 29: 55-64.

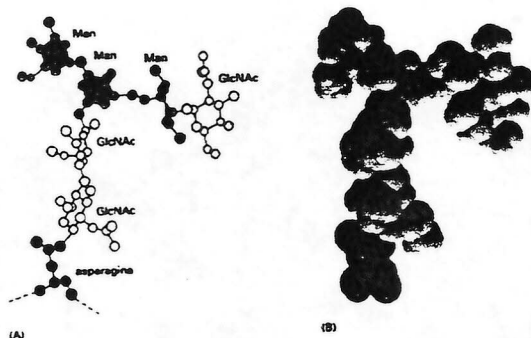
➤ α 1,3 Fucosil transferasa (α 1,3 FT):

- ✓ Cél. BHK el 50% de β -Trace Protein presenta uniones periféricas α 1,3 de fucosa a GlcNAc, pero con fuerte disminución del nivel de sialilación. Grabenhorst *et al.* (1999) *Glycoconjugate J.* 16: 81-97.

➤ β 1,4 -N-acetil glucosaminil transferasa III (GnT III):

- ✓ Cél. CHO se observó producción de oligosacáridos bisectantes en rhIFN- β . Shurkati *et al.* (1998) *Biotechnol. Prog.* 14: 189-192.
- ✓ Cél. CHO la presencia de glucoformas bisectantes en la región Fc de una IgG1 quimérica antineuroblastoma presentó mayor citotoxicidad medida por anticuerpos (ADCC). Umaña *et al.* (1999) *Nature Biotech.* 17: 176-180.

Estructura tridimensional de un pequeño N-oligosacárido y su rol biológico

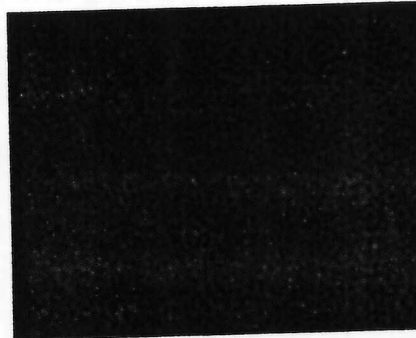
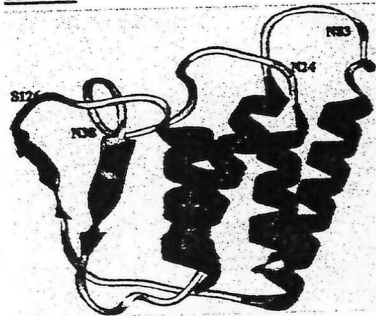


Tomado de Alberts *et al.* (1996) *Biología Molecular de LA CÉLULA* (3ª Ed.) E.A. Omega, Barcelona, España.

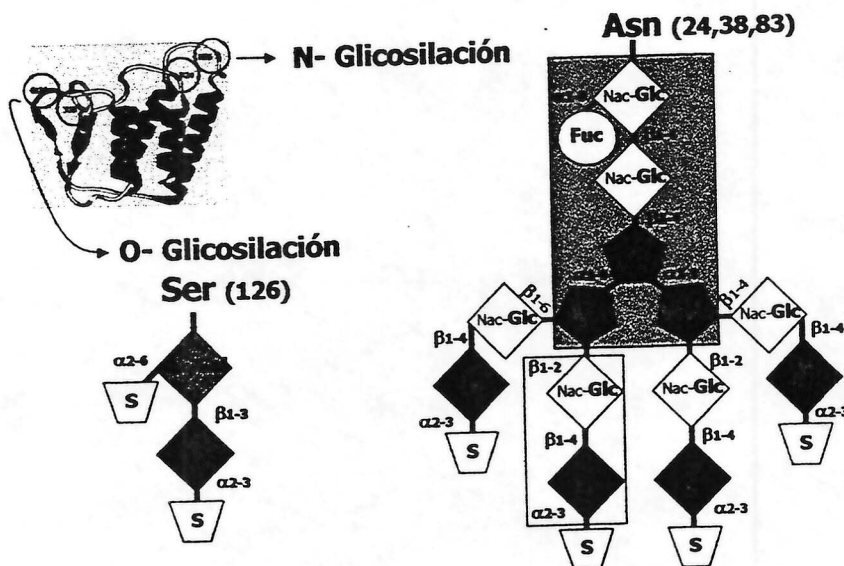
Efectos de la glucosilación sobre la bio-actividad

II) Via alteración de la estructura primaria de oligosacáridos:

- ✓ Actividad específica de la sacarosa-isomaltasa de microvellosidades intestinales aumenta con la presencia de oligosacáridos de tipo complejo respecto a la de alta manosa.
Sjostrom et al. (1985) J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 4: 980-983.
- ✓ Hormonas gonadotróficas (LH y FSH) y tirotróficas (TSH) tienen diferente actividad biológica dependiendo de su carga debida a sialilación y sulfatación.
Baezinger & Green (1988) Biophys. Acta 947: 287-306.
- ✓ rhEPO



Estructura de carbohidratos de EPO

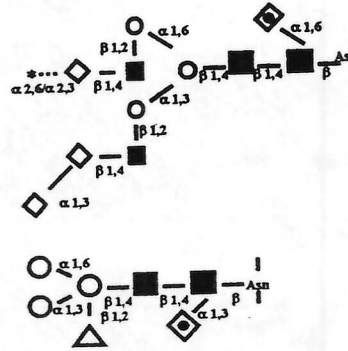


Immunogenicidad

- Carbohidratos modulan:
1. Definiendo todo o parte de un epítopo
 2. Enmascarando potenciales sitios antigénicos

1. Definiendo todo o parte de un epítopo:

- Epítopo Gal (α 1,3) – Gal de glucoproteínas de cél. murinas C127
- Epítopo Xyl (β 1,2) – Man
- Epítopo Fuc (α 1,3) – GlcNAc de glucoproteínas de plantas



~1% de IgG humana del suero.

Callis et al. (1987) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84: 1369-1373.

Immunogenicidad

2. Enmascarando potenciales sitios antigénicos

hGM-CSF:

Epítopo próximo al sitio de O-glucosilación de GM-SCF enmascarado:

- 31% pacientes tratados con rhGM-CSF de levadura no neutralizantes generaron Acs.
- Suero de pacientes de inmunorreactividad + con rhGM-SCF de E.coli y levadura, pero no de células CHO.

Gribben et al. (1990) *Lancet* 335: 434-437.

- Detección de anticuerpos neutralizantes.

Oggero Eberhardt et al. (2001) *Animal Cell Technology*, 23-25.

hIFN- β :

- Diferencias inmunológicas entre hIFN- β natural, rec. E.coli y rec CHO.

Colby et al. (1984) *J. Immunol.* 133: 3091-3095.

hEPO:

- Cambios sutiles del proceso de producción pueden modificar la immunoantigenicidad.
- Aparición de allo-Ac anti-EPO en pacientes de Europa y Australia (EPREX) con aparición de aplasia roja pura. Diferencia: administración subcutánea y reemplazo de HSA por Tween 80/glicerol
- Schellkens (2003) 18th ESACT Meeting O-5.11.

Efectos de la glucosilación sobre la Farmacocinética

- Receptor del sistema RET para Man/GlcNAc.

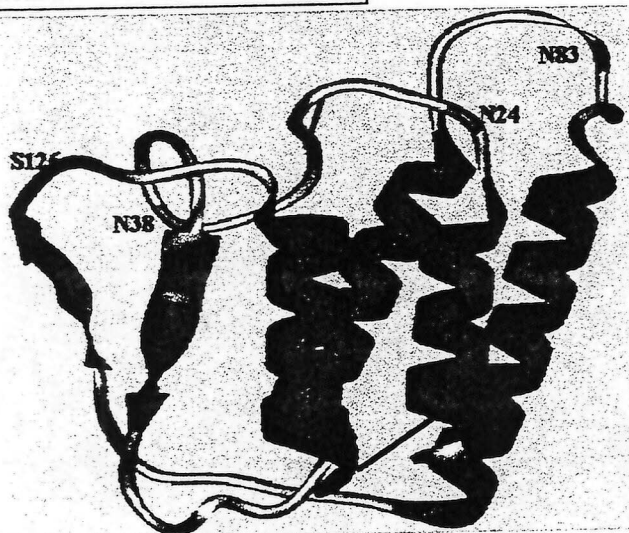
Por ej.: Alto contenido de Man en Asn-117 del primer dominio *kringle* de t-PA es en parte responsable del clearance.
Larrea et al. (1989) *Blood* 73: 1842-1850.

- Receptor de *trans* Golgi para Man-6-P:

facilita el transporte de hidrolasas lisosomales solubles a los endosomas tardíos.
Dahlmann et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 12115-12118.

Nuevas moléculas con sitios de N-Glucosilación adicionales

Estructura Tridimensional EPO





BIOLIXIVIACION DE MINERALES

Juan Carlos Gentina M.
Escuela de Ingeniería Bioquímica
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

La biohidrometalurgia es una tecnología que se basa en la acción de microorganismos especializados para la solubilización y extracción de especies minerales. Actualmente se aplica en diversos procesos mineros, particularmente en la minería del cobre y la del oro. Son diversos los países en que se ha adoptado esta alternativa frente a las tecnologías tradicionales, por presentar una serie de características que la hacen atractiva para su aplicación. Entre ellas se puede mencionar el hecho que compite favorablemente en términos económicos y que es amigable con el medio ambiente. En el caso del cobre, permite el beneficio de minerales marginales y la explotación de botaderos. Adicionalmente, es una tecnología de fácil aplicación, lo que la hace especialmente atractiva para ser empleada en países en vías de desarrollo. En el desarrollo del tema se revisan los conceptos de biolixiviación y biooxidación, los principales microorganismos, los mecanismos de solubilización de mayor aceptación actualmente. Así mismo se discute los principales factores operacionales que inciden en los resultados de la biolixiviación. Finalmente se hace una revisión de los aspectos más relevantes de la biolixiviación aplicada tanto a la minería del cobre como a la del oro.

Bibliografía.

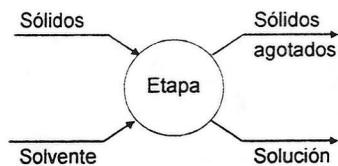
- Acevedo, F. and Gentina, J.C. (1998). Process engineering aspects of the bioleaching of copper ores. *Bioprocess Engineering* 4:223-229.
- Gentina, J.C. and Acevedo, F. (1985). Microbial ore leaching in development countries. *Trends in Biotechnology* 3:86-89.
- Rawlings, D.J. ed. (1997). *Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes*. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Rossi, G. (1990). *Biohydrometallurgy*. Mc Graw Hill, New York, USA.
- Schippers, A. and Sand, W. (1999). Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Applied and Environmental Microbiology* 65:319-321.

VII Curso Latinoamericano de Biotecnología
XXXVIII Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica

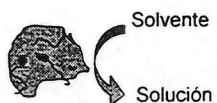
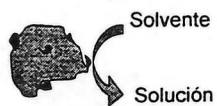
BIOLIXIVIACIÓN DE MINERALES

Juan Carlos Gentina M.

Lixiviación es la extracción de un soluto contenido en una matriz sólida mediante un solvente.



10



Temp. ~ 50°C {

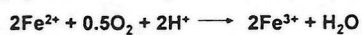
- *Acidithiobacillus caldus*
- *Leptospirillum* sp.
- *Sulfobacillus*
- *Acidimicrobium*
- *Ferroplasma*

Temp. > 70°C {

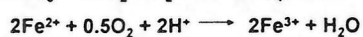
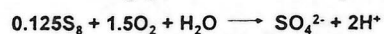
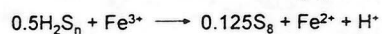
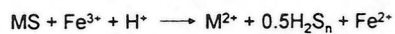
- *Sulfolobus*
- *Metallosphaera*

Mecanismos de solubilización de minerales:

a) Caso FeS_2 , MoS_2 , WS_2



b) Caso ZnS , CuFeS_2 , PbS



BIOLIXIVIACION DE COBRE

Principales especies minerales:

Calcosita	Cu_2S
Covelita	CuS
Bornita	Cu_5FeS_4
Enargita	Cu_3AsS_4
Calcopirita	CuFeS_2

Modalidades de operación:

- Pila
- Botadero
- In situ
- In place
- Reactores agitados

MINERAL
↓
MOLIENDA
↓
AGLOMERACION
↓
BIOLIXIVIACION
↓
EXTRACCION POR
SOLVENTE
↓
ELCTROOBTENCION
↓
COBRE

BIOOXIDACION DE MINERALES DE ORO

Se le llama BIOOXIDACION porque el metal principal no es extraído en el proceso microbiológico.

Sulfuros contenidos en minerales refractarios:

Pirita	FeS_2
Arsenopirita	FeSAs
Pirrotita	FeS
Enargita	Cu_3AsS_4



Modalidades de operación:

- Pilas
- Reactores



DESAFÍOS A LA INGENIERÍA EN LA TECNOLOGÍA DEL CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES

Ricardo A. Medronho
EQ/UFRJ

Biotechnology/Biopharmaceuticals is set to have the biggest impact on humanity since the industrial revolution and predictions are that it will be larger than the IT revolution.
<http://www.ukresearchanddevelopment.com/ukBenefits> (2003)

Since Köhler e Milstein first developed the hybridoma technology, in 1975, animal cells have been increasingly used for biopharmaceutical production. These new substances either for therapeutic use or for diagnosis have flooded the world market. That is the reason why the biopharmaceutical market has grown 7 times during the last decade. For instance, in 1999, the biopharmaceuticals amounted to 2% of the global pharmaceutical market, and it will reach 5% by the end of 2003. The forecast is that this share will keep fast growing.

There are nowadays around 50 therapeutic medicines in the market and another 400 are currently under clinical trials. Considering that 20-30% of these 400 biopharmaceuticals in trials might be approved in the next 5 years, it will pose a huge pressure over the world production facilities, mainly because these new therapeutics are designed as long-term therapies needing very high doses, and so must be manufactured in mass quantities.

Moreover, eleven biopharmaceuticals with combined global sales in 2001 of \$13.5 billion are slated to lose patent protection by 2006. Therefore, it is feasible to consider that generic biopharmaceuticals -or biogenerics- is going to be the next big wave in the pharmaceutical industry.

The problem is that current worldwide 400 000 L fermentation volume for animal cell culture is already working at full capacity. Therefore, production shortage might delay or interrupt the development cycle of many new products as well as might limit product sales after licensing.

If in the long run the solution is to build new production facilities, in the short run, it is essential to increase production through a better productivity. This can be achieved, for instance, through the replacement of low productivity systems, as roller bottles, by suspended-cell systems and, within these systems (batch, fed-batch, and perfusion), by choosing perfusion cultures that give highest productivities. The problem here is choosing the appropriated cell retention device, since animal cells are shear sensitive and attain very low settling velocities.

Computational Fluid Dynamics (CFD) gives numerical solutions, by computational methods, for the governing equations, which describe fluid flow and particle motion within a fluid. Hence, it is possible, with CFD assistance, to improve the design of cell retention devices in order to maximize cell retention and minimize cell damage. Recent results obtained in our laboratory, using CFD, will be shown in this presentation.

Bibliografía

- Castilho, L.R. e Medronho, R.A. (2002), Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures, *Advances in Biochemical Engineering & Biotechnology*, 74, 129-169.
- Deckwer, W.-D., Anspach, F.B., Medronho, R.A. e Lübberstedt, M. (2001), Method for Separating Viable Cells from Cell Suspension, *Internacional Patent Request No. WO 01/35902 A1*, 25 pp., PCT-WIPO (Patent Cooperation Treaty - World Intellectual Property Organization).
- Deo, Y. M., Mahadevan, M. D., Fuchs, R. (1996), Practical Considerations in Operation and Scale-Up of Spin-Filter Based Bioreactors for Monoclonal Antibody Production, *Biotechnology Progress*, 12, 57-64.

VII CURSO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA
XXXVIII Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

DESAFÍOS A LA INGENIERÍA EN LA TECNOLOGÍA DEL CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES

Ricardo A. Medronho
Dept. de Ing. Química, Escuela de Química
Universidade Federal de Rio de Janeiro

The Biotechnology in the 21st Century

Biology is as important as the sciences of lifeless matter, and biotechnology will in the long run be more important than mechanical and chemical engineering.

Introductory address by Julian Huxley in Hogben, L. T. (1937), Retreat from Reason, Random House, New York

Biotechnology/Biopharmaceuticals is set to have the biggest impact on humanity since the industrial revolution and predictions are that it will be larger than the IT revolution.

<http://www.ukresearchanddevelopment.com/ukBenefits> (2003)

We need to initiate without delay a serious curriculum development process to truly fuse biological content with the chemical engineering core and evolve our discipline into Chemical and Biological Engineering

Stephanopoulos, G. (2003), Chemical and Biological Engineering, Chemical Engineering Science, 58, 3291-3293

Mammalian Cells

- Synthesize the large and complex structures that the human body requires as medicine.
- Dramatic evolution in the last 20 years => the most successful drugs introduced in the market in recent years come from mammalian cell cultures, such as:
 - interferons
 - monoclonal antibodies (Mabs)
 - factor VIII
 - erythropoietin (EPO)
 - antithrombin III (AT III)
- Most employed cells: CHO and BHK

Current Challenges in the Cultivation of Animal Cells

- Formulation of low cost culture media, free of serum or free of proteins (chemically defined)
- Increase of the biopharmaceutical productive capacity in order to cope with a dramatically growing demand
- Development of purification processes of high yield and productivity

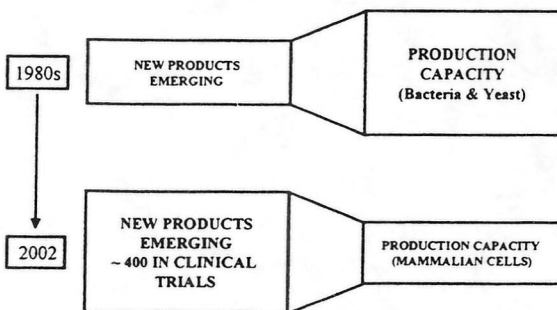
The Problem

- ca. 400 new products in clinical trials
- Many of the new products require high doses for a long period of time
- Current worldwide 400 000 L fermentation volume for animal cell culture is already working at full capacity



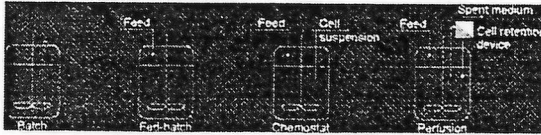
Production shortage might delay or interrupt the development cycle of many new products as well as might limit product sales after licensing

The Bottleneck: Current Worldwide Production Capacity



Operation Modes of Suspended-Cell Systems

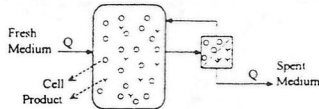
Suspension systems can be operated in 4 different modes:



Productivity comparison

Operation Mode	Cell Density (cells/mL)	Complexity	Fermenter Volume (L)	Productivity (mg/L/day)
Batch/Fed Batch	10^6	low	up to 10000	10-30
Perfusion	up to 3×10^7	medium	30-2000	50-100

Perfusion Culture of Mammalian Cells



- better control of the culture environment (dissolved oxygen tension, pH, substrate concentration)
- toxic by-products are removed and secreted product is continuously recovered, avoiding the risk of product degradation
- higher cell concentrations can be achieved (over 10^7 cells.mL⁻¹)
- higher productivities (up to 10-fold times greater than batch)
- smaller bioreactor volume for the same production (reduces capital costs)
- more extensive automation with improved process control is possible

Perfusion Main Problems:

animal cells are shear sensitive & attain very low settling velocities



HeLa Cells

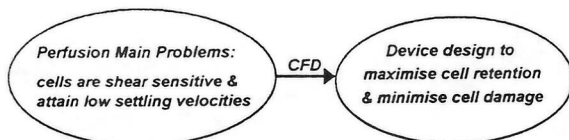
← Loss of viability (%)

Main Devices for Cell Retention in Perfusion Systems

Separation Method	Apparatus
gravitational field	gravity settlers (vertical & lamella)
centrifugal field	centrifuges, hydrocyclones , centrifugal elutriators, density gradient separation
porous barrier	conventional filter, microfiltration, spin-filters, vortex flow filters, rotating disk filters , etc.
acoustic force	ultrasonic filters
dielectrophoresis	dielectrophoretic filter
antibody-based etc.	high density particles, magnetic particles

in yellow: devices used in perfusion for cell retention
in white: devices used only at bench scale

Computational Fluid Dynamics (CFD): The place where Mathematics, Physics and Biology Get Together

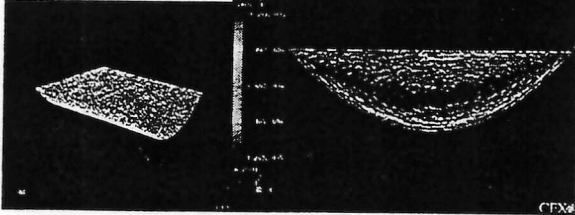


Computational Fluid Dynamics (CFD)

- CFD gives numerical solutions, by computational methods, for the governing equations which describe fluid flow and particle motion within a fluid:
 - the equations of motion and of continuity and
 - any additional conservation equations, for example, energy or species concentrations.
- Through CFD, it is possible to model physical fluid phenomena that cannot be easily simulated or measured with a physical experiment, for example, the velocity profile inside a roller bottle or the dissolved oxygen concentration inside a bioreactor. Therefore, it is possible to investigate physical fluid systems more cost effectively and more rapidly than with experimental procedures.

An Example of CFD Use: Results for Roller Bottles

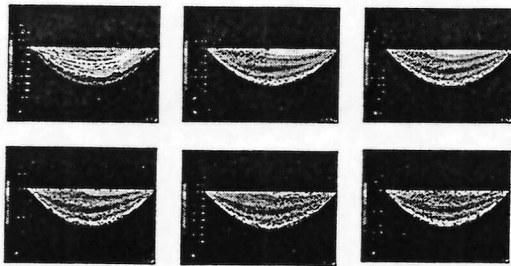
Bottle size:
Diameter: 10 cm
Length: 20 cm



Generated grid

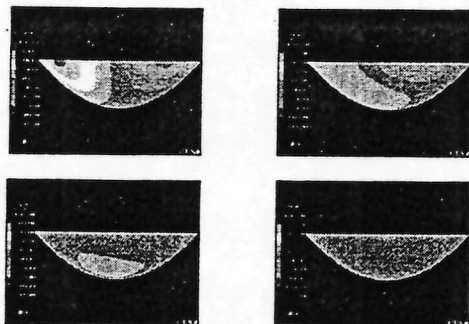
Velocity vectors at the roller bottle centre

CFD Results for Roller Bottles



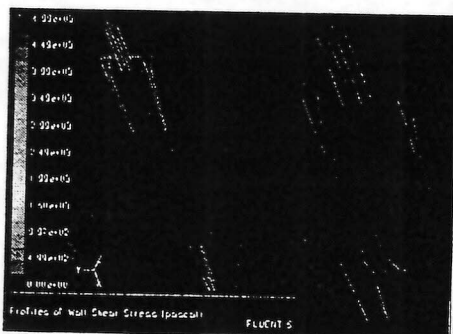
Velocity contour plots at $z=0$, $z=0.02$, $z=0.04$, $z=0.06$, $z=0.08$, $z=0.099$

CFD Results for Roller Bottles

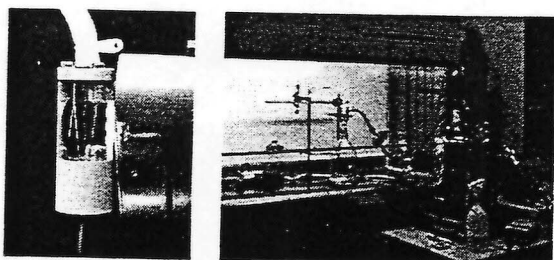


Axial velocity contour plots at: $z=0.0$, $z=0.04$, $z=0.06$, $z=0.08$

The Wall Shear Stress for a 10 mm Bradley Hydrocyclone

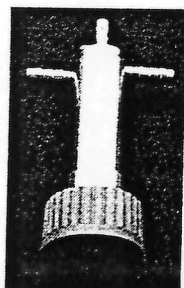


A close up of the Bradley and the Dorr-Oliver hydrocyclones in operation

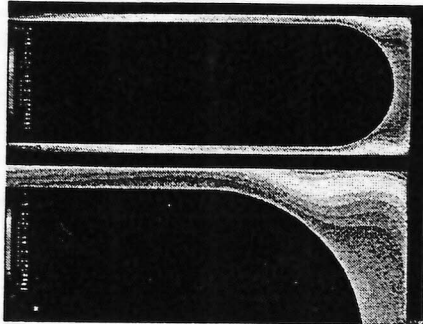


Optimized Hydrocyclone for Mammalian Cell Retention

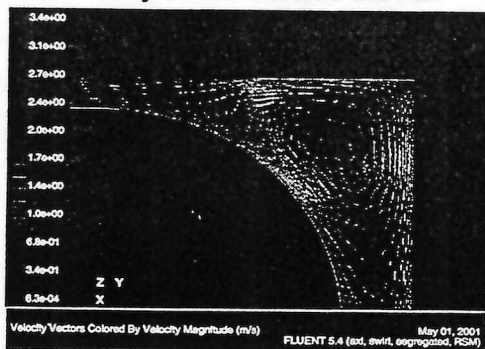
- Diameter: 10 mm
- Underflow: 2.0, 2.5 & 3.0 mm
- Overflow: 1.0, 1.5 & 2.0 mm
- Internal dimensions optimized for maximum cell retention
- Double feed inlet
- Adequate length of the underflow pipe
- Internal surface electronically polished



Tangential Velocity Contour Plot in the RDF



Velocity Vectors inside the RDF



Conclusions

- *Animal Cell Technology has evolved in twenty years from a promise industrial potential to become the main technological basis for the manufacturing of most of the biopharmaceuticals currently commercialized or in development phases.*
- *The high volume of investment in manufacturing mammalian cell facilities clearly indicates the importance of this technology in the biotechnology near future.*
- *Increasing productivity of animal cell culture could represent an alternative for a significant production increase in the present context of capacity shortfall. That is a challenge for the biochemical engineer.*
- *Computational Fluid dynamics (CFD) is a powerful tool to optimize the design or to understand the performance of cell culture devices.*



FUNDAMENTOS DE CULTIVOS CELULARES

Fernando Acevedo
Escuela Ingeniería Bioquímica
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

El objetivo de esta presentación es entregar un panorama general de los cultivos celulares en cuanto a las potencialidades que presentan como sistemas productivos y a las principales estrategias y tecnologías que se emplean a nivel industrial para su utilización.

Se discutirán las razones de por qué cultivar células, haciendo referencia a los distintos tipos de células y sus características y principales comportamientos en condiciones de cultivo. También se pasará rápida revista a los metabolitos y enzimas que a la fecha se han constituido en productos comerciales y las perspectivas futuras. Luego se presentarán las estrategias básicas de producción de bioproductos, atendiendo a los aspectos ambientales y genéticos.

La última parte de la presentación estará destinada a exponer los principales aspectos del estudio y cuantificación de la cinética de crecimiento de poblaciones celulares y a discutir los fundamentos del diseño y operación de biorreactores, con especial atención a la aplicación de los principios de conservación, a los fenómenos de transporte involucrados y al problema de traslación de escala.

Bibliografía:

- Acevedo, F., Gentina, J.C., Illanes, A. 2002. Fundamentos de Ingeniería Bioquímica, cap. 4, Ediciones Universitarias de Valparaíso
- Acevedo. 1988. Mass balancing: an effective tool for fermentation process optimization. Crit. Rev. Biotechnol. 6 (4), 309-322
- Anonymous. 2003. Biobased Industrial Products. National Research Council, Washington D.C. <http://books.nap.edu/catalog/5295.html>
- Bisio, A., Kabel, R. L. 1985. Scale-up of Chemical Processes. J. Wiley & Sons.
- Blanch, H.W., Clark, D.S. 1996. Biochemical Engineering, Cap. 3. Marcel Dekker Inc.
- Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M. 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 573-606.
- Cooney, C.L.. 1981. Growth of microorganisms. En Biotechnology (Rehm, Reed, eds.) Vol. 1, 73-112. Verlag Chemie.
- Carrondo, M.J.T. 1997, Animal Cell Technology. Kluwer Academic Pub., Netherlands.
- Danner, H, Braun, R. 1999. Biotechnology for the production of commodity chemicals from biomass. Chem. Soc. Rev. 28, 395-405.
- Demain, A.L. 2000. Microbial biotechnology. Trends Biotechnol. 18, 26-31.
- Demain, A.L. 2000. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. Biotechnol. Adv. 18, 499-514.
- Díaz, F., Acevedo, F. 1999. Scale-up strategy for biorreactors with Newtonian and non-Newtonian broths. Bioprocess Eng. 21, 21-23.
- Einsele, A. 1978. Scaling-up of bioreactors: theory and reality. Proc. Biochem. 13(7), 13-14.
- Gram, A. 1997. Biochemical engineering and industry. J. Biotechnol. 59, 19-23.
- Hauser, H., Wagner, R. 1997. Mammalian cell biotechnology in protein production. W. de Gruyter, Berlin.
- Hughmark, G.A. 1980. Power requirements and interfacial area in gas-liquid turbine agitated systems. Ind. Eng. Chem. Proc. Des. Dev. 19, 638-641
- Lilly, M.D. 1997. The development of biochemical engineering science in Europe. J. Biotechnol. 59, 11-18.

VII CURSO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGÍA
XXXVIII Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica

FUNDAMENTOS DE CULTIVOS CELULARES

FERNANDO ACEVEDO
OCTUBRE 13, 2003

- PARA QUÉ CULTIVAR CÉLULAS
- TIPOS DE CÉLULAS DE INTERÉS
- PRODUCTO DE INTERÉS
- ESTRATEGIAS DE PRODUCCIÓN
- CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN
- DISEÑO Y OPERACIÓN DE BIORREACTORES

Fundamental % microorganismos en este caso.

- Aumentar el conocimiento sobre los procesos vitales
- Determinar rutas metabólicas
- Estudio *in vivo* de la(s) actividad(es) de alguna(s) enzima(s)
- Estudios de regulación metabólica
- Estudios de flujos metabólicos
- Obtener material genético con diferentes propósitos
- Obtener mutantes y recombinantes de características determinadas
- Obtener productos comerciales de interés * *

¿Para qué cultivar células?

- LÍPIDOS (x ej de grasas poliinsat).
- PIGMENTOS (naturales; astaxantina en salmones y proceso con levaduras).
- PROCESAMIENTO DE MINERALES (útiles tb. para trat. de desechos de concentración).
- REGULADORES DEL CRECIMIENTO (GA_3);
- TRATAMIENTO DE DESECHOS Y EFLUENTES (de origen).
- VACUNAS (de Hong. recombinantes, de ADN etc).
- VITAMINAS
- OTROS

ESTRATEGIAS DE (SOBRE)PRODUCCIÓN:

• Como regla general, la célula produce bajas cantidades de cada metabolito o enzima, lo justo para sus necesidades

• Desde nuestro punto de vista, esas cantidades son demasiadas bajas para ser útiles. Se debe intentar modificar esa situación para transformar a la célula de un sistema altamente eficiente (para ella) a uno ineficiente (eficiente para nosotros) que desperdicie materia y energía produciendo en mayores cantidades que las necesarias.

• Para ello se han desarrollado un amplio espectro de técnicas de manipulación ambiental y genética que producen los resultados esperados.

→ por optimización natural de la materia y E^+

Queremos desregular vías metabólicas de interés.

Se consiguen logros espectaculares (aumentos de 10000 veces o +)

CINÉTICA DE CRECIMIENTO

• Fisión binaria; Necesitamos de reprod. pero hay distintos.

• Ausencia de inhibiciones: Se da fácil % en aplicaciones industriales.

• Medio definido mínimo

• Cultivo por lotes (batch); No se realiza otro tipo de cultivo ej

cinético de crec.: Siempre sujeto a restricciones (como todos los modelos y concept. matemáticos).

Sirve por ej por levaduras (gemación) pero no para otros con crecimientos miceliales (ej).

Funde % 1 Fuente de C y N.

función
micro org o cel.

$\mu = f(\text{m.o., condiciones ambientales})$

- composición del medio
- temperatura
- pH
- actividad de agua

$$\mu = \mu_M \frac{S}{K_S + S}$$

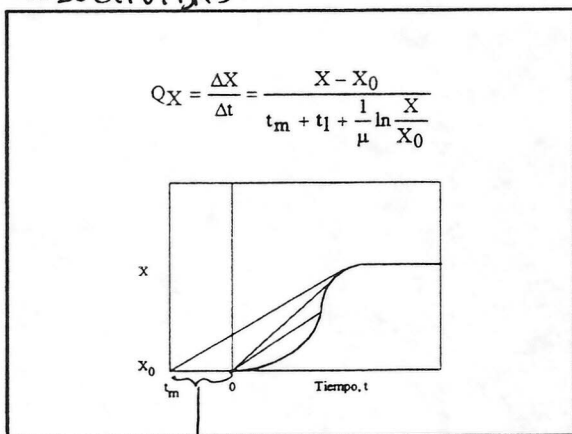
→ importante en cultivos
tipo nustrato sólido, no imp.
en solución numerada.

→ dinámica respecto a nustrato
presente. Ecuación de Monod.
(se da solo si se cumplen algunas
condiciones) ∃ otros enfoques ciné-
ticos pa' ≠ campos de aplicación.

$$\mu = \mu_M \frac{S}{(K_S + S)(1 + \frac{S}{K_i})}$$

$$\mu = \mu_M \frac{S}{(K_S + S)(1 + \frac{P}{K_p})}$$

Productividad.

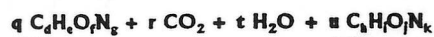


Productividad (en cel como en
el gráfico o en el producto de
interés Qp). es lo que queremos
maximizar. Pendiente de recta
que llegue a un máx antes de
la fase estacionaria.

tiempo muerto de carga, esterilización, descarga etc. En
el tiempo esto t_0 se deben considerar para efectos finales.
(de pendientes menores si se ve solo cuando este funcionando)

Ec. qca estequiométrica para representar crecimiento celular.

Fe C+N O₂ aerobio. (muy simplificado)



cél.

prod. extracelular.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} = \frac{\text{masa celular producida}}{\text{nutriente consumido}}$$

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{X/S}}$$

se habla de PM de la cél. (aunque.

no es 100% correcto es equivalente).

$$\Delta S_T = \Delta S_c + \Delta S_M + \Delta S_p$$

$$\left(\frac{dS}{dt}\right)_T = \left(\frac{dS}{dt}\right)_C + \left(\frac{dS}{dt}\right)_M + \left(\frac{dS}{dt}\right)_P$$

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{1}{Y_{X/S}^0} + m \frac{1}{\mu}$$

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{1}{Y_{X/S}^0} + \left(m + \frac{q_p}{Y_{P/S}^0}\right) \frac{1}{\mu}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{(-\Delta S)_T} = \frac{\text{producto formado}}{\text{nutriente total consumido}}$$

$$Y_{P/S}^0 = \frac{\Delta P}{(-\Delta S)_P} = \frac{\text{producto formado}}{\text{fuente de C y energía consumida para producto}}$$

$Y_{P/S}^*$, rendimiento teórico

• Tipos de biorreactor

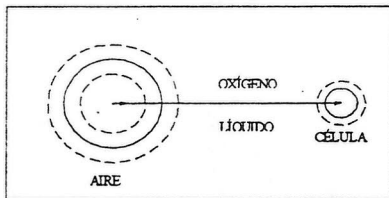
- Tanque agitado
- Tubular
- Columna: lecho fijo, lecho expandido, lecho fluidizado, circulación neumática, platos
- Otros

• Modalidad de operación

- Discontinua (por lotes)
- Continua
- Semi-continua (lotes alimentados)

AIREACIÓN (operación clave en fermentación aerobia)

Procesos de transporte en serie. Paso limitante: disolución del O_2 en el líquido



cél. recibe solo O_2 disuelto en líquido.

En fermentación industrial se debe superar Paso limitante.

Demanda de oxígeno,

$$N_A = \frac{1}{Y_{O_2}} \cdot \frac{dX}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{O_2}}$$

Oferta de oxígeno,

$$W = k_L a (C^* - C_L)$$

Limitación por oxígeno: crecimiento lineal, cambios vías metabólicas, daño sistema transporte electrones

se debe tener ciertos valores de $K_L a$ si es menor a lo requerido ocurre

Agitadores:



Turbina de disco (radial)



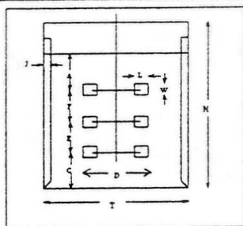
Turbina paletas inclinadas



Hélice marina



Hidrolámina (axial bombeo ↑ o ↓)



Razón	Valor
H/T	1.0-3.0
D/T	0.3-0.6
A/D	0.5-3.0
$E/D, F/D$	1.0-2.0
J/T	0.08-0.1

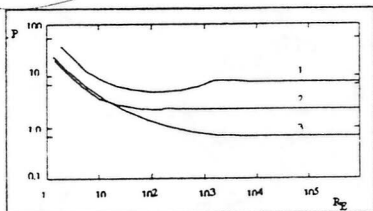
Dimensiones caract. del fermentador

sin aireación

$$N_p = K \cdot (Re)^m$$

$$N_p = \frac{P}{\rho \cdot N^3 \cdot D^5}$$

$$Re = \frac{D^2 \cdot N \cdot \rho}{\mu_L}$$



Potencia de agitación.

Efecto de las variables de operación en $k_L a$:

$k_L a = f(\text{células; diseño; ambiente; aireación; agitación})$

$$k_L a = K \cdot \left(\frac{P_g}{V} \right)^\alpha \cdot v_s^\beta \cdot N^\gamma$$

$$k_L a = K \cdot D^\delta \cdot v_s^\epsilon \cdot N^\phi$$

} ec. equivalente.

Coefficiente de transferencia
de oxígeno.

TRANSFERENCIA DE CALOR EN CULTIVOS CELULARES

- Metabolismo exotérmico
- Operación a temperatura constante: temperatura óptima
- Balance de energía térmica:

entradas de calor: calor sensible aire, calor sensible alimentación líquida

salidas de calor: calor sensible gases, calor sensible efluente, pérdidas a los alrededores

calor generado: calor metabólico, calor de agitación
calor consumido: calor latente agua evaporada

Problema que puede haber
ser limitante (calor
metabólico, de agitación
de roce). no se debe
descuidar el retiro del calor
En fermentadores grandes se
debe enfriar y en los
chicos se debe calentar.

Problema de aplicaciones
a $\neq$ escalas $\Rightarrow$ problemas
para trasladar resultados
de laboratorio a resultados
industriales.

Para obtener balance: calor a retirar o agregar mediante equipo de intercambio de calor

Equipo industrial: se debe retirar a calor a altas potencias, problema de bajos potenciales de transferencia

Equipo de laboratorio: se debe agregar calor

¿por qué?

Problema de escala: relación área de disipación/volumen de generación disminuye con tamaños crecientes

Equipo de intercambio utilizado: doble pared, serpentín, intercambiador externo



CULTIVO POR LOTES ALIMENTADOS

Juan Carlos Gentina
Escuela de Ingeniería Bioquímica
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

El cultivo por lote alimentado (CLA) es una modalidad de fermentación, cuyas características propias hace atractiva su aplicación a una variada gama de procesos de fermentación. Básicamente es una operación discontinua, durante la cual los nutrientes o parte de ellos ingresan al fermentador por una corriente de alimentación, y que al no existir una descarga, provoca una continua variación del volumen de fermentación.

La diferencia operativa entre CL y CLA es la corriente de alimentación, lo que a su vez le otorga características muy ventajosas como sistema de fermentación. Mientras en el CL no es posible realizar control alguno sobre el crecimiento de la población celular, en un CLA mediante la corriente de alimentación se puede ejercer un control del crecimiento celular a través de la disponibilidad del nutriente limitante en el caldo de fermentación.

La correcta programación de la velocidad de alimentación se debe hacer basándose en la función demanda del microorganismo, siendo ésta definida a su vez por las condiciones de crecimiento impuestas por el proceso que se desea llevar a cabo.

Se revisan las condiciones de operación más comunes del CLA como son aquellas que permiten el crecimiento exponencial de la población microbiana bajo condiciones controladas y la velocidad de alimentación constante.

Finalmente, se presenta una amplia discusión centrada en aquellos tipos de fermentaciones que se ven favorecidas por la modalidad de CLA. En forma general, el CLA resulta ventajoso emplear cuando es necesario efectuar un cierto control sobre la velocidad específica de crecimiento del microorganismo. En todos esos casos se esperaría encontrar mayores productividades en un CLA que en un CL.

Bibliografía

- Acevedo, F. y Gentina, J.C. (2002) "Cinética de fermentaciones". Fundamentos de Ingeniería Bioquímica (Eds.) Acevedo, F., Gentina, J.C. e Illanes, A., pp 151-168. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Valparaíso.
- Pirt, S.J. (1974). "The theory of fed batch culture with reference to the penicillin fermentation". *J. Appl. Chem. Biotechnol.* **24**, 415.
- Whitaker, A. (1980). "Fed batch culture". *Proc. Biochem.* **15**, 10.
- Yamané, T. and Hirano, S. (1977a). "Semi-batch culture of microorganisms with constant feed of substrate (a mathematical simulation)". *J. Ferment. Technol.* **55**, 156.
- Yamané, T. and Tsukano, M. (1977). "Effect of several substrate-feeding modes on production of extracellular α -amylase by fed-batch culture of *Bacillus megaterium*". *J. Ferment. Technol.* **55**, 233.

VII Curso Latinoamericano de Biotecnología

XXXVIII Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica

CULTIVO POR LOTES ALIMENTADOS

Juan Carlos Gentina M.

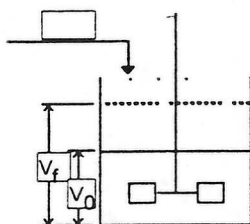
INDICE

Concepto de CLA

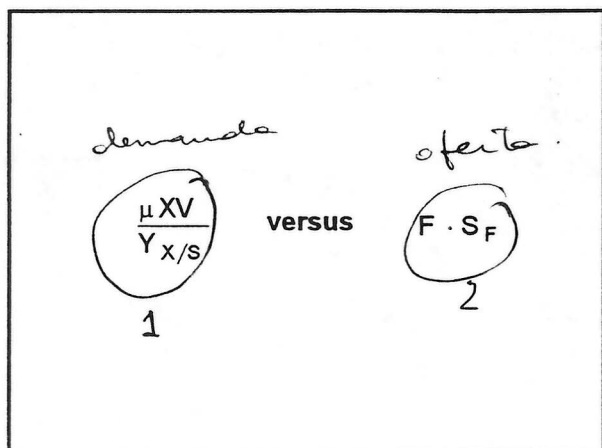
Función alimentación

Ecuaciones generales

Aplicaciones



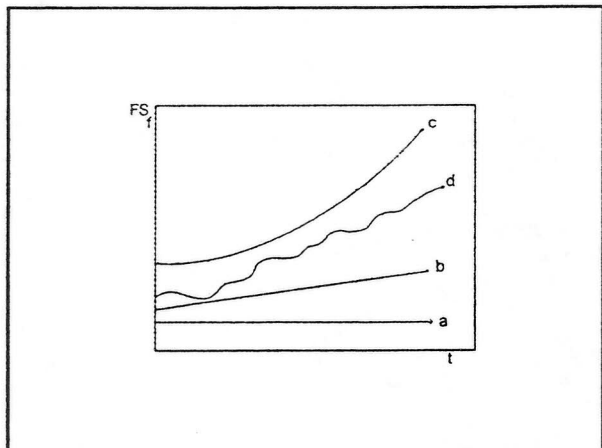
C.LA:



Alimentación es la dif entre
CC y CLA.

Población en el reactor produce
demanda x sustrato representada
 $\times 1$ = velocidad de consumo.

2 { F = flujo volumétrico.
 $S_F = [S]$ Sust. limitante en ese cte.
↳ oferta de nutrientes.
El control de estas $\Rightarrow$ control de
la fermentación



FS: puede tener 4 funciones
(a, b, c, d).

ECUACIONES GENERALES

SUPOSICIONES: q' sustentan estas ecuaciones.

- $Y_{X/S}$ constante
- Mantención despreciable (consumo de C y E).
- ΔV depende solo de F

Ecuaciones de balance de
materia

CLA con alimentación constante

$$\frac{dV}{dt} = F(t) \implies V = V_0 + Ft$$

• Solución rigurosa de las ecuaciones $\rightarrow$ solu. numérica de eqs. no lineales,

• Solución aproximada $\sim \sim \sim$ (difícil).

- Zona crecimiento exponencial
- Zona crecimiento limitado

al partir * CLA.

Zona de crecimiento exponencial (ZCE)

$$S \gg K_S \quad \mu = \mu_M$$

Alimentación > a consumo $\Rightarrow$ acumulación de S.

ZCE

$$\mu = \mu_M$$

$$XV = X_0 V_0 e^{\mu_M t}$$

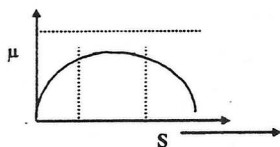
$$S = \frac{FS_F t + S_0 V_0 + \frac{X_0 V_0}{Y_{X/S}} [1 - e^{\mu_M t}]}{V_0 + Ft}$$

$$X = \frac{X_0 V_0 e^{\mu_M t}}{V_0 + Ft}$$

¿Cuándo usar CLA?

- Inhibición por sustrato
- Efecto Crabtree
- Represión catabólica
- Producción de metabolitos primarios
- Producción de metabolitos secundarios
- Inductor inhibidor y degradable

Inhibición por sustrato



$[S] \uparrow \uparrow$ inhiben μ veloz.

específico de crec.

podemos manejar $[S]$ en

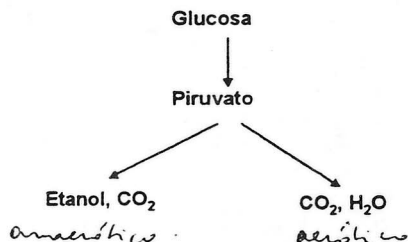
$[]$ de μ máx. Por ej *E. coli* se

inh. q/ [sulfato de amonio (fte N_2)] altos.

si se agrega gradual % mante-

niendo en $[]$ q no inhiben *E. coli*.

Efecto Crabtree



tipico de levadura (x ej panificación)

$[Glucosa]$ muy alto. vía aeróbica

se saturan acumula Piruvato

y tiende a Etanol, CO_2 (anaeróbica)

aunque $\exists O_2$. Se evita x CLA.

controlando $[Glu]$ a una fracción

de μ máx para vía fermentativa

(Etanol) y usar vía oxidativa o
vía Etanol.

Modelo para *E. coli* (Ac. Acético).
lectura

Inductor inhibidor y degradable

- Inductor de la síntesis de la enzima
- Inhibidor del crecimiento celular
- Utilizado como fuente de carbono y energía

Inductor de. penicilina.
ej Penicilina xilosa con *B. megaterium*. (degrada el inductor) a ↑ cantidades inhibe la enzima. ⇒
Inductor en [] óptima.

AGITACIÓN EN REACTORES MICROBIANOS

FERNANDO ACEVEDO
OCTUBRE 13, 2003

- RELACIÓN ENTRE AGITACIÓN Y POTENCIA
- GRADO DE MEZCLAMIENTO, CUANTIFICACIÓN
- SELECCIÓN DE ROTORES
- REACTORES DE MEZCLA INCOMPLETA
- REACTORES DE TRES FASES

* Agitación en fermentador de
tanque agitable.

POTENCIA DE AGITACIÓN Y MEZCLAMIENTO:

- La determinación de la potencia de agitación solo asegura que el rotor va a girar a la velocidad estipulada, pero NADA DICE SOBRE LA CALIDAD DEL MEZCLAMIENTO QUE SE OBTIENE

- El concepto de mezcla completa es una idealización. En la práctica se puede estar más cerca o más lejos de la completa homogeneidad, pero nunca se alcanza plenamente

- Las desviaciones de la idealidad dependen del diseño del sistema de agitación, de las propiedades reológicas del fluido y de la escala de operación



AGITACIÓN EN REACTORES MICROBIANOS

Fernando Acevedo

Escuela Ingeniería Bioquímica
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

El objetivo de esta presentación es presentar y discutir algunos aspectos relevantes relacionado con la agitación en cultivos microbianos de interés industrial.

Primeramente se hace una distinción entre la determinación de la potencia de agitación y el grado de mezclamiento o calidad de la agitación obtenida. Para evaluar la calidad del mezclamiento se pueden emplear indicadores tales como el tiempo de circulación y el tiempo de mezclamiento, los que pueden ser determinados experimentalmente bajo ciertas condiciones. El tiempo de mezclamiento puede además ser estimado en base a diversas correlaciones semiempíricas. También se hace referencia al establecimiento y uso de escalas heurísticas de calidad de agitación.

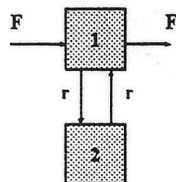
Se pasa revista luego a los principales criterios para seleccionar el tipo de rotor adecuado, haciendo énfasis en algunos errores que al respecto se han cometido en la industria de fermentación.

Considerando que los biorreactores reales no alcanzan la mezcla completa que supone el concepto de reactor ideal de tanque agitado, se exponen algunas consideraciones acerca de la formulación de modelos que representen las desviaciones de la idealidad.

Finalmente se presenta y discute la situación de los reactores de tres fases – sólido, líquido y gas – con especial referencia a la biooxidación de minerales. Se presentan correlaciones que permiten determinar la mínima velocidad de agitación para obtener una suspensión homogénea de sólidos particulados. Los principales factores que influyen en la calidad de una suspensión son discutidos a través de un ejemplo de optimización de tales condiciones.

Bibliografía:

- Acevedo, F. 2000. The use of bioreactors in biomining processes. *Electronic J. Biotechnol.* 3 (3), 184-193.
- Alves, S.S., Maia, C.I., Vasconcelos, J.M.T. 2002. Experimental and modelling study of gas dispersion in a double turbine stirred tank. *Chem. Eng. Sc.* 57, 487-496
- Armenante, P., Nagamine, E., Susanto, J. 1998. Determination of correlations to predict the minimum agitation speed for complete solid suspension in agitated vessels. *Can. J. Chem. Eng.* 76, 413-419.
- Asai, T., Kono, T. 1982. Estimation of oxygen absorption coefficient and power consumption in a stirred-tank fermentor. *J. Ferment. Technol.* 60, 265-268
- Dohi, N., Matsuda, Y., Itano, N., Minekawa, Takahashi, T., Kawase, Y. 2001. Suspension of solid particles in multi-impeller three-phase stirred tank reactors. *Can. J. Chem. Eng.* 79, 107-111.
- Enfors, S.-O. et al. 2001. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *J. Biotechnol.* 85, 175-185.
- González, R., Gentina, J.C., Acevedo, F. 2003. Optimisation of the solids suspension conditions in a continuous stirred tank reactor for the biooxidation of refractory gold concentrates. *Electronic J. Biotechnol.*, aceptada para publicación.
- Humphrey, A. 1998. Shake flask to fermentor: what have we learned? *Biotechnol. Prog.* 14, 3-7
- Kamdev, Dunlop, Wenger, Villeneuve. 1994. Role of turbulence in fermentations. *En Advances on Bioprocess Engineering* (Galindo, Ramírez, eds.), 149-156. Kluwer Academic Publishers.
- Mills, D.B., Bar, Kirwan, D.J. 1987. Effect of solids on oxygen transfer in agitated three-phase systems. *AIChE J.* 33, 1542-1549.
- Moucha, T., Linek, V., Prokopova, E. 2003. Gas hold-up, mixing time and gas-liquid volumetric mass transfer coefficient of various multiple-impeller configurations: Rushton turbine, pitched blade turbine and techmix impeller and their combinations. *Chem. Eng. Sc.* 58, 1839-1846.
- Myers, K.J., Bakker, A. 1998. Solids suspension with up-pumping pitched-blade and high-efficiency impellers. *Can. J. Chem. Eng.* 76, 433-440.



Balances de masa para células:

$$X_2 + \alpha \cdot f(X_1) = (1 + \gamma D) \cdot X_1$$

$$X_1 + (1 - \alpha) \cdot f(X_2) = X_2$$

Donde:

$$V_1 = \alpha V \quad V = V_1 + V_2$$

$$D = F/V$$

$$\gamma = V/r$$

• Modelo desarrollado para fermentador de laboratorio (entrada y salida por tope) y para una turbina Rushton

• Influencia del número de rotores *→ magnéticos*

• Influencia de la ubicación de la descarga

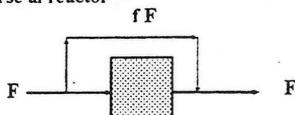
• Aplicación a cultivos por lotes y lotes alimentados *→ interesante*

∴ estrategia 1/2 se toman 2
compartimentos ≠ y c/u
de ellos son de mezcla
completa (ya q' esto es lo q'
se puede modelar x matemát
cas). r = algún grado de
intercambio entre los 2 compart.

Otras situaciones que pueden causar mezcla incompleta:

en laboratorio:

• Si la entrada y salida están por tope, parte de la alimentación puede pasar en cortocircuito (o by-pass) y no incorporarse al reactor



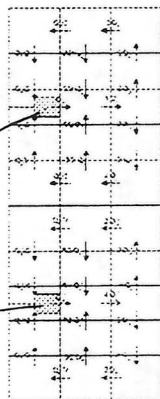
• Pueden haber zonas no agitadas (detrás de los deflectores)

También se han desarrollado modelos dividiendo el volumen de fermentación en n elementos de volumen interconectados, c/u de ellos de mezcla completa

suponiendo

Turbina 1

Turbina 2



Alves et al., Experimental and modelling study of gas dispersion in a double turbine stirred tank, Chem. Eng. Sc. 57, 487-496, 2002.

- Se ha definido una Velocidad Crítica de agitación, que es la mínima velocidad que mantiene los sólidos en suspensión homogénea (Zwietering, 1958):

$$N_s = S \cdot \frac{v^{0.1} d_p (g \cdot \Delta p / \rho)^{0.45}}{D^{0.85}} \cdot X^{0.13}$$

} *referencia obligada en 4k*

- Se ha propuesto también la siguiente correlación (Dohi el al., 2001):

$$N_s = C_1 \cdot \frac{d_p^{5/8} \cdot (g \cdot \Delta p / \rho)^{5/8}}{D^{3/4} \cdot \sqrt[1/4]{X}} \cdot X^{1/5}$$

[X] de sólidos

d_p ϕ de partículas.

S de

1958 sacado x datos experimentales,

2001 x consideración de datos
variables.

- y otras.*
- Ambas ecuaciones son válidas para suspensión de sólidos en líquidos no aireados. Las burbujas de aire perturban las líneas de flujo ocasionando sedimentación de sólidos. N_s en sistemas aireados resulta mayor que en sistemas no aireados. Dohi el al. (2001) proponen:

$$N_{sg} = C_1 \cdot \frac{d_p^{5/8} \cdot (g \cdot \Delta p / \rho)^{5/8}}{D^{3/4} \cdot v^{1/4}} \cdot X^{1/5} \cdot \left(1 + C_2 \cdot \frac{U_g}{U_t}\right)^{1/5}$$

lo validan para líquidos aireados.

- Una adecuada suspensión de sólidos en biorreactores aireados depende del tipo y ubicación del o los rotores, de las razones geométricas, de la aيرación, de la agitación y, en grado menor, de la concentración de sólidos

N_s : veloc. crítica de agitación

U_g = veloc. superficial del gas

U_t = veloc. terminal de sedimentación de los sólidos.

Susp. de sólidos

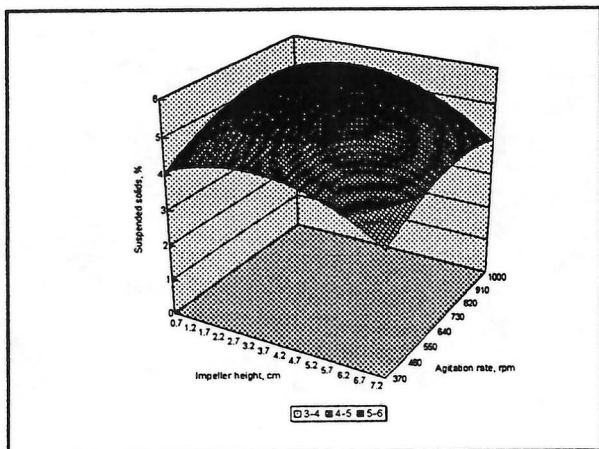
- Para suspender sólidos lo mas adecuado son los rotores de flujo axial: hélice marina, turbina de paletas inclinadas o rotores de hidrolamina

ejemplo:

- Un caso de operación a gran escala de biorreactores de tres fases es la biooxidación de minerales de oro

- Resulta sorprendente que la primera planta de biooxidación a gran escala utilizara rotores de flujo radial (turbina Rushton), (1986) totalmente inadecuados para cumplir con la tarea

- Se debe estudiar cuidadosamente la mejor manera de agitar los reactores de tres fases para producir una buena suspensión minimizando los costos energéticos. Se puede optimizar el sistema en cuanto a los valores de las variables de operación que maximicen el % de sólidos suspendidos o minimicen los costos de operación



Analisis de contenidos
promedio.

Impeller	Model
3MPU, exit	$\%w/v = -0.825 + 0.547 (vvm) + 0.392 (h) - 5.8 \cdot 10^{-3} (rpm)^2 - 0.059 (h)^2$
3MPU, mean	$\%w/v = 0.23 + 1.29 (vvm) + 0.006 (rpm) + 0.57 (h) - 0.30 (vvm)^2 - 4.14 \cdot 10^{-4} (rpm)^2 - 0.07 (h)^2$
6MFU, exit	$\%w/v = 2.18 + 0.005 (rpm) - 1.25 (h) - 0.001 (vvm)(rpm) - 0.092 (vvm)(h) + 0.0009 (rpm)(h) - 3.5 \cdot 10^{-4} (rpm)^2 + 0.074 (h)^2$
6MFU, mean	$\%w/v = 0.84 + 0.014 (rpm) - 0.046 (h) + 0.001 (vvm)(rpm) - 1.1 \cdot 10^{-3} (rpm)^2 - 0.046 (h)^2$

Respuestas
Modeladas en base a
polinomios con influencia
de las variables.

	Pitched-blade turbine (6MFU)		Marine propeller (3MPU)	
	Exit	Mean	Exit	Mean
Solids, %w/v	5.02	5.26	4.15	5.6
Agitation rate, rpm	630	760	770	860
Impeller height, cm	13.0	8.7	9.1	9.0

condiciones optimas

problema que puede
minimizarse a este tipo
de estudio.



ESTRATEGIAS DE MANIPULACIÓN AMBIENTAL Y GENÉTICA EN LA TECNOLOGÍA DE CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES

Claudia Altamirano

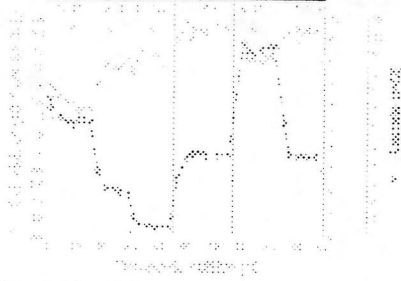
Escuela de Ingeniería Bioquímica
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

El uso de hospederos procariotas para la expresión heteróloga de genes eucariotas plantea dificultades y limitaciones derivadas de su incapacidad de procesar correctamente la información clonada y de configurar adecuadamente la proteína recombinante sintetizada. Así, es una limitación importante la incapacidad del hospedero procariota de realizar modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación, que resulta en la mayoría de los casos esencial como determinante de la funcionalidad biológica de las proteínas recombinantes empleadas en terapia humana. Por el contrario, las líneas celulares animales establecidas (LCE) representan excelentes hospederos para la expresión heteróloga de genes de naturaleza eucariota. Su capacidad de procesar adecuadamente la información clonada, de configurar adecuadamente la proteína de interés y excretarla en forma funcional, representa ventajas de enorme relevancia que deben ser contrastadas con sus inherentes limitaciones tecnológicas: baja velocidad específica de crecimiento, fragilidad estructural y requerimientos nutricionales complejos. El avance tecnológico para la producción de proteínas recombinantes en LCE se produce por dos vías complementarias. La primera se refiere al mejoramiento de las condiciones ambientales para la producción de la proteína de interés. La otra se refiere a las manipulaciones genéticas, orientadas a la construcción de vectores de expresión adecuados y a la obtención de mutantes metabólicamente mejorados. La presente charla tiene por objeto analizar estas dos aproximaciones, empleando diversos casos descritos en la literatura.

Bibliografía

- Altamirano, C., Cairo, J.J. and Gòdia, F. Decoupling Cell Growth and Product Formation in CHO Cells through Metabolic Control. *Biotechnol. Bioeng.* **76**: 351-360, 2001.
- Altamirano, C., Illanes, A., Casabiancas, A., Gámes, X., Cairó J.J. and Gòdia, F. Analysis of CHO cells metabolic re-distribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture. *Biotechnol. Prog.* **17**: 1032-1041, 2001.
- Altamirano, C., Paredes, C., Cairo, J.J., and Gòdia, F. Improvement of CHO cell culture medium formulation: Simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnol. Prog.* **16**: 69-75. 2000.
- Bailey, J. E. 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science* **252**: 1668-1675.
- Fussenegger, M., Mazur, X., Bailey, J. 1998. A novel cytostatic process enhances the productivity of CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 927-939.
- Glacken, M.W. 1988. Catabolic control of mammalian cell culture. *Bio/technol.* **6**: 1040-1050.
- Glassy, M.C., Tharanka, J.P., Chau, P.C. 1988. Serum-free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 1015-1028.
- Irani, N., Wirth, M., van den Heuvel, J., Wagner, R. 1999. Improvement of the primary metabolism of cell culture by introducing a new cytoplasmatic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnol. Bioeng.* **66**: 238-246.
- Köhler, G., Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497.
- Mastrangelo, A.J. 1999. Inhibition of apoptosis in mammalian cell culture, pp. 162-185. In: M. Al-Rubeaid (ed). *Cell Engineering*. Kluwer Academic Publishers, London.
- Wagner, R. 1997. Metabolic of animal cell culture processes, pp 192-232. In: H. Hauser and R. Wagner (ed.), *Mammalian cell biotechnology in protein production*. Walter de Gruyter, Berlin.
- Wagner, R. 1997. Metabolic of animal cell culture processes, pp 192-232. In: H. Hauser and R. Wagner (ed.), *Mammalian cell biotechnology in protein production*. Walter de Gruyter, Berlin.
- R. E. Spier, J.B Griffiths. *Animal Cell Biotechnology*. Academic Press. NY (1985)

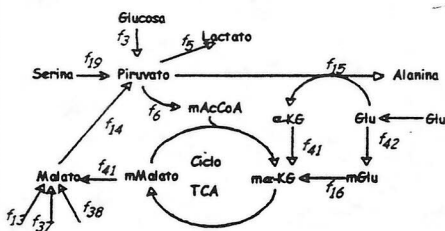
Cultivo continuo de células CHO con diferentes concentraciones de glucosa en la alimentación.



Altamirano et al. Biotechnol. Prog. 2001

Objetivo: lograr regular metabolismo de glucosa y glutamina.

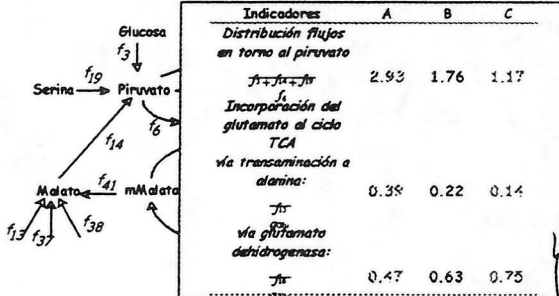
Interrelación entre el metabolismo de la glucosa y la glutamina



Altamirano et al. Biotechnol. Prog. 2001

x análisis de flujo metabólico se puede regular el metabolismo

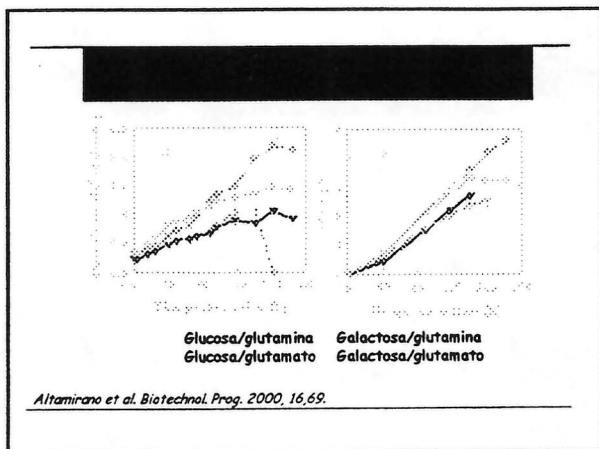
Interrelación entre el metabolismo de la glucosa y la glutamina



Altamirano et al. Biotechnol. Prog. 2001

! => piruvato va a TCA.

eficiente



↑
Talon pa' el gráfico.

Cultivos de células CHO con fuentes de carbono y energía lentamente metabolizables

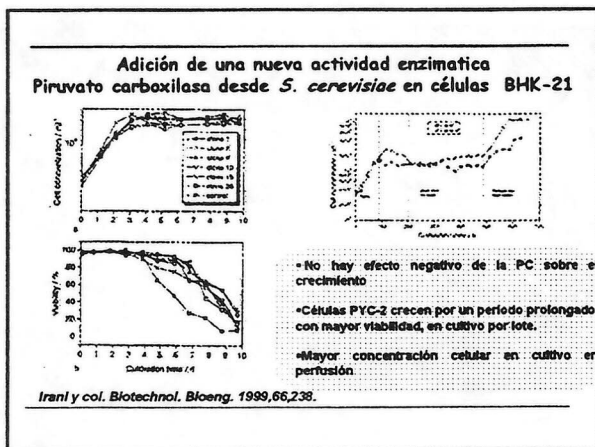
	glucosa/ glutamina	galactosa/ glutamina	glucosa/ glutamato	galactosa/ glutamato
μ	100	70	83	67

Altamirano et al. Biotechnol. Prog. 2000, 16,69.

Cultivos de células CHO con fuentes de carbono y energía lentamente metabolizables

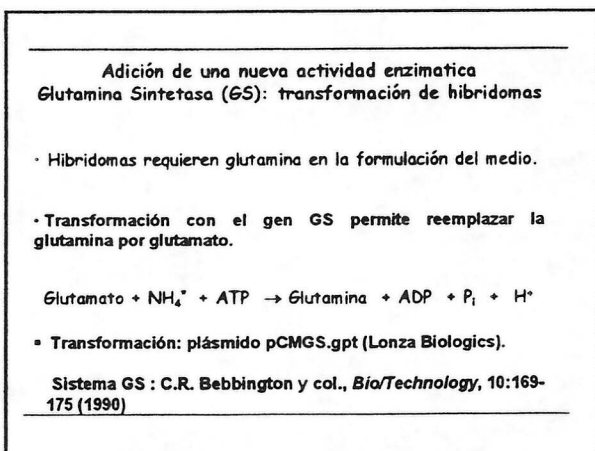
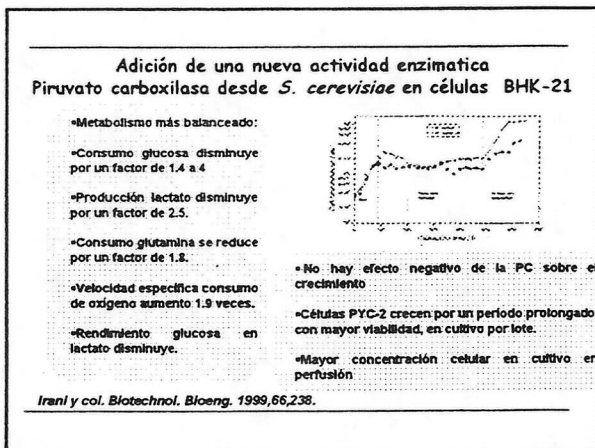
	glucosa/ glutamina	galactosa/ glutamina	glucosa/ glutamato	galactosa/ glutamato
μ	100	70	83	67
q_c	100	27	64	21
q_{lac}	100	18	62	14

Altamirano et al. Biotechnol. Prog. 2000, 16,69.



≠ clones.

Otra alternativa perfusión (permite cultivos de alta densidad).



hibridomas: útiles por
 Ab. monoclonales no tienen
 actividad glutamina sintetasa

Inhibición de Apoptosis

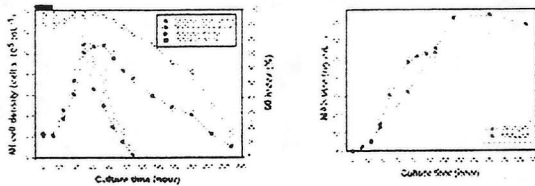
⇒ Modulación de enzimas en la fase ejecutora de la apoptosis:

Sobreexpresión de miembros de la familia del *bcl-2* (*bcl-2*, *bcl-x_L*, *E1B-19K*, *BHRF1*)

⇒ Aunque la completa inhibición puede ser difícil de realizar una, protección parcial que retrase la apoptosis puede ser substancial desde el punto de vista de bioprocesos.

→ inhiben Apoptosis.

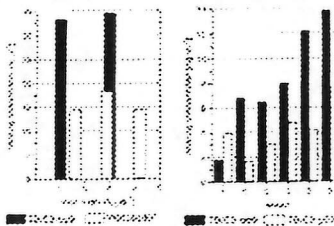
EM en apoptosis: prevención de muerte celular de hibridomas por sobreexpresión de *bcl-2*



- Prolonga crecimiento y mejora la viabilidad en cultivo por lote
- Incrementa la concentración final de Mab (IgG)

N.H. Simpson *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 54:1-16 (1997)

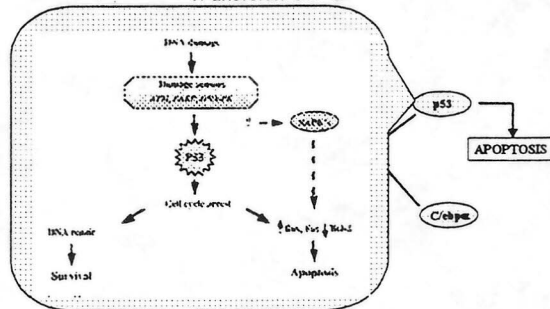
EM en apoptosis: estabilidad del efecto protector de la sobreexpresión del *bcl-2* en cultivos continuos en perfusión



- Incremento de la productividad de Mab por sobreexpresión de *bcl-2* en hibridomas cultivados en perfusión: lecho empacado (izquierda) y hollow fibers (derecha)

D. Fassnacht *et al.*, *Cytotechnol.* 30: 95-105 (1999)

Ciclo celular: Vías regulatorias claves que afectan la transición G1-S



Adaptado de M. Fussenegger and J.E. Bailey, en *Cell Engineering*, Al Rubeal (Ed.), 1999

CONTROL DEL CICLO CELULAR

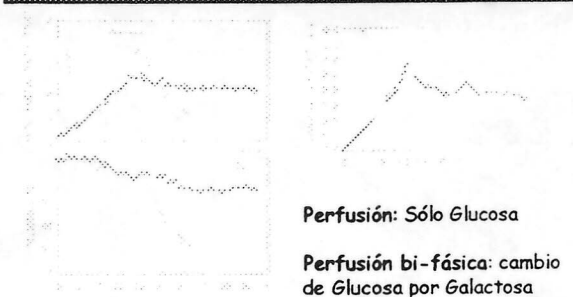
ADITIVOS QUIMICOS

- Ej. Timidina, hidroxiurea, factor -β de crecimiento transformado (TGF β), butirato.
- Problemas de citotoxicidad
 - Costo de la sustancia inhibitoria

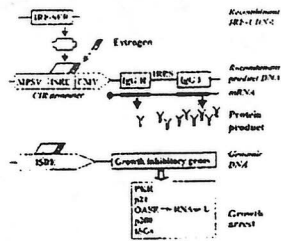
LIMITACION O DEPRIVACION DE NUTRIENTES

- Ej. Suero, Isoleucina, fosfatos
- Baja viabilidad
 - Baja productividad
 - Depende de la línea celular

Cultivos en Perfusion de células CHO. Efecto del crecimiento celular en función de la perfusión de glucosa y galactosa.



IM en Ciclo celular: Control de la proliferación basado en el sistema IRF-1 (Factor-1 regulador de interferon)

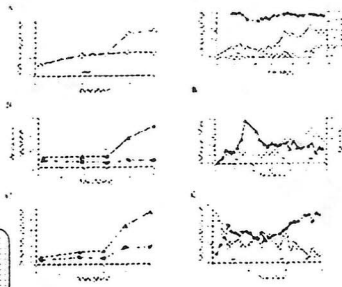


MPSV: elemento potenciador
CMV: promotor mínimo
ISRE: secuencias consenso de unión de IRF-1
IRES: internal ribosomal entry sites de virus de polio.

* IRF-hER (IRF-1/proteína de fusión receptora de estrógeno): induce el control de la expresión del producto y el control del crecimiento.

Ch. Geserick et al., *Biotechnol. Bioeng.* 69: 266-274 (2000)

Control de la proliferación basado en el sistema IRF-1. Cultivo de células BHK: exposición intermitente de estrógeno

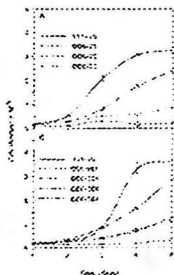


Parada del crecimiento

Prolongado control de la proliferación en cultivo en perfusión

Ch. Geserick et al., *Biotechnol. Bioeng.* 69: 266-274 (2000)

IM de células CHO Expresión de múltiples genes: parada del crecimiento, protección de apoptosis y expresión del producto



* p21, inhibidor cyclin-dependiente quinasa
C/EBPα, CCAAT/mejorador - de unión
proteína α (estabiliza e induce p21)
• SEAP, fosfatasa alcalina secretada

* p27, inhibidor cyclin-dependiente quinasa
• bcl-x_L, protección de apoptosis
• SEAP, fosfatasa alcalina secretada

M. Fussenegger et al., *Nature Biotechnol.* 16:468-472 (1998)

*número de vueltas
del agitador por al cambio
mezclamiento completo.*

$$N \cdot t_M = K \left(\frac{T}{D} \right)^a$$

$$\begin{matrix} 2,8 > a > 1,5 \\ 7,2 > K > 0,9 \end{matrix}$$

Prochazka y Landau:

$$N \cdot t_M = 0,905 \left(\frac{T}{D} \right)^{2,75}$$

*factor de corrección
⇒ grado de dispersión*

X_C : inhomogeneidad media integral, $(C_t - C_m)/(C_m - C_i) \sim 0,05$
 $X_0 \sim 2,0$ (1,0 - 3,0)

Ecuación de Norwood y Metzner entrega valores bajos
(en la práctica).

T : diámetro tanque

D : " del rotor.

K : varía dep. principal % del
tipo de agitación etc.

ESCALAS DE AGITACIÓN:

• Escala definida arbitrariamente en base a efecto de mezclado manifestado visual o instrumentalmente

• Entre otras, la compañía Chemineer ha definido escalas numéricas de 1 a 10, dando definiciones para cada nivel según las características de lo que se desea mezclar. Por ejemplo:

Agitación nivel 2 podrá mezclar dos fluidos si la diferencia entre sus gravedades específicas es 0,1 o menos.

Agitación nivel 6 podrá mezclar dos fluidos si la diferencia entre sus gravedades específicas es 0,6 o menos

Agitación nivel 10 podrá mezclar dos fluidos si la diferencia entre sus gravedades específicas es 1,0 o menos

Para el caso de suspensión de sólidos, Acevedo y Aroca (1986) definieron una escala de 6 niveles. Por ejemplo:

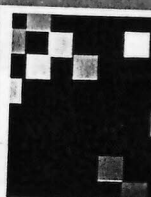
Agitación nivel 2: los sólidos decantados cubren más del 80% del fondo de la vasija

Agitación nivel 4: se observa buen mezclamiento en casi todas las zonas; no más de 10% del fondo cubierto con sólidos

Agitación nivel 6: se observa completa homogeneidad y turbulencia en toda las zonas

semi cuali y semi cuanti.

*Muy usado x empresas q
fabrican agitadores, y así
describen su agitador.*



Revista de la Asociación de Biólogos de Chile
Volumen 10, Número 1, 1998

Biotecnología Ambiental

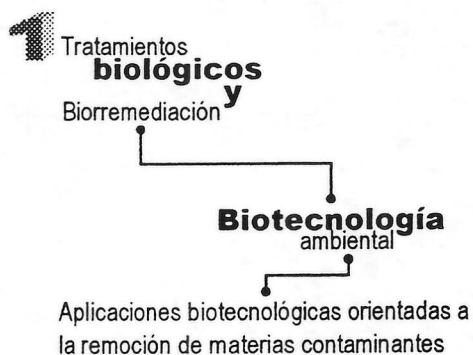
VII Curso Latinoamericano de Biotecnología
XXXVIII Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica

Introducción
**Biotechnología Ambiental: Tecnología de
punta para un Crecimiento
Sustentable.**

Rolando Chamy,
Octubre 2003

**BIOTECNOLOGIA
AMBIENTAL**

Plantas lodo activas



Técnicas de Prevención de la Contaminación

Biorremediación: Recuperación

TRATAMIENTO BIOLOGICO DE EFLUENTES

(líquidos).

R_{il} = residuos industriales
líquidos.

R_{is} = residuos industriales
sólidos

TIPOS DE AGUAS RESIDUALES

Agrarias

Industriales

Urbanas o residuos

municipales.

(ASM: aguas servidas municipales)

Agrarias: son + bien difusos,
difíciles de controlar con contami-
nación complicada.

Industriales: son concentrados y
específicos.

Tratamiento

Efluente
contaminado



Agua de pureza
razonable

etapas de trat.

Pretratamiento

Elimina materia que provoca
problemas de mantenimiento
y funcionamiento de la PTR
(ramas, piedras, arena,
aceites y grasas, etc.)

} depende del
un posterior, depende de la normativa.

	Tratamiento (% remoción)		
	Primario	secundario	terciario
DBO	35	90	99.99
DQO	30	80	99.8
SS	60	90	
N	20	50	99.5
P	10	60	variable

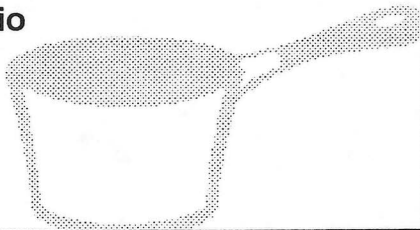
Primario SS.

Sec. Mat org. disuelta.

Terc. nutrientes (N, P...).

Tratamiento biológico

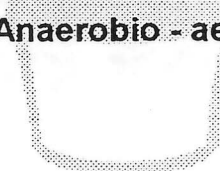
- Secundario
- Terciario



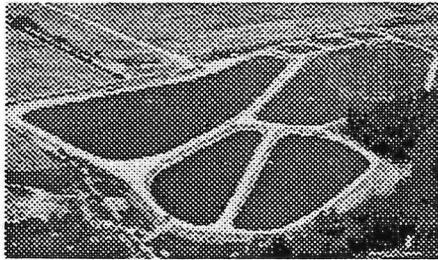
Normal % parten con insulación previa.

Tratamiento biológico

- Aerobio (req. O_2)
- Anaerobio (no req. O_2 pero generan biogás (metano))
- Mixto: Anaerobio - aerobia (en int. anaerobios de desaturación es...

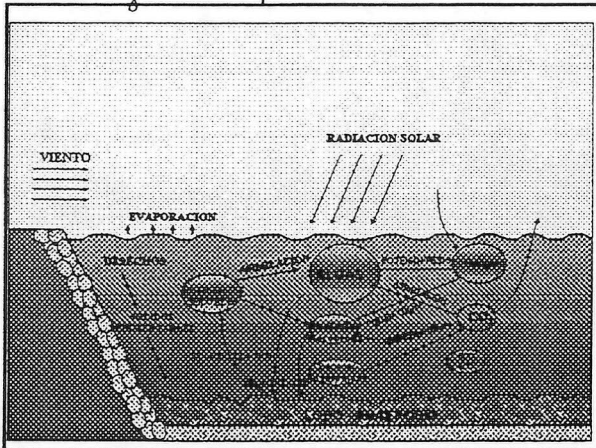


... es difícil llegar a T reducidas x eso se juntan).



Las lagunas en serie imitando
flujo piston.

Laguna facultativa



nicho ecológico
Se deben considerar T°
ambiental ya que con
grandes variaciones se
estará expresando & no.

TRH: Tiempo de residencia

	Aireada	Aerobia	Facultativa	Anaerobia
Profundidad (m)	1,8-6,0	0,3-0,5	1,2-2,4	2,4-4,8
TRH (días)	3,0-10,0	4,0-40	5,0-30	20-50
Carga orgánica (KgDBO/m ² .día)		17-180	56-200	225-560
tiempo (%)	80-95	60-95	80-95	50-85
Conc. algas (mg/L)	0	5,0-260	5,0-20	0,0-5,0
SST efluente* (mg/L)	80-250	10-300	40-60	80-160

* incluye algas, microorganismos y sólidos suspendidos residuales

Diseño de reactores de flujo pistón

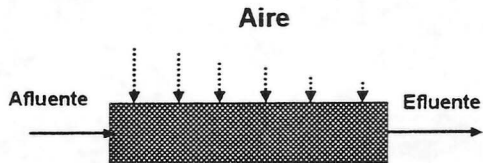
Considerar "n" reactores perfectamente agitados en serie



Tecnologías para el tratamiento de efluentes líquidos

Tipos de tanques de oxidación

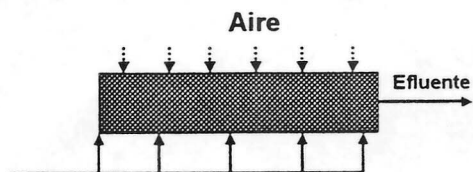
→ Aireación graduada (Flujo pistón)

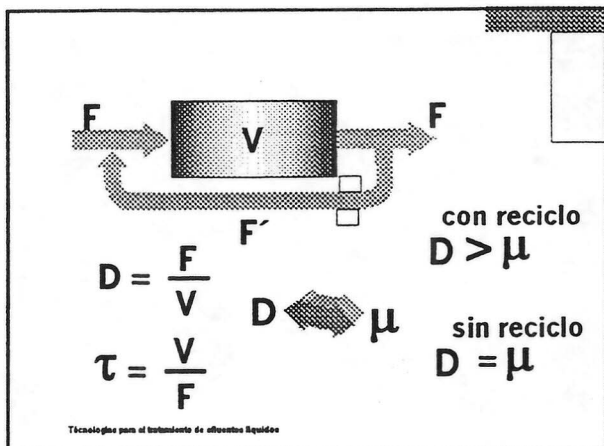


Aireación cooperacional importante.

Tipos de tanques de oxidación

→ Con alimentación escalonada (Flujo pistón)





flujo me lo da el problema.
 => manejo volumen.

Para modelaciones, siempre se supone:

- Estado estacionario
- Temperatura y propiedades del fluido constantes
- Depuración en el sedimentador secundario despreciable
- μ depende de S de acuerdo a Monod
- $Y_{x/s}$ es constante
- Concentración celular (biomasa activa) se expresa como SSV
- Concentración de sustrato limitante se expresa como DBO o DQO

$$\mu = \mu_M \cdot \frac{S}{K_s + S}$$

Tecnologías para el tratamiento de efluentes líquidos

como medida $[I]$ celular. Esta se expresa como $[S]$ sólidos suspendidos volátiles $[I]$.

análisis DBO de una S días

DQO: + repetitiva => es mejor

con control de calidad.

Sist. anal robóticos de todas maneras con DQO.



FILTROS PERCOLADORES

Contactor Biológico Rotatorio

- Compacto (A/V) 
- Bajo consumo de energía
- Operación estable
- Modular
- Elevada inversión
- Sensible a temperatura (+bien a variaciones de T° ya que $E \neq 40$)
- Escasa experiencia en su diseño

Tecnología para el tratamiento de efluentes líquidos

Para comunidades de 15 a 20.000 habitantes.

Digestión Anaerobia

Digestión Anaerobia

Proceso biológico que se basa en la transformación a través de una serie de reacciones bioquímicas, de la materia contaminante en un gas cuyos componentes principales son metano y dióxido de carbono.

Ventaja: Metano puede utilizarse como Energía

Antecedentes

- > Digestión anaerobia para el tratamiento de aguas residuales: gran desarrollo durante los últimos 25 años.
- > Reactores de primera generación: $TRH = TRS$.
- > Reactores de segunda generación: $TRH < TRS$. *Gran avance porque:*
 - = Existe inmovilización de la biomasa.
 - = Mayor concentración celular. (granular)
 - = Mayores velocidades de carga orgánica.
 - = UASB: reactor anaerobio de mayor éxito. (de lecho de manto de lodos)

(300ds).

$TRH =$ tiempo retención hidráulica

$TRS :$ u u sólidos.

Anaerobio crecimiento lentísimo

baja 1 día.

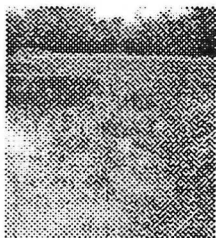
Trat. aguas cerveceras.

Anaerobio 1000 m³ $\Rightarrow$ Anaerobio 15000 m³

• Kilon de DQO que puedo tratar x día x m³ de reactor (Normal 10-15). (Lo de activo super 1/2 a 2)

Wetland

Humedal



Áreas saturadas por agua con una frecuencia y duración tal que sea suficiente para mantener condiciones de saturación.

Simbiosis entre Ho del lecho y
raíces. Sist muy interesante
para pequeños comedores.
Se hacen en situaciones
controladas. agua x el fondo.

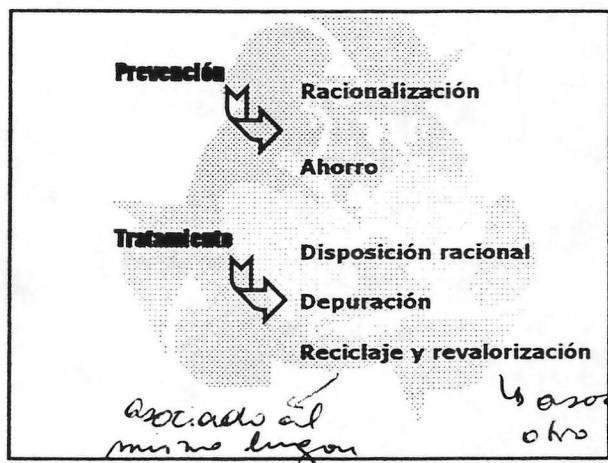
TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE RESIDUOS SÓLIDOS

Tipo de Tratamiento	Ejemplo
Biológico de residuos orgánicos.	biogas, proteína unicelular
No biológico de residuos orgánicos	incineración, fabricación materiales de construcción.
Biológico de residuos inorgánicos	Eliminación metales pesados, lixiviación
No biológico de residuos inorgánicos	reciclaje de metales

revisar libros.



REVALORIZACION DE RESIDUOS



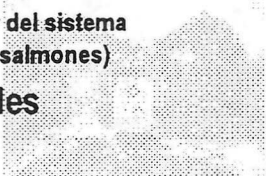
Revalorización de Residuos Agroindustriales

- ❖ Producción de carbón activado
- ❖ Producción de alcohol a partir de residuos ricos en azúcares
- ❖ Producción de proteína microbiana

INDUSTRIA CERVECERA

Crema de levadura:

- Extracto de levadura,
- β -glucanos (Inductor del sistema inmunológico de los salmones)
- Productos Naturales



ej. descartes de cerveza por hacer vinagre de cerveza

Industria del vino

Orujo:

- Extracción de color, antioxidantes y aromas

Pepa de uva:

- Producción de aceite
- Producción antioxidantes

rec. de ácido tartárico (de las bonas)

Remediación de suelos

- ☛ Metales pesados *problema países mineros*
- ☛ Hidrocarburos *u u petroleros.*
- ☛ Análisis de riesgos

BIOSENSORES

- a) Sensores amperométricos.**
- b) Sensores conductivimétricos**
- c) Termistor enzimático**
- d) Sensores ópticos**
- e) Medición de masa celular**

Innovación tecnológica y desarrollo

- ☐ desarrollo de políticas
- ☐ segunda fase exportadora
- ☐ desarrollo futuro del país.
- ☐ mayor valor agregado
- ☐ desarrollando no comprando

Tecnologías Limpias

- ▣ Importancia económica directa
- ▣ Importancia ambiental
- ▣ Disminución costos de tratamiento
- ▣ Mayor precio de venta por marketing ambiental
- ▣ Seguridad frente a posibles denuncias ambientales
- ▣ Trabajo seguro

Tecnologías Limpias

- ▣ Cambio de procesos
- ▣ Minimización y revalorización de residuos
- ▣ Gestión interna de residuos
- ▣ Capacitación
- ▣ Gestores ambientales al interior de la industria
- ▣ Adecuada selección de sistemas de tratamiento

Implementación Tecnologías Limpias

- ▣ Herramientas de Innovación Tecnológica
- ▣ Proyecto rentable en el corto plazo
- ▣ Políticas interna de desarrollo
- ▣ Concientización del problema
- ▣ Asesoría externa no comprometida con soluciones.
- ▣ Difusión

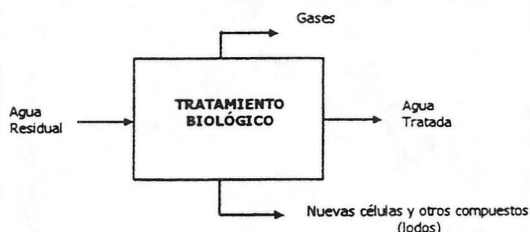
TRATAMIENTO ANAEROBIO DE EFLUENTES CON ALTO CONTENIDO DE SULFATO

LORNA GUERRERO SALDES
Universidad Técnica Federico Santa María
Valparaíso, Chile

Además de M. orgánica

TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS EN AGUAS RESIDUALES

OBJETIVO: Eliminación de la materia orgánica



TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS EN AGUAS RESIDUALES

AEROBIO

Materia orgánica es convertida a CO_2 , H_2O y otros compuestos, además de nuevas células

- 60% de la energía se consume durante la síntesis de nuevas células y el 40% se pierde como calor de reacción.
- 50% del carbono contenido en el sustrato se convierte en biomasa; el otro 50% pasa a CO_2

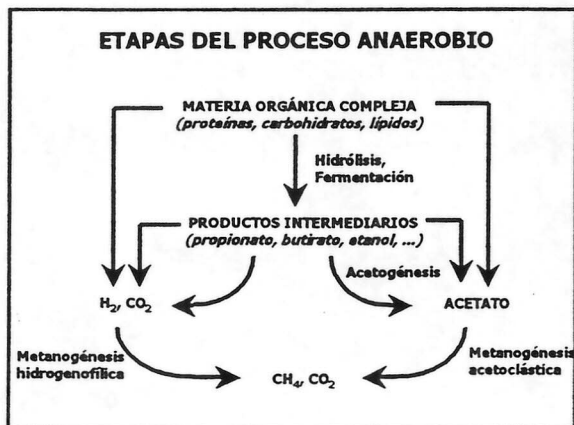
ANAEROBIO

Materia orgánica es convertida en biogás y nuevas células

- 90% de la energía se retiene en el biogás (CH_4 , CO_2 , H_2S) y app. El 7% se pierde como calor de reacción.
- 95% del carbono se convierte en biogás y sólo el 5% se convierte en biomasa

CH_4 es el combustible

SQO: Forma indirecta de medir M. orgánica



Cada flecha es un grupo de poblaciones bacterianas. Aunque no haya sulfato, se produce H_2S x el S presente en las proteínas.

AGUAS RESIDUALES CON SULFATO

SULFATO:

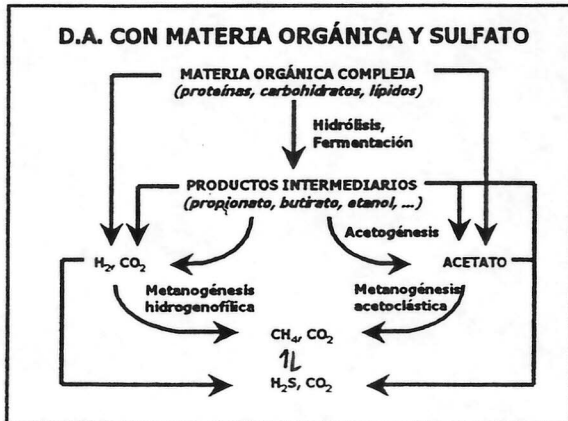
- > Químicamente inerte, no volátil, no tóxico
- > Presente en aguas residuales de industrias que utilizan ácido sulfúrico
- > Presente en aguas residuales de industrias que utilizan materias primas con alto contenido de sulfato
- > También está presente en las aguas residuales de algunas industrias de alimentos
- > Presencia de sulfato se traduce en la generación de H_2S en el biogás de digestores anaerobios

problemático, corrosivo, nocivo

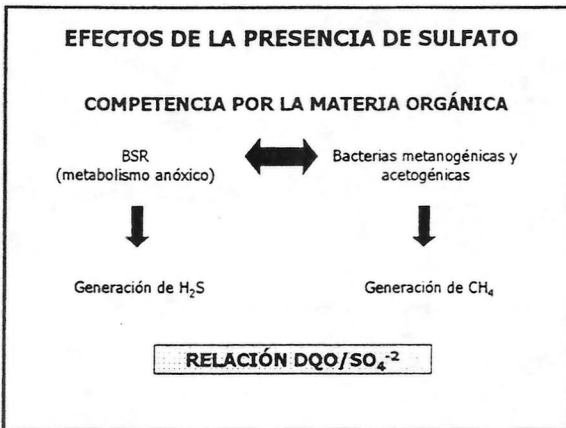
AGUAS RESIDUALES CON SULFATO

INDUSTRIA	DQO (mg/L)	SO_4^{2-} (mg/L)	DQO/ SO_4^{2-}
Fábrica de quesos	3 000	369	8,1
Fábrica de levaduras	17 000	640	26,6
Reprocesadora de papel	3 940	500	7,9
Curtiembre	861 – 30 500 5 000 – 6 000	67 – 3600 1 800 – 3 000	12,9 – 8,5 0,28 – 2,0
Procesos de fermentación	40 000	6 000	6,7
Lixiviados de R.S.	40 – 89 000	3 360 – 16 800	Muy variable
Aguas farmacéuticas	40 000	5 000	8,0

de esta razón depende el comportamiento del proceso anaerobio. y del tipo de proceso que se use.



D.A. Digestión Anaerobia



(H2S ; CH4).
el equilibrio dependerá
de la relación DQO/SO4²⁻

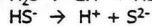
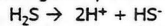
COMPETENCIA POR LA MATERIA ORGÁNICA

Reacciones acetogénicas:	ΔG° [KJ/mol]
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3 \text{H}_2$	+76.2
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2$	+9.6
Reacciones metanogénicas:	
$4 \text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{H}_2\text{O}$	-32.7
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31.0
Reacciones sulfato-reductoras:	
$4 \text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4 \text{H}_2\text{O}$	-38.1
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2 \text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$	-47.6
$4 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3 \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 4 \text{CH}_3\text{COO}^- + 4 \text{HCO}_3^- + 3 \text{HS}^- + \text{H}^+$	-37.6
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 1/2 \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 1/2 \text{HS}^- + 1/2 \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	-66.4

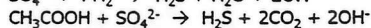
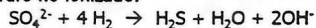
más favorecidas.

INFLUENCIA DEL pH

- Los sulfuros no ionizados es la forma más tóxica para las metanógenas y aumentan con la disminución del pH:



- Las siguientes reacciones muestran que a medida que se genera alcalinidad, el pH tiende a reducir la formación de sulfuro no ionizado.



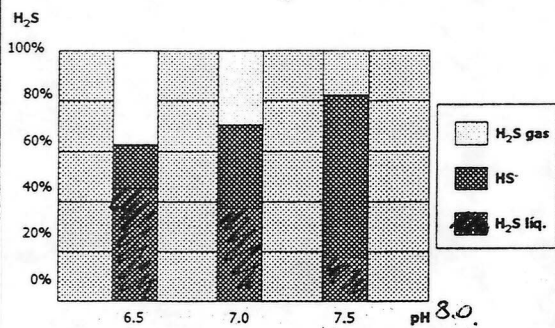
- El pH influye sobre γ y μ de las BSR (óptimos a pH 6.6) → puesta en marcha de reactores con aguas con sulfato a pH cercano a 7 para evitar formación de sulfuro no ionizado.

compuesto no ionizado penetra
la cél. y causa muerte e
inh. del μ .

γ rendimiento

μ veloc. espec. de crecimiento.

INFLUENCIA DEL pH EN LA DISTRIBUCIÓN DE H_2S



pH ideales

TRATAMIENTO DE LAS AGUAS RESIDUALES CON MATERIA ORGÁNICA Y SULFATO

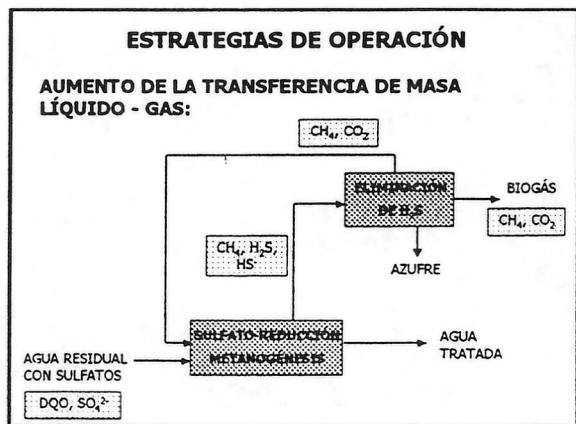
OBJETIVOS:

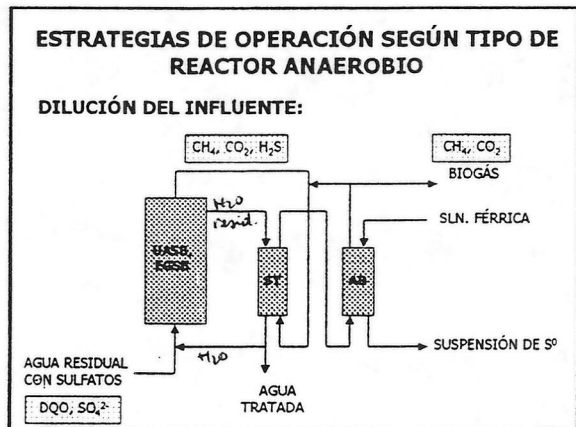
- Eliminación de la materia orgánica.
- Eliminación del sulfato.
- Eliminación de ambos contaminantes.

ALTERNATIVAS:

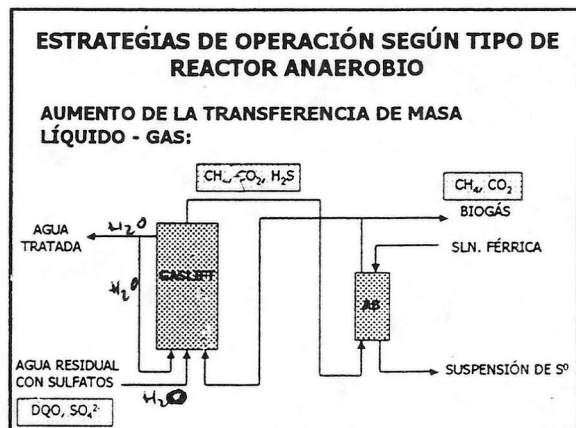
- Suprimir la actividad de las BSR.
- Eliminación previa del sulfato por métodos físico-químicos
- Eliminación conjunta de ambos contaminantes: ✓
 - Implementación de medidas para eliminar el H_2S
 - Alternativa biotecnológica para la eliminación conjunta de materia orgánica y sulfato.

con analogos al sulfato,
o antibiótico pero es muy
caro.





+ uso (reactores de 2ª generación, reactores granulares)
ST: stripping



reactores, con alta $\bar{r}$ de transferencia de masa



DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS XENOBIÓTICOS

Oscar Monroy Hermosillo

Universidad Autónoma Metropolitana

Los compuestos recalcitrantes se clasifican en naturales y xenobióticos. Los primeros siempre se han considerado recursos económicos. Los segundos son productos provenientes principalmente del procesamiento del petróleo y cuyos residuos encuentran de alguna manera su camino para contaminar el agua, suelos y aire.

En estos medio naturales tienen tiempos de degradación natural mas grandes que las tasas de recambio de los sistemas que los reciben, por lo que es importante buscar formas de degradarlos. Se revisan las propiedades químicas que influyen en la biodegradabilidad de los xenobióticos para revisar los mecanismos generales de degradación que son los oxidativos y los reductivos principalmente para romper anillos bencénicos y deshalogenar. Se repasan los procesos biológicos que pueden llevar a acabo estas reacciones con sus respectivos donadores y aceptores de electrones.

Se analizan los métodos para caracterizar la biodegradabilidad de los xenobióticos y las posibilidades de adaptar poblaciones microbianas que usan las distintas reacciones biológicas de oxidación y reducción.

Se estudian los diversos factores que pueden ser manipulados en un reactor y como influye cada uno de ellos en las reacciones de degradación de xenobióticos recalcitrantes. Se proponen algunos procesos para llevar a cabo estas reacciones.

Bibliografía:

- Bhatnagar, L. and Fathepure, B. Z. Mixed cultures in Detoxification of hazardous waste. pp. 293-340, In, *Mixed Cultures in Biotechnology*, Zeikus, G. and Johnon, E. A., eds., McGraw-Hill, Inc.
- Blum D. y Speece R. (1991). *Research Journal*. WPCF, Vol.63(3): 198-206
- Corona-Cruz A., Gold-Bouchot G., Gutierrez-Rojas M., Monroy O. y Favela E. (1999). Anaerobic-Aerobic Biodegradation of DDT (Dichlorodiphenyl Trichloroethane) in Soils, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63:219-225
- Cervantes F.J., van der Zee F.P., Lettinga G., Field J.A. (2001) *Wat. Sc. & Technol.* 44,4:123-128
- Cervantes F.J., Dijksma W., Duong-Dac T., Ivanova A., Lettinga G., Field J.A. (2001) *J.* 67, 4471-4478
- Demirer G. y Speece R. (1997). *Proc 8th Int. Conf. on Anaerobic Digestión* Vol. 2:316-323
- Donlon A. B., Razo E. y Field J. (1995). *Appl. ana Environ. Microbiol.* Vol.61 ;3889-3893
- Fang H. y Zhou G. (1997). *Proc 8th Int. Conf. on Anaerobic Digestión* Vol. 2:308-315.
- Irini A. y Ahring B. (1995). *Appl. And Environ. Microbiol.*, 61:2442-2445
- Jimenez-González A., M. Salazar-González, Gutierrez-Rojas M. y Monroy O. (2001) Anaerobic digestion of a nonionic surfactant: inhibition effect and biodegradation *Wat. Sci. Technol.* 44(4):175-181.
- Jiménez-González A., Siles-Alvarado S. y Monroy O. (2003) Biodegradation of octylphenol polyethoxylates by denitrification, *Wat. Sci. Technol* (en prensa)
- Jukka A. Rintala y Jaakko A. Puhakka. (1994). *Bioresource Technology* 47:1-18
- Leisinger, Cook, Huetter et al., (Editors) *Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds* FEMS Symposium No. 12
- Lin W. Chou y Speece R. (1978). *Biotech. and Bioengineering Symp.* No.8:391-414
- Lin Chou W., Speece R., Siddigi R. y McKeon K. (1978). *Prog. Wat. Tech. Vol.* 10, 5/6:545-553
- Lovley D., Woodward J. y Chapalle F. (1994). *Nature* 370:128-131
- Parkin G.F. y Speece R.E. (1983). *Wat. Sci. Technol.* Vol. 15:261-289

VII Curso Latinoamericano de Biotecnología
XXXVIII Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica

Degradación de compuestos xenobióticos

Oscar Monroy
Universidad Autónoma Metropolitana
MEXICO

12 a 17 octubre 2003
Valparaíso, Chile

Tópicos de discusión

- Tipos de compuestos
- Propiedades químicas que causan resistencia a degradación
- Factores microbianos y ambientales
- Evaluación de la toxicidad
- Estrategias de degradación de xenobióticos en aguas residuales

1. Tipos de compuestos recalcitrantes

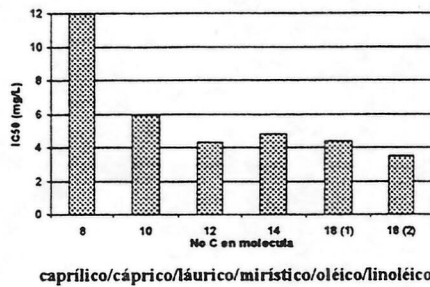
1. naturales: turba, humus, hidrocarburos, ligninas

2. Hechos por el hombre (xenobióticos): e.g. productos del petróleo, pesticidas, detergentes, solventes, retardantes de fuego, plásticos, compuestos nitrogenados, contaminantes prioritarios (molec. pequeños muy persistentes en la naturaleza).

Definiciones:

degradación: mineralización a CO_2 , H_2O , CH_4
transformación: productos intermedios
recalcitrancia: alta resistencia a degradación

Efecto de longitud cadena y dobles ligaduras

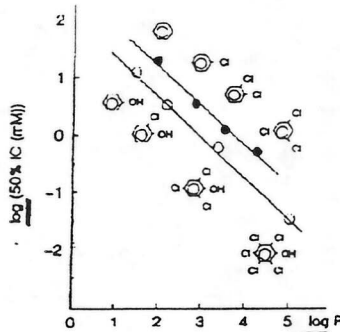


() dobles enlaces.

IC₅₀ [] del compuesto que reduce en un 50 % la actividad microbiana.

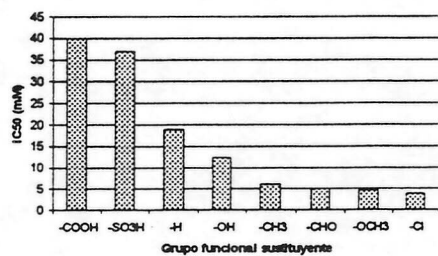
Relación IC₅₀ con biodegradabilidad.

Efecto de la hidrofobicidad



log P coef partición (octanol/H₂O)
medida de hidrofobicidad

Efecto del grupo funcional



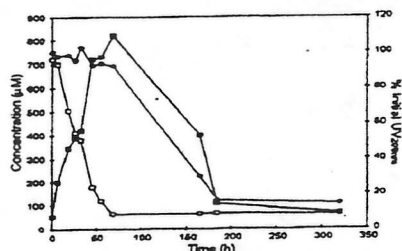
sustituyentes en benceno. Inhibición sobre la m. acetoclática

IC₅₀ mayores son menos tóxicos y + biodegradables.

Mecanismos generales

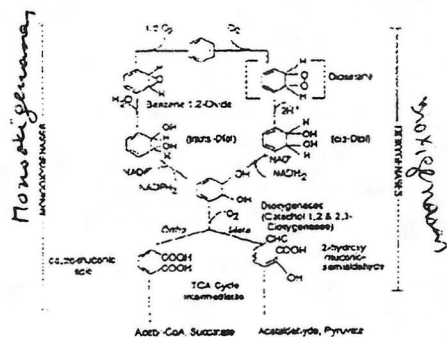
- **Oxigenasas** (catalizan la incorporación de O_2 . Variedad de cofactores: hemo, flavinas, pterinas, Cu, Mn)
 - ◆ Monooxigenasas (hidroxilasas):
 $R-H + NADPH_2 + O_2 \longrightarrow ROH + NADP + H_2O$
 - ◆ Dioxigenasas: $R + O_2 \longrightarrow RO_2$
- **Rompimiento reductivo del anillo**
 - ◆ reducción anaerobia del anillo seguida por el rompimiento del anillo con O_2 para acelerar el proceso
- **Deshalogenación** (*principal % de cloración*)
 - ◆ oxigenolítica (O_2 seguido de pérdida espontánea del haluro)
 - ◆ de cloración reductiva (anaerobia): $R-Cl \longrightarrow R-H$
 - ◆ de cloración hidrolítica $R-Cl \longrightarrow R-OH$

Degradación de 2-nitrofenol (*muy tóxico*) mediante reducción a 2-aminofenol (*menor tóxico*)



Razo et al. 1996

Rompimiento del anillo bencénico



Tipos de bioprocesos

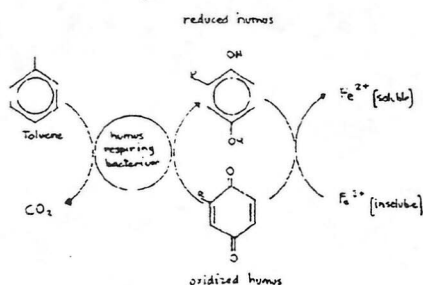
■ Anaerobios

- ◆ Fermentativos: $C_xH_yO_z \longrightarrow R-COOH$
- ◆ Metanogénicos: $Acac \longrightarrow CH_4 + CO_2$
- ◆ Sulfato reductores: $mo + SO_4^{2-} \longrightarrow H_2S + CO_2$
- ◆ Desnitrificantes: $NO_3^- + C_xH_yO_z \longrightarrow N_2 + CO_2 + OH^-$

■ Aerobios

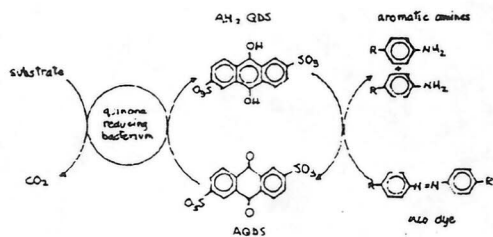
- ◆ respiración: $C_xH_yO_z + O_2 \longrightarrow CO_2 + H_2O$
- ◆ nitrificantes: $NH_4^+ + 2O_2 \longrightarrow NO_3^- + 2H^+ + H_2O$
- ◆ sulfoxidantes: $H_2S + 2.5O_2 \longrightarrow SO_4^{2-} + H_2O$
 $- \quad H_2S + 0.5O_2 \longrightarrow S^0 + H_2O$

Oxidación anaerobia del tolueno acoplada a la respiración de humus



Humus es recalcitrante pero alto % reactivo en Redox.

Humus como mediador de reacciones redox



Reducción de colorantes azo mediada por humus

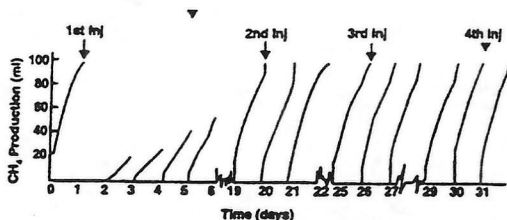
Caracterización del xenobiótico

■ de toxicidad anaerobia (ATA):

◆ x mg DQO-tóxico+2.5 gDQO-acetato/2g SSV durante 3 días. Después ajustar acetato a 0.5 g DQO/g SSV, incubar y medir k_{max} para cada concentración de tóxico. Se reporta como fracción de la k_{max} en el control o bien (mejor) con las ecuaciones de inhibición.

■ de aclimatación. Realimentación frecuente y posiblemente reinoculación.

Adaptación de poblaciones a CN⁻



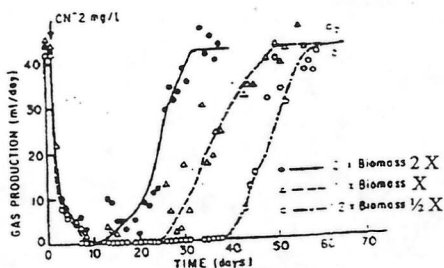
in = inyección de cianuro.

Factores ambientales para la degradación de xenobióticos

1. Tipo de inhibición (sin, comp., no-comp.)
2. Concentración xenobiótico (I)
3. Concentración de biomasa (X)
4. Concentración del sustrato (S)
5. Tiempo de retención de sólidos (TRS)
6. Tiempo de exposición (TRH)
7. Temperatura (Arrhenius)

xenobióticos desde $\mu\text{g/L}$ hasta mg/L en la madurez (+[I])
edad de la biomasa en el reactor (joven faltan enzimas, viejo $\Rightarrow$ de degradación lenta)

Efecto de la concentración de biomasa



Procesos para el tratamiento de efluentes con xenobióticos

- Dilución con otras aguas residuales o por recirculación para bajar concentración de xenobióticos tóxicos.
 - EGSB
 - Lecho fluidificados
- Procesos en dos etapas
 - acidogénico-metanogénico
 - anaerobio-aerobio
 - sulfato reductor-sulfoxidante
 - desnitrificante-nitrificante
 - oxidación-reducción usando mediadores
- Reactores de membrana
 - para separación y concentración del xenobiótico
 - para absorción en película fija



VII Curso Latinoamericano de Biotecnología
XXXVIII Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica
12 - 17 Octubre
Valparaíso - CHILE

ELIMINACIÓN BIOLÓGICA DE NUTRIENTES

M. Cristina Schiappacasse
Escuela de Ingeniería Bioquímica
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

El objetivo de esta presentación es mostrar y discutir las tecnologías de remoción de nitrógeno y fósforo de aguas residuales.

En relación a la remoción de nitrógeno se analiza el proceso de nitrificación (nitritación y nitratación) llevado a cabo por bacterias autótrofas en condiciones aerobias y el proceso de desnitrificación realizado por bacterias facultativas heterótrofas bajo condiciones anóxicas. Se evalúan para cada proceso los factores ambientales que los afectan (pH, temperatura, requerimiento de oxígeno y materia orgánica, e inhibidores) y sus aspectos cinéticos.

Respecto a la remoción de fósforo se exponen los factores claves para que los microorganismos acumuladores de fósforo puedan remover en forma efectiva el fósforo. Se revisan los parámetros ambientales que afectan su comportamiento (relación P/C del afluente, pH, temperatura, tiempo de retención de sólidos y fracción volumétrica anaerobia) y se presentan las tecnologías existentes para su eliminación.

Finalmente, se muestran los sistemas de tratamiento para la remoción de nitrógeno y fósforo en forma conjunta.

VII Curso Latinoamericano de Biotecnología
XXXVIII Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica

TRATAMIENTO DE EFLUENTES
LÍQUIDOS

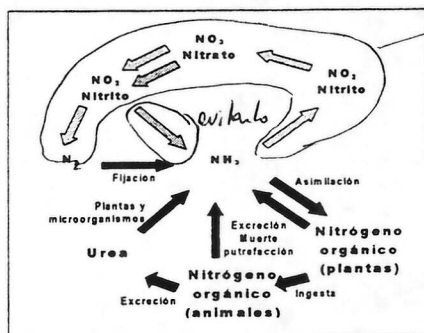
"ELIMINACIÓN BIOLÓGICA DE
NUTRIENTES"

M. Cristina Schiappacasse

OBJETIVOS:

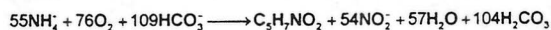
- ☒ Evitar eutroficación de las aguas (N y P)
- ☒ Eliminar amonio que es tóxico para muchas especies de fauna acuática.
- ☒ Evitar disminución de oxígeno disuelto: la oxidación de amonio a nitrato consume 4.27 g O/gN-NH₄.

CICLO DEL NITRÓGENO

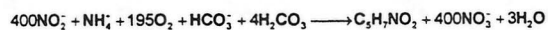


Considerando que la fuente de carbono es bicarbonato y que la célula se representa como $C_5H_7NO_2$ → biomasa.

Oxidación del Amoníaco: Nitrificación



Oxidación del Nitrito: Nitratación



Global:



RENDIMIENTOS CELULARES TEÓRICOS DE *Nitrosomonas* Y *Nitrobacter*

Rendimiento	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrobacter</i>
$Y_{X/N}$ (g SSV/g N)	0.150	0.020
Y_{X/O_2} (g SSV/g O_2)	0.047	0.018
$Y_{O_2/N}$ (g O_2 /g N)	3.160	1.110
$Y_{N/NaHCO_3}$ (g N/g $NaHCO_3$)	0.084	13.330

MODELOS DE INHIBICIÓN POR SUSTRATO

$$1 \quad \left\{ \begin{array}{l} r = \frac{r_{max}S}{K_s + S + S^2/i} \end{array} \right.$$

$$2 \quad \left\{ \begin{array}{l} r = \frac{r_{max} \left(1 + \frac{S}{K_i} \right)}{K_s + S + \frac{S^2}{i}} \end{array} \right.$$

$$3 \quad \left\{ \begin{array}{l} r = \frac{r_{max}S}{K_s + S} \cdot e^{-\left(\frac{S}{K_i} \right)} \end{array} \right.$$

$$4 \quad \left\{ \begin{array}{l} r = \frac{r_{max}S}{K_s + S} \quad \text{para } S < S^* \\ r = \frac{r_{max}S}{K_s + S} \cdot K_i \cdot (S - S^*) \quad \text{para } S > S^* \end{array} \right.$$

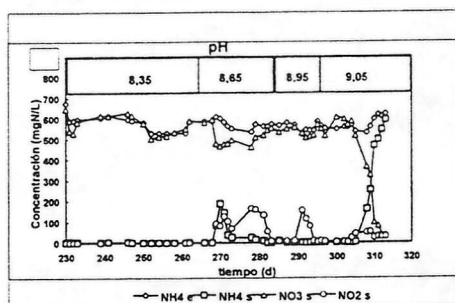
X = g célula seca.
 N = g nitrógeno.

INFLUENCIA DEL pH EN LA NITRIFICACIÓN

- ❖ Grado de inhibición por sustrato
- ❖ Concentración efectiva del sustrato
(equilibrio $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, $\text{HNO}_2/\text{NO}_2^-$,
 $\text{HNO}_3/\text{NO}_3^-$)

} dependiente del pH.

EVOLUCIÓN EN EL RANGO ALCALINO DE COMPUESTOS NITROGENADOS EN EL PROCESO DE NITRIFICACIÓN EN LODO ACTIVO



pH óptimo: 7,4 - 8,5

CONCENTRACIONES INHIBITORIAS DE LA NITRIFICACIÓN

- | | | |
|--------------|---|---|
| Nitrosomonas | { | □ Amoniaco: 2-150 mg N-NH ₃ /L |
| | | □ Acido nitroso: 10-150 mg N-HNO ₂ /L |
| Nitrobacter | { | □ Amoniaco: 0.1 - 1.0 mg N-NH ₃ /L |
| | | □ Acido nitroso: 0.2 - 2.3 mg N-HNO ₂ /L |

DESNITRIFICACIÓN



Características:

- ▶ Microorganismos aerobios facultativos
- ▶ Fuente carbono orgánica
- ▶ Anóxico
- ▶ Aceptor final de los electrones: nitrito o nitrato

RUTA RDNA (Reducción Desasimilativa de Nitrato y Nitrito a Amonio)



Beneficios:

- 📖 Detoxificación ante acumulación de nitrito
- 📖 Reoxidación de cofactores reducidos (NADH)
- 📖 Producción de energía por fosforilación

INFLUENCIA DE RELACIÓN DQO/N

Proceso biológico	Relación DQO/N-NO _x
Metanización y RDNA	>53
Metanización y Desnitrificación	8.9 - 53
Desnitrificación	<8.9

Metano

INFLUENCIA DEL pH EN LA DESNITRIFICACIÓN

Rango: 4.0 -11.0

Optimo: 7.0 - 8.5

INFLUENCIA DE TEMPERATURA EN LA DESNITRIFICACIÓN

Rango: 0 - 50 °C; Optimo: ~ 40°C

$$r_{T1} = r_{T2} \cdot \theta^{(T1-T2)}$$

r_n = Velocidad de desnitrificación T_n (mg N/(mg SSV d))
 θ = Factor de temperatura (1,06 - 1,33)

MODALIDADES PROCESO DE NITRIFICACIÓN - DESNITRIFICACIÓN

 Pre - desnitrificación

 Post- desnitrificación

EXPERIENCIAS DE NITRIFICACIÓN

Reactor	Influente	VCN kgN/m ³ d
Biodiscos	Efluente secundario	0.19
Filtro sumergido	Efluente secundario	0.20
Biodiscos	Efluente secundario	0.23
Filtro sumergido	Efluente sintético concentrado	0.31
Air-lift	Efluente sintético concentrado	5
Filtro sumergido	Efluente sintético concentrado	0.68
Biodiscos	Lixiviado relleno sanitario	0.86
Air-lift	Efluente industrial	1.8

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO NITRIFICACIÓN - DESNITRIFICACIÓN

Opciones:

- ✓ Disminuir los costos de operación
- ✓ Aumentar la VCN

Disminución costos de operación:

- ✓ Disminuir aireación
- ✓ Disminuir adición de materia orgánica en
- ✓ configuración post-desnitrificación

OPTIMIZACIÓN PROCESO NITRIFICACIÓN - NITRIFICACIÓN

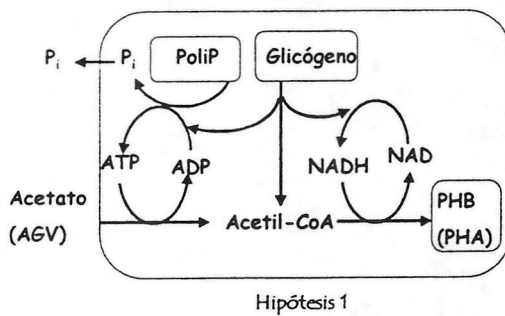
- ✓ Nitrificar parcialmente hasta nitrito
(ahorro 30% requerimiento de oxígeno)
- ✓ Desnitrificar a partir de nitrito
(ahorro 44% materia orgánica)

ELIMINACIÓN BIOLÓGICA DE FÓSFORO

- Bacterias capaces de almacenar intracelularmente fosfato en forma de polifosfato (poliP) a partir de ortofosfato (OAFs).
- Factor clave para obtener una población removedora de P es el paso cíclico del lodo a través de una fase anaerobia seguida de una aerobia, con suministro de sustrato en fase anaerobia.

Hipótesis 1

FASE ANAEROBIA DE OAFs



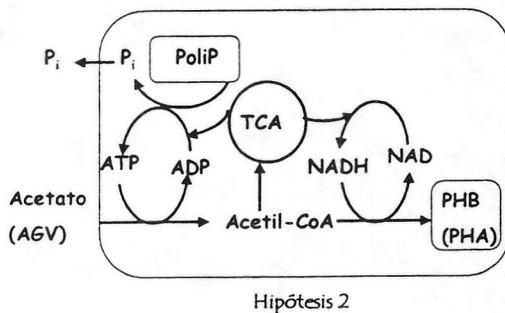
Requiere ac. grasos volátiles,
x ej acetato.

PHA: poli hidroxialcanoato.
PHB: " " butirato.

Fase anaerobia libera P_i al
exterior pero en la aerobia
se incorpora + del q se libera

Hipótesis 2

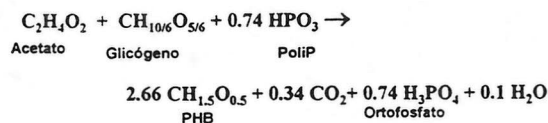
FASE ANAEROBIA DE OAFs



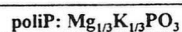
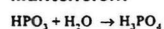
En la fase

FASE ANAEROBIA ESTEQUIOMETRÍA GLOBAL

Consumo de acetato:

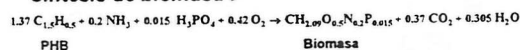


Mantenición:

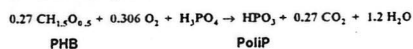


FASE AEROBIA ESTEQUIOMETRÍA GLOBAL

Síntesis de biomasa:



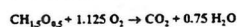
Síntesis de poliP:



Síntesis de glicógeno:



Mantenición:



MICROORGANISMOS OAFs

Aeromonas y Pseudomonas, Acinetobacter, Microlunatos phosphovorus, Lampropedia, Rhodocyclus, Micrococcus, Arthrobacter, Moxaxella, Rhodococcus, Corynebacterium, Flavobacterium, Alcaligenes, Staphylococcus y Enterobacter

RELACIÓN P/C EN EL AFLUENTE

P/C	OAFs	GAO
2/100		predominan
>10/100	predominan	

OAFs: organismos acumuladores de fósforo

OAG: organismos acumuladores de glicógeno

~~GA~~

GAO no acumulan P.

INFLUENCIA DEL pH EN LA FASE ANAEROBIA

pH óptimo : 6.8 ± 0.7

El pH influye en la forma en que se encuentran los AGV (disociados o no) y por lo tanto en la energía requerida para ingresarlo a la célula.



consumo ATP varía según pH

x estado de ionización de AGV (ác. grasos volátiles).

INFLUENCIA DEL pH

→ pH: 5.5 $\alpha_1=0,0$

→ pH: 8,5 $\alpha_1=0,5$

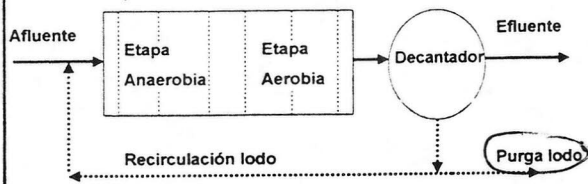
A pH bajos se requiere una menor energía que a pH altos, y por ende se libera menos fosfato en la fase anaerobia, por lo que se requiere en la fase aerobia un menor gasto energético para consumir el fosfato.

PROCESOS TÍPICOS DE EBF

- ❖ A/O
- ❖ Reactor Discontinuo Secuencial (RDS)
- ❖ PhoStrip
- ❖ OWASA "Nitrification".

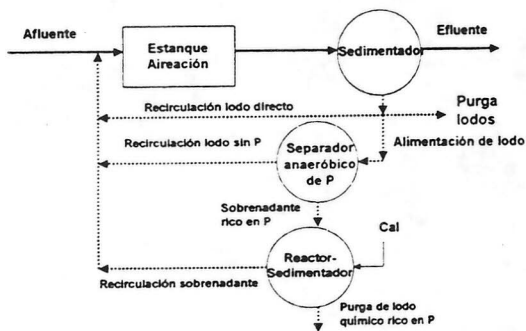
PROCESO A/O

2 reactores #.

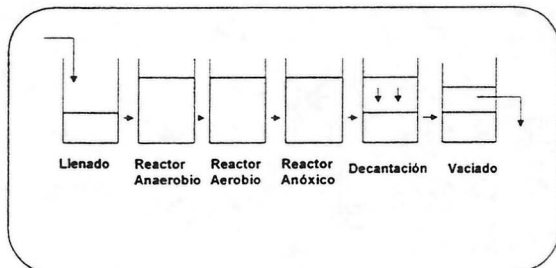


remoción de P del sistema.

PROCESO PHOSTRIP



REACTOR DISCONTINUO SECUENCIAL PARA LA ELIMINACIÓN DE C, N Y P





TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE EMISIONES INDUSTRIALES GASEOSAS

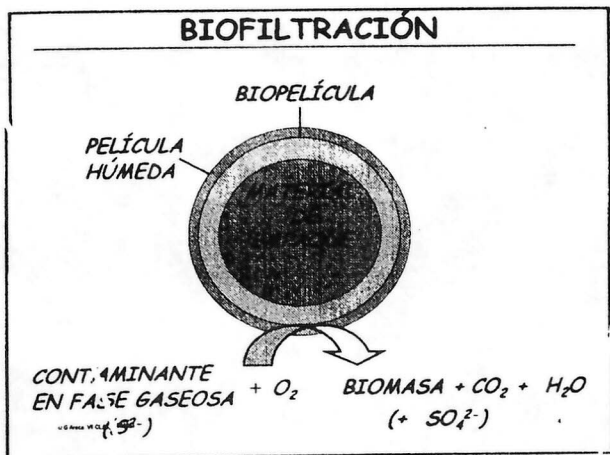
Dr. Germán Aroca A.

Escuela de Ingeniería Bioquímica,
P. Universidad Católica de Valparaíso.

La biofiltración de gases se ha propuesto como una tecnología ventajosa en el tratamiento de gases contaminados con compuestos sulfurados reducidos volátiles, como ácido sulfídrico, sulfuros y mercaptanos, también denominados gases TRS. La biofiltración utiliza poblaciones microbianas puras o mixtas que se establecen sobre un soporte orgánico o sintético de elevada porosidad o alta superficie específica. A medida que el gas fluye a través del lecho, los contaminantes son degradados por la biomasa activa, que los utiliza como fuente de nutrientes y energía. En el caso de la biofiltración de gases TRS la utilización de bacterias del género *Acidithiobacillus* y *Thiobacillus* resulta muy adecuada debido a sus simples requerimientos nutricionales y a su habilidad para utilizar compuestos azufrados reducidos como fuente de energía. El ácido sulfídrico (H_2S) es uno de los principales componentes de las mezclas gaseosas causantes de malos olores en diversas actividades industriales, su umbral de detección olfativo es de 0,13 ppm (0,18 mg/m³), es además incoloro, inflamable, y altamente tóxico a concentraciones mayores de 100 ppmv, su peligrosidad aumenta por el hecho de ser mas denso que el aire. Se presentan los resultados obtenidos en la remoción de H_2S en un biofiltro de turba inoculado con *Th. thioparus*,

Bibliografía

- Chung, Y., Huang, C. and Tseng, C. 1996b. Operation optimization of *Thiobacillus thioparus* CH11 biofilter for hydrogen sulfide removal. *J. Biotechnol.* 52, 31-38.
- Deshusses, M. A. (1997). Biological waste air treatment in biofilters. *Current opinion in biotechnology*, 8, 335-339.
- Furosawa, N., Togashi, T., Shoda, M. and Kubota, H. (1984). Removal of Hydrogen Sulfide by a Peat Fibrous Peat. *J. Ferment. Bioeng.*, 62, 589-594.
- Hirai, M., Ohatke, M. and Shoda, M. 1990. Removal kinetics of hydrogen sulfide, methanethiol and dimethyl sulfide by peat biofilters. *J. Ferment. Bioeng.* 70, 334-339.
- Kanagawa, T., and Mikami, E., 1989. Removal of methanethiol dimethylsulfide and hydrogen sulfide from contaminated air by *Thiobacillus thioparus* TK-m. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 555-558
- Kennes, Ch and Thalasso, F. (1998). Waste gas biotreatment technology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 72, 303-319.
- López, D., Pérez, F., Auria, R. and Revah, S. (1995). Eliminación de Tolueno por medio de Biofiltros. Evaluación del espesor activo. *Avances en Ingeniería Química.*, 5, 54-59.
- Marroquin, E.J., Morales, V.M. and Revah, S., Air pollution: Biotreatment strategies and their environmental impact. In OCED Documents, Wider Application and Diffusion of Bioremediation Technologies. Amsterdam, 1995, pp.407-417.
- Oyarzún, P., Arancibia, F., Canales, C., Aroca G.E.. Biofiltration of high concentration of hydrogen sulphide using *Thiobacillus thioparus*. *Process Biochem.* 39(2): 165-170 (2003)
- Ottengraf, S.P. 1986. Exhaust gas purification. In *Biotechnology*. Edited by H.J. Rehm and G. Reed. Vol. 8, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. 427-452.
- van Groenestijn, J.W. and Hesselink, P.G.M, Biotechniques for air pollution control, *Biodegradation*, 4 283-301.



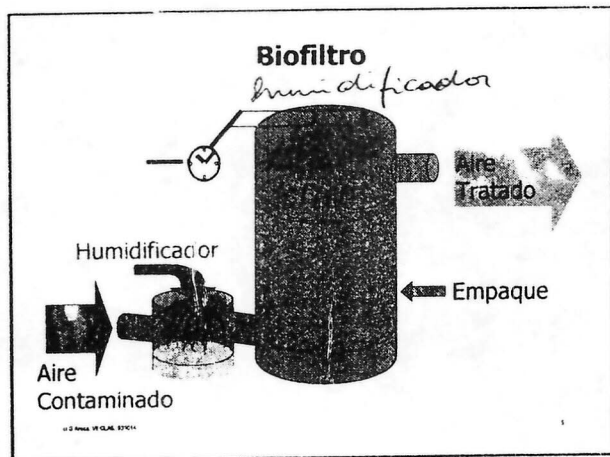
absorbido: en matriz sólida

adsorbido: biopelícula

Material de empaque:

material sintético: cubiertos x biopelícula

material orgánico: biomasa contenida
proceso aerobio

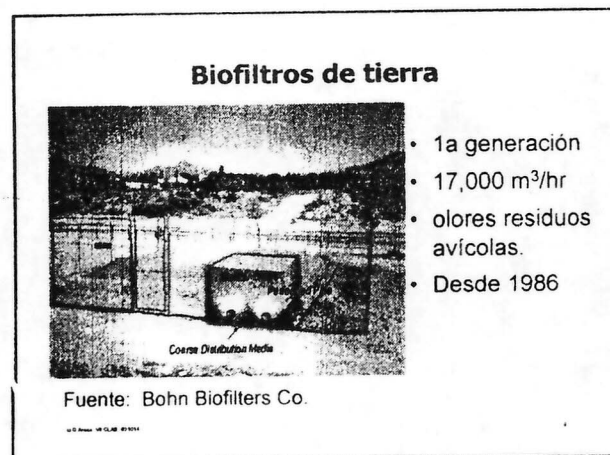


sistema humidificador intermitente
muy importante

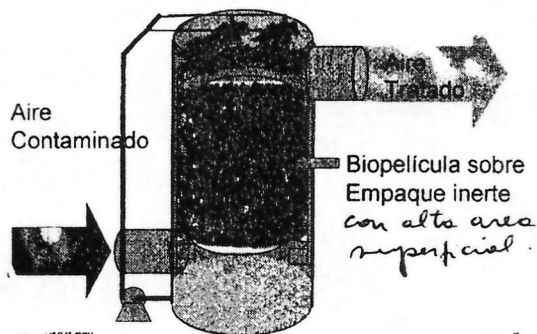
controladores de pH. se agregan

material de empaque:

tierra, turba, madera, aserrín

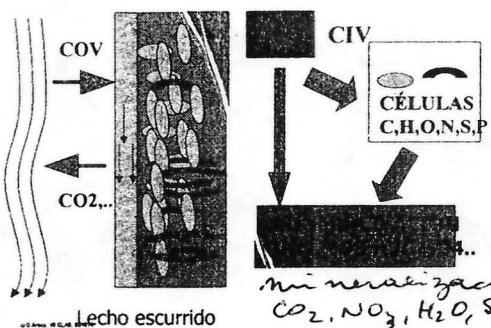


Biofiltro de lecho escurrido



solución con nutrientes.

Degradación de contaminantes



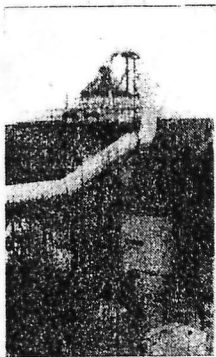
COV: comp. orgánicos volátiles.



Biocyd®

BLE- COV (Biocyd®)

- Imprenta (Monterrey NL)
- Flujo: 50- 100 m³/h
- Volumen: 15.5 m³
- Acetato etilo 30-100 ppm
- Isopropanol 50- 300 ppm
- Tolueno 100- 800 ppm



Biolavador Biocyd®

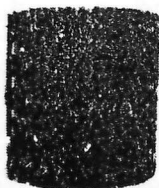
- Planta Celofán (Monterrey NL)
- Flujo: 730 m³/min
- Volumen: 70 m³
- H₂S: 250- 500 ppmv
- CS₂: 200- 900 ppmv

UIC Aroca, VOLUMEN 03/04

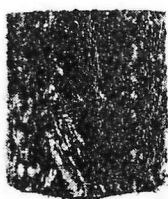
13

Empaques

PVC- estructurado 223 m⁻¹



Empaque limpio



Empaque colonizado

UIC Aroca, VOLUMEN 03/04

14

ACTIVIDADES INDUSTRIALES ASOCIADAS A LA EMISION GASEOSAS DE TRS

- * REFINERIAS DE PETRÓLEO
- * CURTIEMBRES
- * FABRICAS DE ALIMENTOS (PESQUERAS)
- * FABRICAS DE RAYON
- * TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES
- * FABRICAS DE CELULOSA KRAFT

UIC Aroca, VOLUMEN 03/04

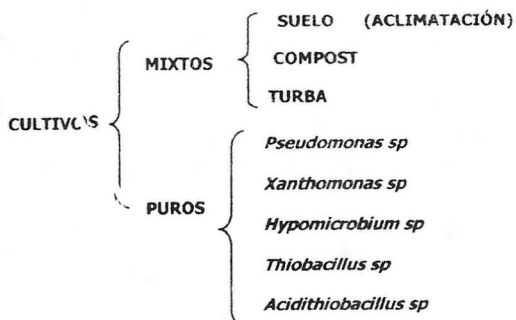
15

Typical off-gas characteristics of kraft pulp mill

Emission Source	Off-gas flow rate (m ³ / ton pulp)	Concentration (ppm by volume)			
		H ₂ S	CH ₃ SH	CH ₃ S-CH ₃	CH ₃ S-S-CH ₃
Digester batch	0.3 - 6000	0 - 1000	0 - 10000	100 - 45000	10 - 10000
Blow gases	0.3 - 100	0 - 2000	10 - 5000	100 - 60000	100 - 60000
Relief gases	0.6 - 6	10 - 300	500 - 10000	1500 - 7500	500 - 3000
Digester Continuous	1500 - 6000	0 - 5	0 - 5	0 - 15	0 - 3
Washer hood vent	300 - 1000	0 - 2	10 - 50	10 - 700	1 - 150
Washer seal tank	0.3 - 12	600 - 9000	300 - 3000	500 - 5000	500 - 6000
Evaporator hot well	500 - 1500	0 - 10	0 - 25	10 - 500	0.2 - 95
Recovery furnace	6000 - 12000	0 - 1500	0 - 200	0 - 100	2 - 95
			(after direct contact evaporator)		
Smelt dissolving tank	500 - 1000	0 - 75	0 - 2	0 - 4	0 - 3
Ume kiln exhaust	1000 - 1600	0 - 250	0 - 100	0 - 50	0 - 20
Lime slaker vent	12 - 30	0 - 20	0 - 1	0 - 1	0 - 1

TRS = 0,5 Kg/ ton pulp

Remoción de Compuestos Sulfurados



• H₂S > MM > DMDS > DMS

Thiobacillus thioparus DW44

Gas	gS/kg dry peat-d
H ₂ S	5.52
MM	1.16
DMS	0.5
DMDS	1.02

degrade por 4 gases de
interés

valores por compuestos
sin mezclar.

Oxidación biológica de Ácido Sulfídrico

- *Clorobium limicola* ~~luz~~
- $\text{H}_2\text{S} + 2 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{CH}_2\text{O} + \text{H}_2\text{SO}_4$
- *Xanthomonas sp*
- *Thiobacillus denitrificans*
- *Thiobacillus thioparus*
- *Acidithiobacillus thiooxidans* (*Thiobacillus thiooxidans*)
- *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*)
- $\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$

U.S. Bureau of Mines, 1974, 1975

25

Microorganismo

Thiobacillus thioparus (ATCC 23645)

Biofiltro

Soporte:

Turba

Humedad: 70-75%

Densidad: 1125 Kg/m³

144,3 m²/g

Biotrickling

Soporte:

Kaldness Miljøteknology AS *relleus*

Norway

280 Kg/m³

1270 m²/m³

73% free volume

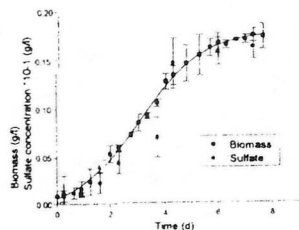


U.S. Bureau of Mines, 1974, 1975

26

Thiobacillus thioparus ATCC 23645

Medium 290 ATCC Modified



$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	15,69 g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,12 g/L
KH_2PO_4	1,8 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,15 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,98 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,12 g/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,022 g/L
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,033 g/L

pH=6,5

- *aumentados*

U.S. Bureau of Mines, 1974, 1975

27

*mejoras en medio de cultivo
pe ↑ biomasa*

Resultados

Eficiencia de eliminación $E_e = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \cdot 100$

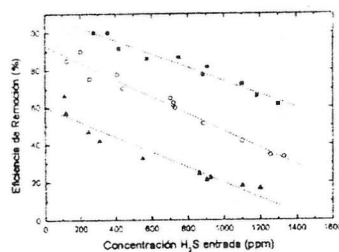
Capacidad de eliminación $C_e = \frac{F \cdot (C_0 - C_e)}{V}$

Carga $L_s = \frac{F \cdot C_0}{V}$

$F = \text{flujo}$

Biofiltro *Th. thioparus*

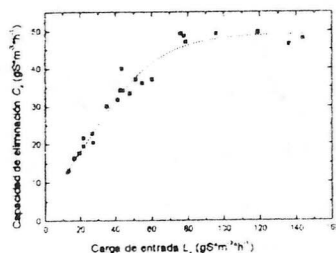
Eficiencia de remoción vs Concentración de entrada



U.S. Patent 4,812,441

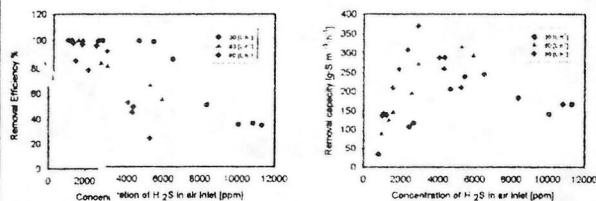
Biofiltro *Th. thioparus*

Capacidad de eliminación vs Carga de entrada



U.S. Patent 4,812,441

Removal of H_2S Biofilm of *At. thiooxidans*, pH 1.8-2.5



Conclusiones

- La operación del biofiltro inoculado con *Th. thioparus* se ve afectada por el pH, el cual es difícil de controlar a pH óptimo reportado (6-7)
- La contaminación de una bacteria quimioautótrofa y acidófila habría permitido el aumento en la capacidad de remoción de H_2S en el biolavador.
- El biolavador alcanzó capacidades de remoción de hasta $300\ g\ S\ m^{-3}\ h^{-1}$ para concentraciones de entrada de H_2S de 1700 ppm cuando el pH se disminuyó hasta pH 2, mostrando similares capacidades hasta concentraciones de 6000 ppm en la entrada cuando fue inoculado con *At. thiooxidans*.
- Las condiciones de operación pueden ser controladas en forma eficiente en el biofiltro de lecho escurrido.

Agradecimientos

Patricio Oyarzún C., Fernando Arancibia, Ljubo Papic
Dariela Nuñez, Cristian Canales, Paula Tello

Prof. Sergio Revah, U.A.M. Iztapalapa, México
Dr. Richard Auria, IRD, Francia
Dr. Pierre Christen, IRD, Francia

El financiamiento otorgado por
- CONICYT a través del Proyecto FONDECYT 1000302
- Dirección de Investigación de la P. Universidad Católica de Valparaíso

Liobacillus se mantiene homogéneo en el tiempo pero no todos los *no.* se comportan =.

→ Método Ott. porque se pueden controlar condiciones en estado sólido (ej. pH)

1.600 kg/m³ referencia

Ca 500 ppm

(120 km²).

VII Curso Latinoamericano de Biotecnología
XXXVIII Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica

**EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS
PARA LA REMEDIACIÓN DE SUELOS
CONTAMINADOS POR METALES
PESADOS**

Rolando Chamy,
Octubre 2003

metales pesados no se
degradan.

contaminan el suelo mismo
y además migran.

Introducción

- Metales pesados: afecta productividad del suelo (agrícola, inmob., recreación)
- Efectos sobre la salud

alrededor de la fundición
(Pachuca) 2000 ton./año
de material particulado.

Tabla periódica completa
en el suelo.

Ahora ↓ a 180 ton/año.

⇒ ahora recup. de metal
(antes agrícolas).

alrededores, índice de cáncer
muy alto.

América, Asia, África.

**Alternativas de remediación y
su evaluación**

- Ex-situ
 - Requiere el movimiento del suelo contaminado desde su lugar de origen
- In-situ
 - Se realiza la remediación en el lugar

Compuestos azufre, Pb, Cu, Ni,
Zinc. etc.

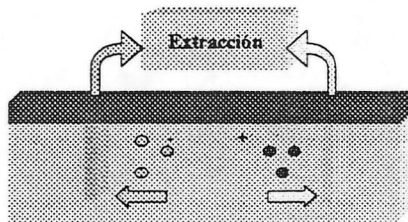
US\$ 125 ton x sacar suelo y llevarlo a otro lado.
EEUU responsabilidad final de la empresa.

Biorremediación de Suelos Contaminados con Metales Pesados - Rolando Chamy

Remediación debe ser sustentable (pagable).

IN-SITU

■ Método electrocinético



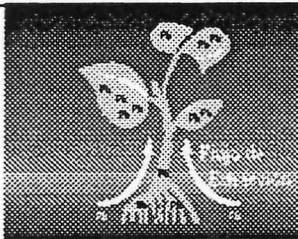
Biológicas

■ Fitorremediación

- Fitoextracción
- Rizofiltración
- Fitoestabilización

■ Microorganismos

- Bioacumulación
- Precipitación de metales
 - Bacterias sulfato reductoras
- Nemátodos



resistentes a M.P.
se alimentan de bacterias
movilidad de bacterias.

Proyecto interdisciplinario.

FitTOEX: plantas hiperacumuladoras.

Fibr. cortar Sa 10 veces ↓ q cualquier
proceso q con. (ej lechugas acumuladoras
Sa 10 años.

Fitoestabilización: impide migración
de m.p. en suelo.

metales como sulfato son solubles
y migran => al aplicar bacterias S.R.
metales insolubles

FITORREMEDIACION

- Fitoextracción
- Rizofiltración
- Fitoestabilización

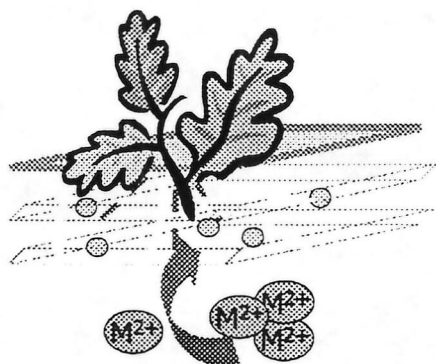
UTILIZACION DE NEMATODOS

- principal producto de excreción de los nemátodos del suelo es el amonio
- Los nemátodos bacterívoros presentan una relación "simbiótica" con la bacteria
- uso de nemátodos bacterívoros colonizadores para potencian la actividad de bacterias biorremediadoras empleadas en procesos de descontaminación de suelos

problema : población.
solución "reactores".

Asociaciones nemátodo-bacteria

- Los nemátodos bacterívoros, a través de sus hábitos alimenticios, tienen la capacidad de dispersar y proteger especies bacterianas en el suelo. Estas bacterias dispersadas por los nemátodos pueden jugar un rol de importancia en los ciclos de nutrientes o promover el crecimiento de la planta, de manera directa, movilizandando nutrientes inmovilizados y mejorando la absorción radicular, o de manera indirecta aumentando la fijación de nitrógeno.



Ensayos con bacterias sulfato reductoras.

- Consumo de sulfato por microorganismos.

Desulfotomaculum
desulfuricans
apra gene

Ensayos con bacterias sulfato reductoras.

- Determinación de tolerancia a concentraciones del suelo de Puchuncaví.

control
concentraciones Cu Ni Zn *SH*
muestreos: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27

Ensayos con bacterias sulfato reductoras.

- Determinación bacterias sulfato reductoras en suelos de la zona de Puchuncaví.

Proshues A B C D
muestreos: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27

(mg SO₄²⁻/g suelo h)

Nota: Muestras de suelo a 1 metro de profundidad.

Procedimientos para la bioremediación de suelos contaminados

- Búsqueda y evaluación de técnicas
- Caracterización del suelo a tratar
- Caracterización de la flora y fauna de los suelos a tratar
- Análisis de la factibilidad de las técnicas de remediación a utilizar en el lugar

COMENTARIOS FINALES

- La remediación ofrece amplias oportunidades de mejoramiento de calidad de los suelos, esto implica un aumento en la plusvalía de éstos, entrando a competir con terrenos no contaminados con demanda inmobiliaria. También pueden generarse tierras agrícolas y para uso industrial. La salud de la población y su calidad de vida tendrá mejores índices



DIGESTIÓN ANAEROBIA DE RESIDUOS SÓLIDOS

Paola Poirrier

Escuela Ingeniería Bioquímica
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

La industria manufacturera normalmente genera importantes cantidades de residuos y subproductos. Los primeros, principalmente efluentes líquidos, generan un agudo y creciente problema de contaminación de nuestros recursos hídricos. Los segundos, sólidos y líquidos, son frecuentemente subutilizados, no obstante el alto valor potencial de sus componentes o de los productos que de ellos puedan derivarse.

Existen una serie de alternativas que permiten aprovechar el potencial de los residuos orgánicos, los que incluyen desde la alimentación humana, por medio de procesos enzimáticos y fermentativos, y la alimentación animal, a través del ensilaje; o métodos que apuntan a la transformación de esta materia disponible por medio del proceso de compostaje y lombricultura, generalmente con fines agrícolas, y por último la valorización energética y la digestión anaerobia.

En general, las referencias existentes hasta finales de la década de los 80, con relación al tratamiento de los residuos sólidos por digestión anaerobia, explicitaban las dificultades del funcionamiento de las instalaciones y sus limitaciones, tanto de carácter técnico como económico. Sin embargo, hoy en día, la aplicación del proceso de digestión anaerobia a residuos orgánicos ha tenido un nuevo auge, debido principalmente a la aparición de legislaciones cada vez más exigentes, especialmente en la Comunidad Europea, en donde se le ha dado prioridad a la aplicación de tecnologías que permitan la revalorización energética de los desechos.

Por lo mismo, las investigaciones en esta área se han incrementado, especialmente en relación con el desarrollo de tecnologías para operar con un elevado contenido de sólidos ("digestión seca") y en condiciones extremas de temperatura (termófila / psicrófila). Otras áreas de experimentación ha incluido los sistemas en dos etapas, aprovechando las diferencias intrínsecas de las poblaciones bacterianas involucradas, y el uso del principio de codigestión.

Bibliografía

- Fernández B., Porrier P., Chamy R. (2001). "Effect of inoculum-substrate ratio on the start-up of solid waste anaerobic digesters". *Water Sci. Technol.* **44**(4):103-108.
- Chamy, R.; Poirrier, P., Schiappacasse, M.C. (1994). "Tratamiento Anaerobio de Residuos Sólidos" en III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio". pp. 217-230. Montevideo, Uruguay.
- Chamy R.; Poirrier P., Schiappacasse M., Alkalay D., Guerrero L. (1998) "Effect of ammonia content in the biodegradability of the salmon industry wastes". *Bioprocess Eng.* **19**:1-5.
- De Baere L. (2000) "Anaerobic Digestión of Solid Waste". *Water Sci. Technol.* **41**(3):283-290.
- McCarty P., Mosey F. (1991) "Modelling of anaerobic digestion processes (A discussion of concepts)" *Water Sci. Technol.* **24**(8):17-34.
- Ghosh S., Klass D. (1978) "Two-phase anaerobic digestion". *Process Biochem.* **13**(4), 15-28.
- Pavan P., Battistoni P., Cecchi F., Mata-Álvarez J. (2000) "Two-stage anaerobic digestion of source-sorted OFMSW: performance and kinetic study". *Water Sci. Technol.* **41**(3):111-118.
- Pavlostathis S., Giraldo-Gómez E. (1991) "Kinetics of anaerobic treatment". *Water Sci. Technol.* **24**(8):35-39.
- Six W., de Baere L. (1992) "Dry anaerobic conversion of municipal solid waste by means of the DRANCO process". *Water Sci. Technol.*, **25**(7): 295-300.
- Poirrier P., Chamy R., Szantó, M. (2003). "Tratamiento Anaerobio de Residuos Sólidos" en : Avances de Biotecnología Ambiental: Tratamiento de Residuos Líquidos y Sólidos. pp 199-246 Chamy, Carrera, Jeison, Ruiz Editores, Valparaíso, Chile.

VII Curso Latinoamericano de Biotecnología

XXXVIII Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica

Digestión anaerobia de desechos sólidos

Paola Poirrier G.

Pontificia Univ. Católica de Valparaíso

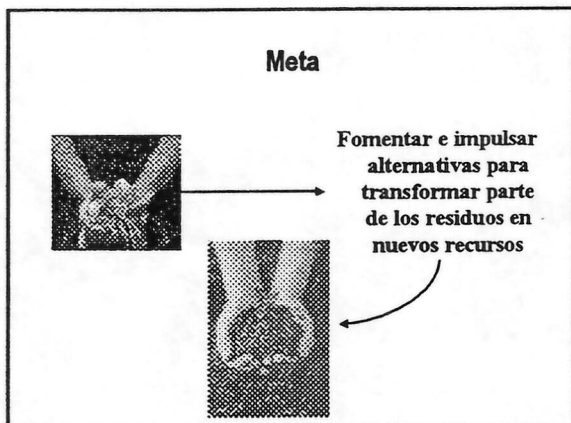
Octubre 2003

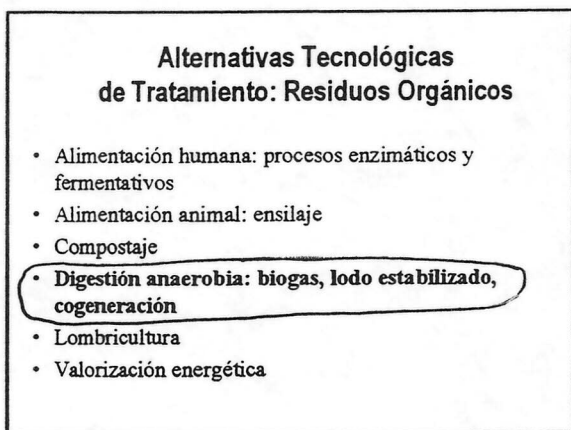
Desecho v/s residuo

- “Desecho” materias generadas en las actividades de producción y consumo que no alcanzan ningún valor económico
- Concepto de desecho es de naturaleza económica, y por lo tanto, dinámico en el tiempo y variable de una región a otra
- **Residuo:** corriente (líquida, sólida o gaseosa) que se obtiene de un proceso y que podría tener uso posterior para un tercero pero no para la actividad que lo genera

Desecho v/s residuo

- **Eliminación de un desecho:** operaciones involucradas no conducen a la recuperación de recursos
- **Gestión de residuos:** dentro de las alternativas consideradas están el reciclado, la regeneración, reutilización directa, etc.





biogas: metano alta % calorífico

↓

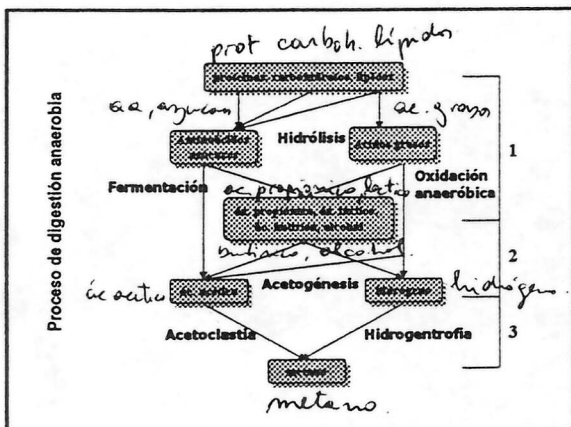
cogeneración = energía

perdig → sint anaerobio

(orig de acistuar) ↓ biogas

premsa quemar

simil



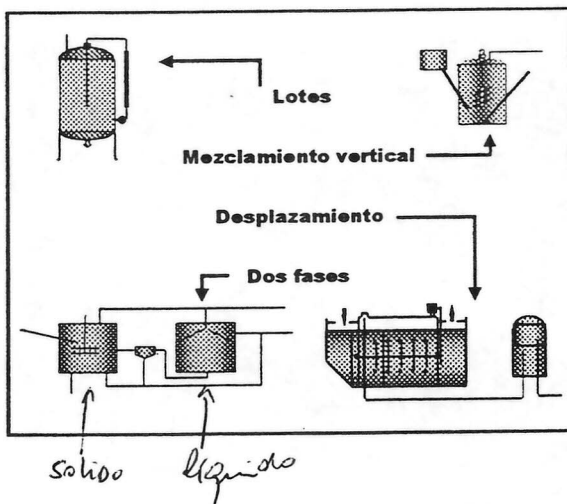
Tipos de tecnologías

- Contenido de sólidos:
 - Diluido: < 2% ST
 - Concentración media: 2 – 12% ST
 - Semisólidos: > 12 %ST
- Modo de operación: continuo, semicontinuo, lote
- Microbiología del proceso: 1 o 2 fases
- RSU:
 - vía seca: ST 20-40%
 - Vía húmeda: ST < 15%

ST = sólidos totales

RIS $\Rightarrow$ 20% ST.

depende contenido de agua



Vía húmeda o seca				
Criterios	Ventajas		Desventajas	
	Seca	Húmeda	Seca	Húmeda
Técnico:	Sin partes móviles internas (reactor). Sin pretratamiento.	Proceso conocido.	Co-digestión de residuos >20 %ST.	Separación fases líquido/sólido. Pretrat. complejo.
Biológico:	Sin pérdida de SV durante pretratamiento. Mayores VCO.	Dilución de inhibidores.	Sin dilución de inhibidores.	Más sensible sobrecargas orgánicas. Pérdida de SV en pretratamiento.
Económico / Ambiental:	Reactores más pequeños. Consumo mínimo de agua. Menor consumo de energía.	Equipos más baratos para manipulación de lodos.	Equipos más caros para manipulación de residuo digerido.	Consumo alto de agua. Reactores más grandes. Consumo de energía elevado.

Experiencia a nivel industrial

- Rivard y col.; pioneros en investigación 1989
- Primera planta industrial RSU: Amiens-Francia 1988 (VALORGA): 55.000 ton/año: 30-35% ST, mesófila
- Directivas CE: eliminación del uso de rellenos sanitarios e impulso para el desarrollo de tecnologías de revalorización energética
- Proceso DRANCO (Bélgica); KOMPOGAS (Suiza); BIOCEL, BTA (Alemania), Biothane, Paques, IBVL, Adtech System, etc.

c/u defiende sus propios procesos; no los dan a conocer fácilmente.

Experiencias a nivel industrial

- Actualmente se encuentran operando mas de 120 plantas a nivel mundial y cerca de 60 en los países de la Comunidad Europea (con capacidad mayor a 3000 ton de residuo/año).
- De los sistemas instalados cerca del 60% operan en el rango mesofílico y no mas del 10% son de dos etapas.
- La mayoría de ellas tratan principalmente FORSU o aplican el principio de codigestión.

FORSU: Fracción orgánica del Residuo Sólido Urbano

Evaluación de los subproductos: sobrenadante

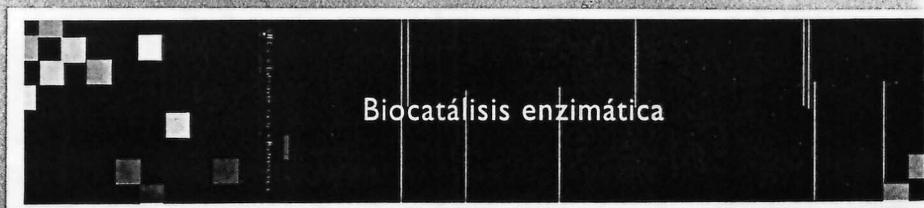
Compuesto	Reactor una fase	Cultivos hidropónicos
N-NH ₃ (mg/L)	1436,8	6,5
P-PO ₄ ⁻³ (mg/L)	261	3,5
Calcio soluble (mg/L)	99,65	41
Magnesio soluble (mg/L)	42,75	6,5
Potasio soluble (mg/L)	474,5	29

REACTOR DE UNA FASE

lo que se requeriría para un cultivo h.

Digestión anaerobia de desechos sólidos

Paola Poirrier G.
Pontifica Univ. Católica de Valparaíso
Octubre 2003



Biocatálisis enzimática



VII Curso Latinoamericano de Biotecnología
XXXVIII Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica
12 - 17 Octubre
Valparaíso - CHILE

FUNDAMENTOS DE BIOCATALISIS ENZIMATICA

Andrés Illanes

Escuela de Ingeniería Bioquímica
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

Se proporcionan los principios básicos de la cinética enzimática y su aplicación al diseño y evaluación de comportamiento de reactores enzimáticos. El tema es tratado en cinco secciones:

En la primera se analizan las principales características y potencialidades de las enzimas como catalizadores de procesos. Se analizan sus aplicaciones convencionales en reacciones degradativas, principalmente hidrolíticas y sus aplicaciones más novedosas que se refieren a los procesos de síntesis orgánica, realizadas de preferencia en medios de reacción no acuosos.

En la segunda se describen los distintos tipos de procesos (continuos, discontinuos, con enzimas solubles e inmovilizadas) y de reactores enzimáticos, se propone un esquema para el diseño y evaluación de comportamiento de biorreactores enzimáticos y se desarrollan ecuaciones básicas de comportamiento, tanto para reacciones degradativas como de síntesis.

En la tercera se analiza el efecto de las restricciones difusionales, tanto externas como internas, en el comportamiento cinético de las enzimas inmovilizadas y se propone una metodología para incorporar dichos efectos a las ecuaciones de comportamiento de los biorreactores enzimáticos.

En la cuarta se analiza el fenómeno de inactivación enzimática y se desarrollan expresiones que dan cuenta de dicho efecto a fin de desarrollar expresiones matemáticas que describan el comportamiento de biorreactores enzimáticos bajo condiciones de inactivación.

Finalmente, en la quinta parte, se integran los efectos de restricciones difusionales y de inactivación en un esquema de diseño que da cuenta de la presencia simultánea de ambos fenómenos.

Bibliografía de apoyo

- Dixon, M. Webb, E. Enzymes 3^a Ed. Academic Press. 1979
- Segel, I. Enzyme Kinetics. Wiley Interscience, New York, 1975.
- Chaplin, M., Bucke, C. Enzyme Technology. Cambridge University Press, New York, 1991
- Messing, R. Immobilized Enzymes for Industrial Reactors. Academic Press, New York, 1975
- Illanes, A. Biotecnología de Enzimas. Ed. Universitarias de Valparaíso, Valparaíso, 1994
- • Illanes, A., Wilson, L. Enzyme reactor design under thermal inactivation. Critical Reviews in Biotechnology 23:61-93, 2003 .

VII Curso Latinoamericano de Biotecnología
XXXVIII Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica

FUNDAMENTOS DE BIOCATALISIS ENZIMATICA

Andrés Illanes

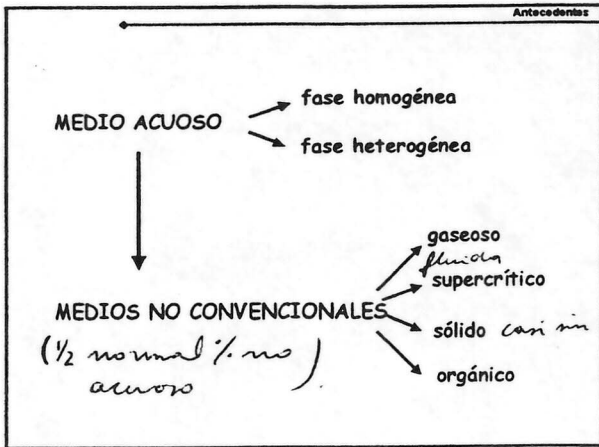
octubre 2003

1. Antecedentes
2. Principios de diseño de bioreactores enzimáticos
3. Efectos de restricciones difusionales
4. Efectos de inactivación
5. Análisis integrado de efectos difusionales y de inactivación

Antecedentes

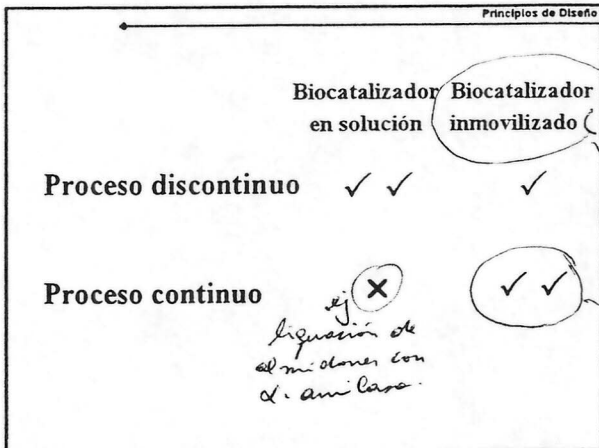
// CATALIZADORES // BIOCATALIZADORES

- ▲ alta especificidad
- ▲ alta actividad en condiciones moderadas
- ▲ alto número de rotación
- ▲ biodegradabilidad
- ▲ producto "natural"
- ▲ complejidad molecular
- ▲ alto costo de producción
- ▲ labilidad



Para lo anterior ~~entre~~ entre las condiciones a veces se debe Δ el $1/2$

avanzado en ing. enzimática

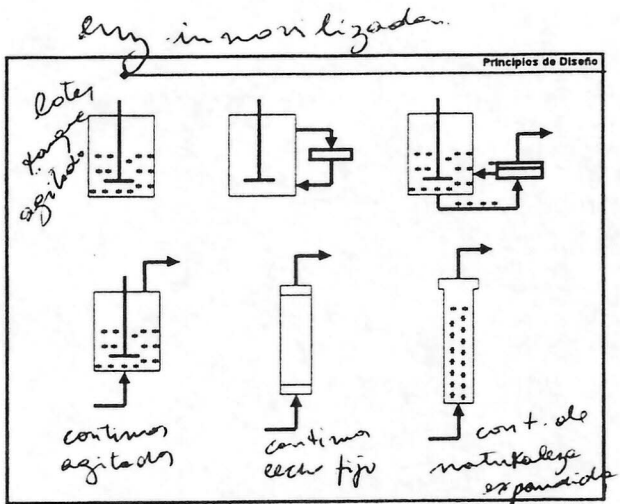


uso de enz. en biorreactores

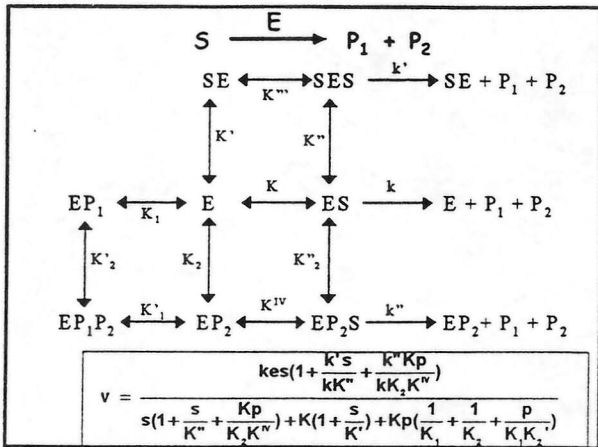
(o inmovilizado)

condición de catálisis heterogénea enz. debe estar con esta condición aumentada

ya que el catalizador se retiene y el sustrato pasa y sale



$$\frac{1}{\infty} = 0$$



parámetros en condiciones iniciales (v_0) ya que no existen variables como inhibición, etc.

esquema que representa casi todas las posibles cinéticas de reacción
necesitamos parametrizar todos K, k .

expresión generalizada

K etc de eq. o pseudoequilibrio definidos como disociación.

Principios de Diseño

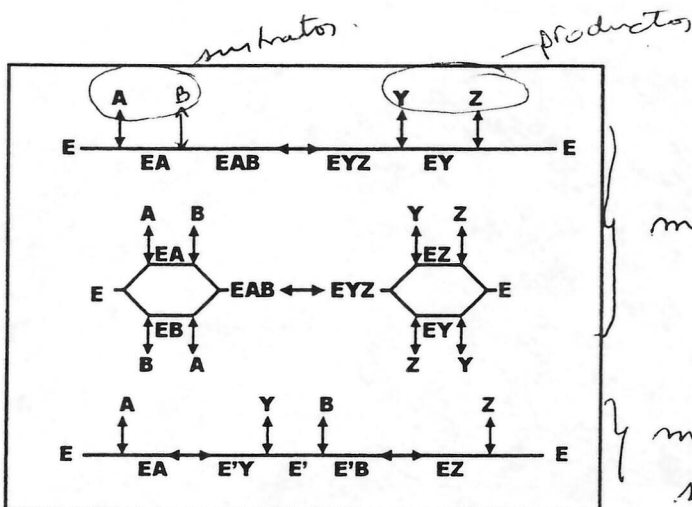
$$X = \frac{s_i - s}{s_i} - \frac{P}{s_i} \quad v = \frac{k e (1 - X)}{a + bX + cX^2}$$

$$a = 1 + \frac{K}{s_i} + \frac{K}{K'} + \frac{s_i}{K''}$$

$$b = K \left(\frac{1}{K_1} + \frac{1}{K'} + \frac{1}{K''} \right) + s_i \left(\frac{1}{K_2} + \frac{2}{K''} \right) - 1$$

$$c = s_i \left(\frac{1}{K''} + \frac{1}{K_2} + \frac{K}{K_1 K_2} \right)$$

X = grado de conversión.



mecanismos secuenciales.

mez. oscilatorios o pingpong se generan P antes que todos

los S se hayan unido a enzima E oscila entre estructura E y E' $\Rightarrow$ competencias catalíticas.

Reactor por Lotes



Mecanismo Secuencial Ordenado (A limitante) *ej.*

$$v = \frac{\frac{k \cdot e \cdot b}{K_s + b} \cdot a}{\frac{K_s \cdot K_s}{K_s + b} + a} = \frac{k \cdot e \cdot b \cdot a}{K_s \cdot K_s + a(K_s + b)} = \frac{k \cdot e \cdot (b_1 - a_1 X) \cdot a_1 (1 - X)}{K_s \cdot K_s + a_1 (1 - X)(K_s + b_1 - a_1 X)}$$

$$a = a_1(1 - X) \quad b = b_1 - a_1 X$$

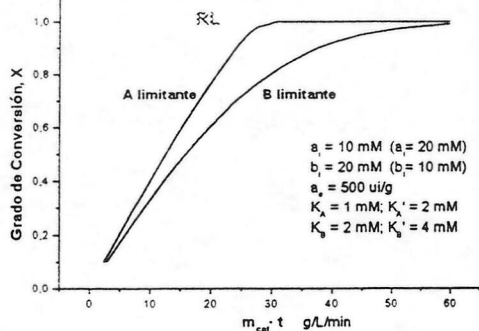
$\int \frac{dX}{v(X)} = \frac{t}{a_1}$ *cinética siempre referida al limitante.*

$$\frac{K_s K_s}{\sqrt{D}} \ln \left| \frac{2a_1^2 X - a_1(a_1 + b_1) - \sqrt{D}}{2a_1^2 X - a_1(a_1 + b_1) + \sqrt{D}} \right| - \frac{a_1(a_1 + b_1) + \sqrt{D}}{-a_1(a_1 + b_1) - \sqrt{D}} \cdot \frac{K_s}{a_1} \ln \left| \frac{b_1 - a_1 X}{b_1} \right| + X = \frac{k \cdot e}{a_1} t = \frac{m_{\text{cat}} \cdot a_1}{a_1}$$

$$D = (a_1^2 + a_1 b_1)^2 - 4 a_1^2 b_1$$

Principios de Diseño

Mecanismo Secuencial Ordenado $A + B \rightarrow \text{Productos}$



(A se usa primero -
B - " después)

Principios de Diseño

Reactores Continuos

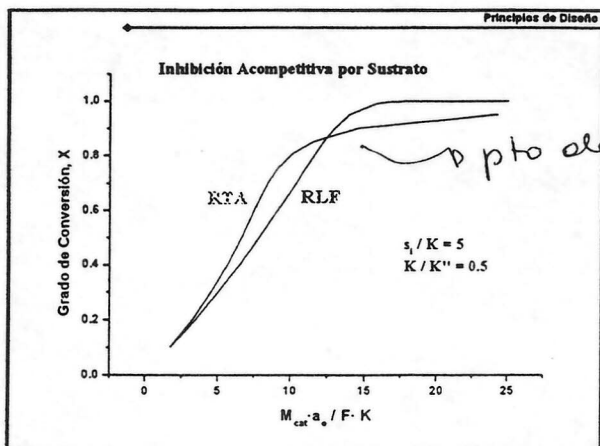
Lecho Fijo

Tanque Agitado



+ lecho de enzimas inmovilizado

Fig. 1



pto de inversión en cual reactor es mejor

Principios de Diseño

Lecho Fijo

Reactores Continuos

Tanque Agitado

A + B → Productos

Principios de Diseño

Reactor Continuo Lecho Fijo

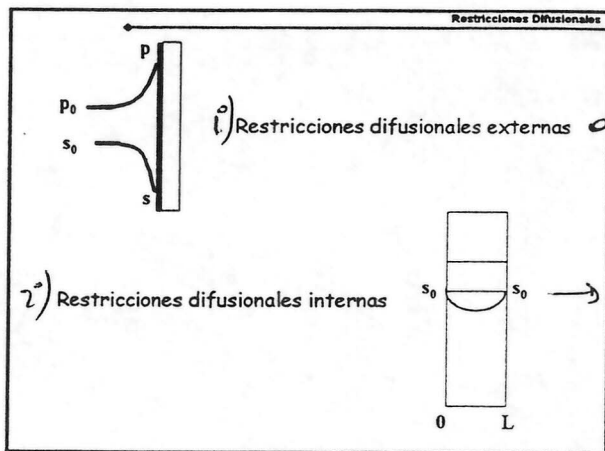
Mecanismo Secuencial Ordenado (A limitante)

$$v = \frac{k_1 a - b}{K + b + a} = \frac{k_1 a - b - a}{K + a + a(K + b)} = \frac{k_1 a - b - a(1 - X)}{K + a + a(1 - X)(K + b - aX)}$$

$$\int \frac{dX}{v(X)} = \frac{\tau}{a_1}$$

$$\frac{K + b}{a_1} \ln \left| \frac{2a_1 X - a(a + b) - \sqrt{D}}{2a_1 X - a(a + b) + \sqrt{D}} \right| - \frac{\sqrt{D}}{a_1} \ln \left| \frac{b - aX}{b} \right| + X = \frac{k_1 - b}{a_1} \tau = \frac{k_1 - b}{a_1} \frac{M_{cat} \cdot a_s}{F \cdot K}$$

inmovilización de enzimas: estabilidad extraordinaria.



1) Restricciones difusionales externas absorbida la enz. en la sup.

2) Restricciones difusionales internas absorbida en la matriz (x y gel).

1º caso la enz. x mecánica de fluido detecta S de sustrato y

no S0

en 2º caso difusión menor x coeficiente de transporte $\Rightarrow$ enz. sense menos S0.

β_0 : que pasa en la superficie entre cat y S. ($\propto [S]$ medible).

α = n° de Van Keler. α grande (> 1)

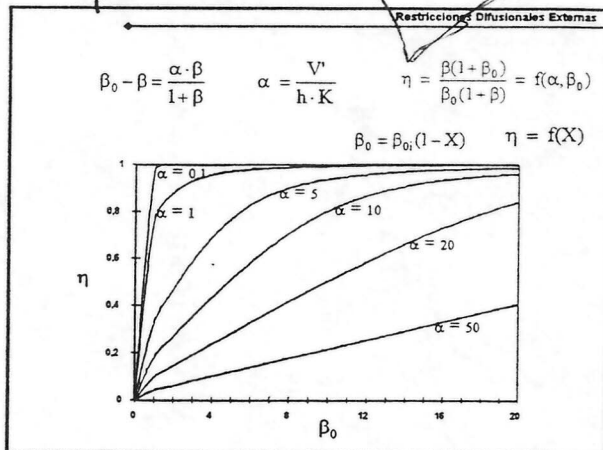
$\Rightarrow$ cap. catalítica de la enz. es

excesiva para el mt. que le llega

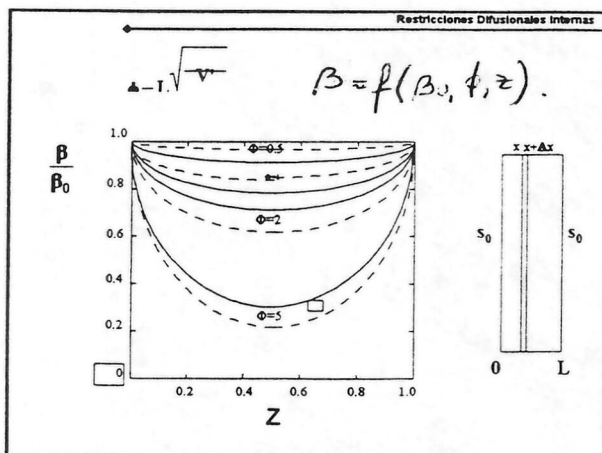
$\Rightarrow$ limita el sustrato.

α pequeño $\Rightarrow$ limita el producto

factor de efectividad (sin restricciones $\eta = 1$ con $\eta < 1$)



$a > \alpha < m$



Modelo depende de la geometría.

ϕ no modulo de ticle similar

a d.

ϕ muy grande practica % no llega S a enz.

en el caso (2) difusión interna.

además, según ubicación de cada partícula enz. en matriz

1º calcular el perfil de sustrato a medida q. pasa x la matriz.

2º factores de efectividad particulares según ubicación

3º necesito factor de efect. promedio para determinar capacidad global.

enz. inmovilizada es menos susceptible a los fact. de inhibición.

Inactivación Enzimática

Mecanismos de Inactivación

$$-\frac{de}{dt} = k_D \cdot e$$

$$\frac{e}{e_0} = \exp(-k_D \cdot t)$$

$$E \xrightarrow{k_D} E^*$$

x el momento hemos descrito a tiempos cortos (en que todavía no hay inactivación).

k_D : de v. de reacción de transición desde E activa a E^* inactiva.

k_D : depende T° , pH, moduladores (S, P). $\Rightarrow$ estabilidad de la enz.

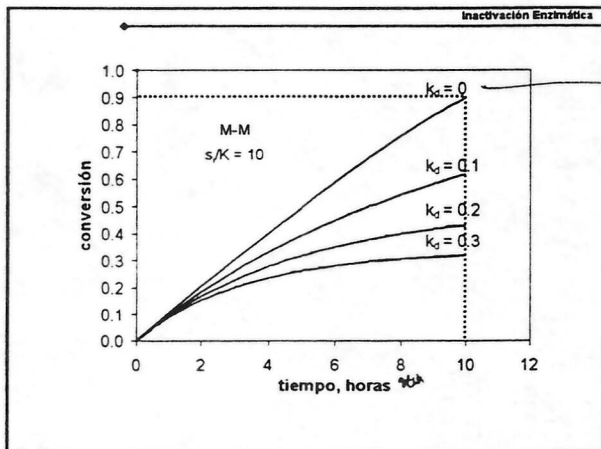
Inactivación Enzimática

Reactor por Lotes

$$v(e, X) = \frac{k e (1 - X)}{a + bX + cX^2} = s_1 \frac{dX}{dt}$$

$$\int_0^X \frac{a + bX + cX^2}{1 - X} dX = \int_0^t \frac{k \cdot e_0 \exp(-k_D \cdot t)}{s_1} dt$$

$$\frac{s_1}{K} [(a + b + c) \cdot \ln(1 - X) - (b + c) \cdot X - 0.5 \cdot cX^2] = \frac{k \cdot e_0 [1 - \exp(-k_D \cdot t)]}{K \cdot k_D}$$



$\rightarrow$ asumir sin activación

Reactor por Lotes

M-M

$$v(X, t) = \frac{k \cdot e(t) \cdot \beta_{0,1}(1-X)}{1 + \beta_{0,1}(1-X)}$$

$$\frac{dX}{\eta(X, t) \cdot v(X, t)} = \frac{dt}{K - \beta_{0,1}} \quad \left\{ \begin{array}{l} \eta(X, t) = \frac{[1 + \beta_{0,1}(1-X)] \cdot [1 + \alpha(t) + \beta_{0,1}(1-X) - \sqrt{Q}]}{2\alpha(t)\beta_{0,1}(1-X)} \\ \alpha(t) = \frac{k \cdot e(t)}{h - K} \end{array} \right.$$

fenómenos que varían con el tpo.

$$\left. \begin{array}{l} \frac{dX}{dt} = \eta(X, t) \frac{k \cdot e(t) \cdot (1-X)}{K[1 + \beta_{0,1}(1-X)]} \\ -\frac{de(t)}{dt} = k_p \cdot t \end{array} \right\} X = f(t)$$

1 modelo: factores difusionales
inactivación enzimática.
depende del tpo.



Enzimas en reacciones de síntesis en fase gaseosa

Dr. Eduardo Bárzana García

Facultad de Química, UNAM

México D.F. 04510

ebg@servidor.unam.mx

La enzimología no acuosa inició formalmente en 1984 con la publicación del artículo "Enzyme catalysis in organic media at 100°C" en la revista Science y cuyo autor correspondiente fue el Dr. Alexander Klibanov en el MIT de los Estados Unidos. A partir de este trabajo seminal, en menos de 5 años el campo de investigación fue expandido de manera notable por grupos ubicados en laboratorios de todo el mundo, por lo que es hoy en día uno de los trabajos clásicos del siglo XX en el campo de la enzimología.

Otras dos líneas importantes derivadas del trabajo con enzimas en medio orgánico, también diseñadas y evaluadas por el grupo de Klibanov, fueron las reacciones en fase gaseosa y en fluidos condensables a condiciones supercríticas. En particular, se trabajó con la conversión de vapores de etanol en una corriente de aire para la producción de acetaldehído como agente de sabor en alimentos (Bárzana et al., 1987 y 1989a). Lo novedoso del sistema consistía en la ausencia completa de un medio líquido lo que facilitaba la recuperación de los productos por simple condensación. Otra aplicación interesante consistió en adaptar las condiciones para la construcción de dispositivos biosensores y además desechables que permitían conocer con bastante precisión la concentración de etanol en el aliento humano o de formaldehído en ambientes cerrados (Bárzana et al., 1989b y Bárzana 1995).

Nuestro grupo en la UNAM ha también trabajado en la extracción y modificación enzimática de colorantes tipo carotenoides en CO₂ a condiciones supercríticas. En particular hemos logrado llevar a cabo reacciones de hidrólisis de diésteres conformados por ácidos grasos de cadena larga. Interesantemente el desempeño de las lipasas empleadas para este propósito se ve maximizado al trabajar a actividades acuosas bajas. Al momento también estamos estudiando la maceración enzimática de tejidos vegetales para incrementar la extracción de colorantes y compuestos bioactivos diversos. Asimismo, hemos desarrollado sistemas para el estudio de sistemas de reacción en fase orgánica con enzimas hipertermofílicas a temperaturas de 90°C o superiores.

Bibliografía:

- Bárzana, E. (1995). "Gas phase biosensors". *Advances in Biochem. Eng. and Biotechnol.*, 53:1-15.
- Barzana, E., Klibanov, A.M., y Karel, M. (1987) Enzyme-Catalyzed Gas Phase Reactions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 15: 25-34.
- Barzana, E., Karel, M., and Klibanov, A.M. (1989a). Enzymatic oxidation of ethanol in the gaseous phase. *Biotechnology and Bioengineering*. 34: 1178-1185.
- Barzana, E., Klibanov, A.M., and Karel, M. (1989b). A colorimetric method for the enzymatic analysis of gases: the determination of ethanol and formaldehyde vapors using solid alcohol oxidase. *Analytical Biochemistry*. 182: 109-115.
- Pulvin, S., Legoy, M.D., Lortie, R., Pensa, M. Y Thomas, D. 1986. "Enzyme technology and gas phase catalysis: alcohol dehydrogenase example". *Biotechnol. Lett.* 8(11):783-784.
- Randolph, T.W., Clark, D.S., Blanch, H.W. y Prausnitz, J.M. 1985. "Enzymatic catalysis in a supercritical fluid". *Biotechnol. Lett.* 7:325-328.
- Randolph, T.W., Clark, D.S., Blanch, H.W. y Prausnitz, J.M. 1988. "Enzymatic oxidation of cholesterol aggregates in supercritical carbon dioxide". *Science*. 238:387-390.
- Russell, A.J. y Yang, F.X. 1996. "Catalyze gas-phase reactions with enzymes". *CHEMTEC*. October:24-27.
- Sheldon R.A., 1996. "Large-scale enzymatic conversions in non-aqueous media". Capítulo 10, en *Enzymatic Reactions in Organic Media*. A.M.P Koskinen y A.M. Klibanov, Ed. Blackie, Glasgow.]
- Zaks, A. y A.M. Klibanov. 1984. "Enzymatic catalysis in organic media at 100°C". *Science*, 224:1249-1251.
- Zaks, A. y A.M. Klibanov. 1985. "Enzymatic-catalyzed processes in organic solvents". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3192-3196.

VII Curso Latinoamericano de Biotecnología

XXXVIII Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica

Enzimas en reacciones de síntesis en fase gaseosa

Dr. Eduardo Bárzana García
Facultad de Química, UNAM
Valparaíso, Chile
Octubre 2003

Avances Fundamentales

1857 Pepsina / ayuda digestiva

1910 *Chillproof* de cerveza

1950 Producción en cultivo sumergido

1970 Reuso por inmovilización

1975 HFCS

➔ 1960 Animales y Vegetales >> Microbianas

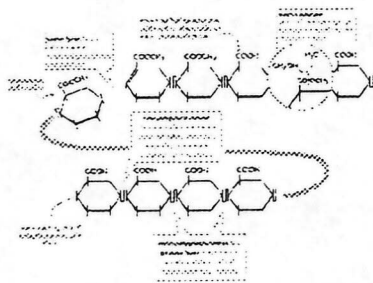
1985 ➔ Microbianas >> Otras

1990 ➔ Enzimas de origen animal y vegetal
producidas en microorganismos

Papaina en ind. de la cerveza

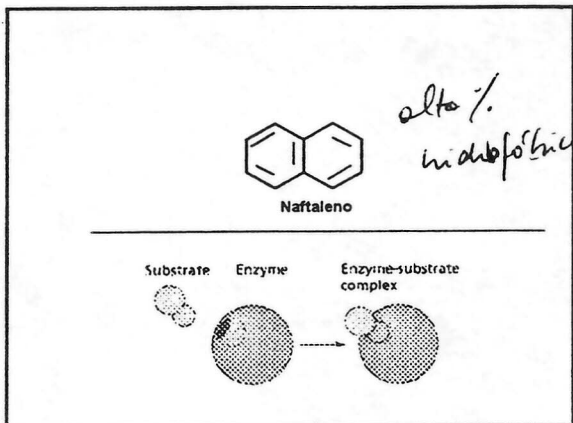
HFCS High Fructose Corn Syrup

Ing. genética



The action of four of the major enzymes found in pectinase preparations.

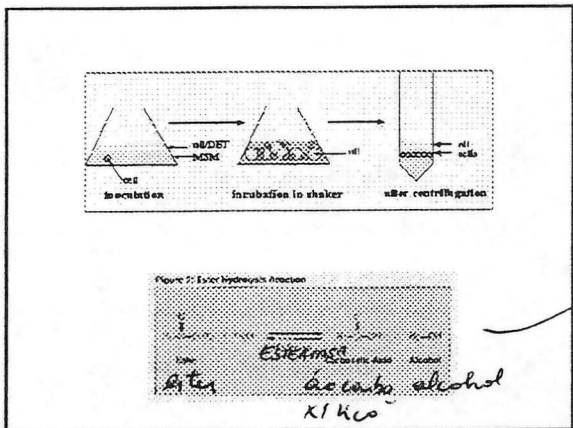
Reacciones sencillas de hidrólisis



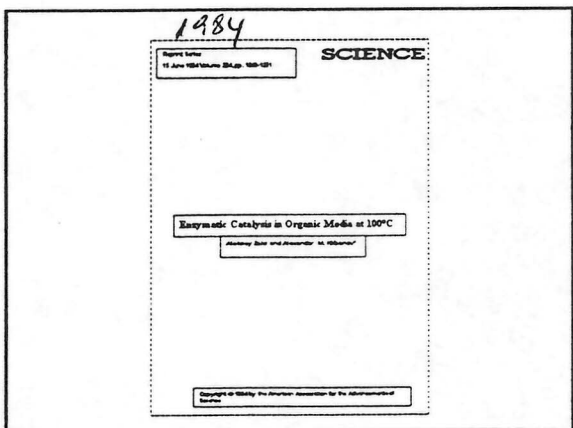
alta %
hidrofóbica =>

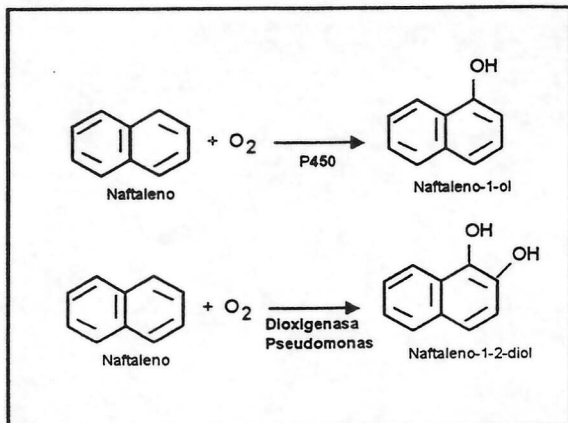
enz. pueden actuar en orgánicos
+ acuosa.

Por lo que % es difícil llevar el
 sustrato al sitio enzimático.
 (fase orgánica: enz. no podía
 actuar). aparición la teoría de
 2 fases (org por sustrato / acuosa
 por enz.) => co-solventes / surfactantes.
 (como ocurre en el hígado).
 con grasas



hidrólisis reversible (x elimina-
 ción de agua) pero con enz. muy
 lentos.





Avances Fundamentales

- 1985 Enzimas en solventes orgánicos
- 1990's Ingeniería molecular de proteínas
- a) Clonación transgénica
 - b) Mejora de propiedades
 - c) Extremófilos
- 2000 ? Impacto en mercados de:
- Alimentos
 - Químicos
 - Salud
 - Medio Ambiente

colores sint. de bajo humedad

(y controlados) ? - Gases.

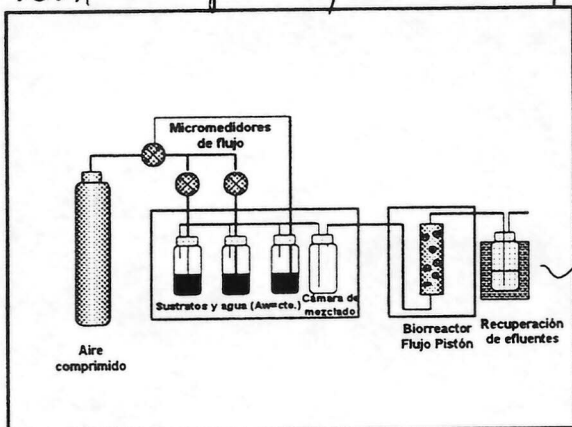
- Vapores en cond.
superficiales.

reacc. en fase gaseosa

Acetaldehído
 Etanol + O_2 $\rightarrow$ Acetaldehído + H_2O_2

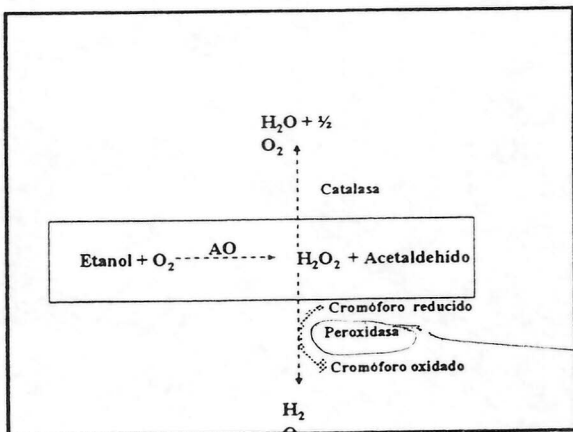
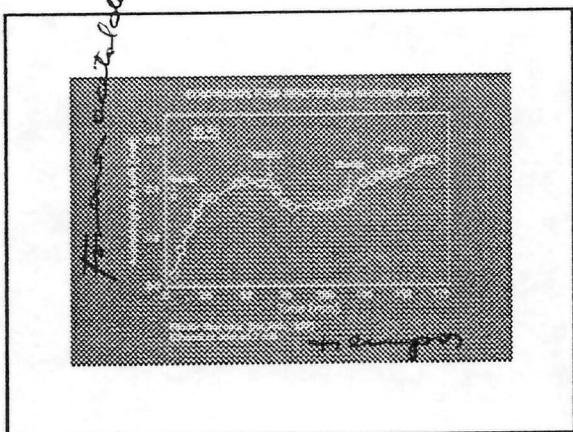
- agentes "refrescantes" x ej para jugos concentrados.
- Almacenaje y ripening de frutas (metabolismo).

Sistema pa' equilibrio de fases



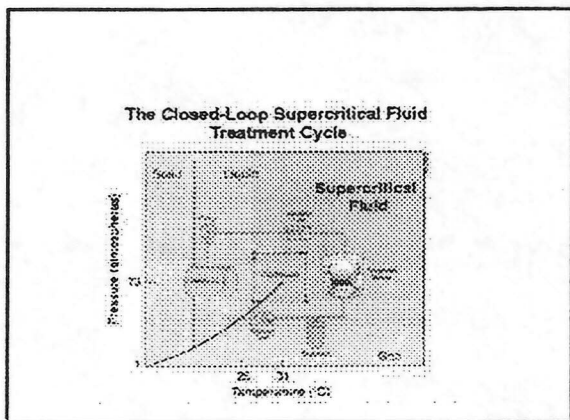
enz. inmovilizada.

trampa de enfriamiento
recupero S y P x condensación
fraccionada (con puros).



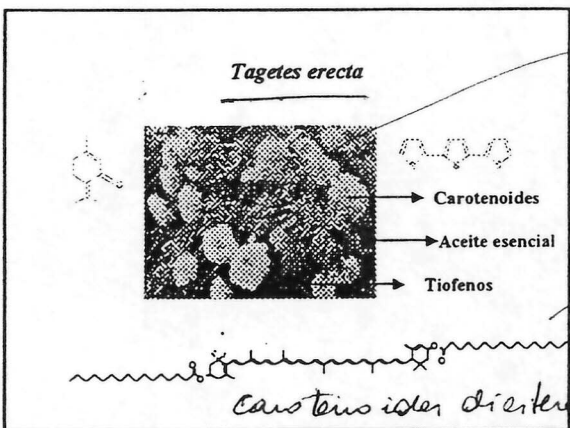
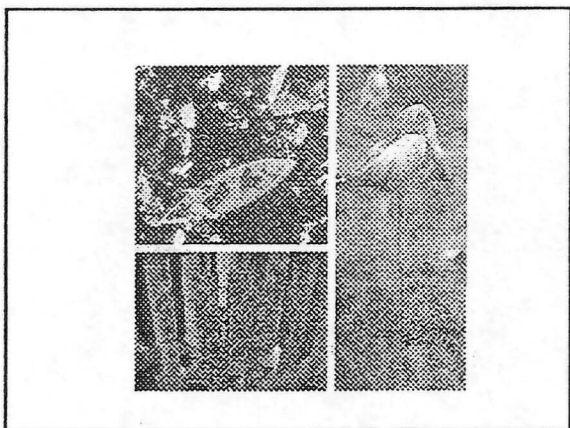
peróxido inh. la enzima
(x ser agente oxidante muy fte).
se resolvió coimmobilizando
x ~~catalasa~~ catalasa

para determinar el etanol
gas. (x ej. para alcohólic).



CO₂ recupera 5le

Interes area carotenos

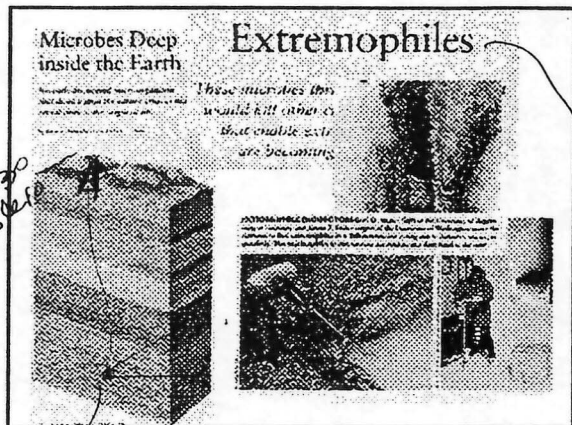


→ clavelón

→ solubilización en hexano

parte del

luteinos desesterificados se asimila mejor
⇒ hidrólisis con soro



profundidad

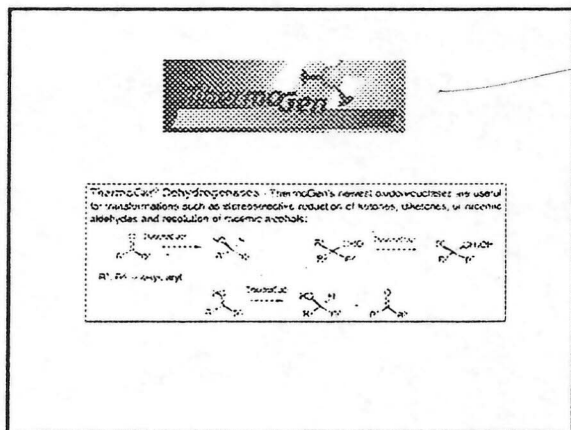
marino

presión no es denaturizante.

$T^{\circ} 100^{\circ}\text{C}$ o +.

profundidades marinas.
enz. hipertermofílica.

en geiser H_2O .



enz. termofílicas + sol. org.
o fluidos supercríticos.

de un espectro

importante.

CONCLUSIONES

1. La enzimología en medios no acuosos ampliará su aplicación práctica en el corto plazo.
2. La biología molecular permitirá expandir dichas aplicaciones.
3. La combinación de medios bajos en agua con nuevas enzimas hipertermofílicas es un área de alto interés en investigación biotecnológica.
4. Ante futuras restricciones ambientales es importante estudiar sistemas con CO_2SC en operaciones de extracción/reacción, y de conversiones con sustratos gaseosos para síntesis de aromas y control de emisiones a la atmósfera.

genes transferibles a *E. coli*.

CO_2SC : CO_2 supercrítico.



VII Curso Latinoamericano de Biotecnología
XXXVIII Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica
12 - 17 Octubre
Valparaíso - CHILE

BIOCATÁLISIS EN REACCIONES DE SÍNTESIS EN MEDIO ORGÁNICO

Andrés Illanes

Escuela de Ingeniería Bioquímica
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

Se presenta una visión actualizada sobre el uso y potencial de la biocatálisis enzimática en reacciones de síntesis. El tema es tratado en tres secciones:

En la primera se describe la transición de la biocatálisis enzimática desde procesos degradativos, principalmente hidrolíticos, de escaso valor agregado, hacia procesos de síntesis orgánica, que representan su mayor potencial actual. Se analiza las características de las enzimas y las condiciones requeridas para desarrollar procesos de síntesis. Se analiza también las dificultades para la adopción de esta tecnología por parte de la industria de síntesis química y los nichos de oportunidad para su uso.

En la segunda se aborda el uso de medios de reacción orgánicos, como aquellos especialmente adecuados para llevar a cabo reacciones de síntesis. Se describen y analizan los distintos sistemas de biocatálisis en medio orgánico (homogéneos, micro y macroheterogéneos, con biocatalizadores libres o soportados) y el comportamiento de las enzimas en dichos medios, particularmente en lo referido a su actividad y estabilidad.

En la tercera y última se aborda en particular el uso de enzimas hidrolíticas en procesos de síntesis orgánica, a través del sistema de análisis de casos. Se considerará como casos de estudio la síntesis de antibióticos β -lactámicos mediante la enzima penicilina acilasa en cosolventes orgánicos y la transesterificación selectiva de esteroides de madera mediante lipasas en medio anhidro. Los casos han sido seleccionados por su relevancia industrial y por la experiencia directa del expositor en dichos temas.

Bibliografía de apoyo

- Enzymatic Reactions in Organic Media. (Koskinen, A., Klibanov, A., eds). Blackie Academic & Professional. London, GB, 1996.
- Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. (Drauz, K., Waldman, H. eds.) Wiley-VCH. Weinheim, Germany, 2002
- Synthesis of β -lactam Antibiotics. (Bruggink, A. ed.). Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands, 2001.

Artículos de revistas: Enzyme & Microbial Technology; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; Biotechnology & Bioengineering; Process Biochemistry.

BIOCATÁLISIS EN REACCIONES DE SÍNTESIS EN MEDIO ORGÁNICO

Andrés Illanes

octubre 2003

1. Enzimas en Síntesis Orgánica

2. Enzimas en Medio Orgánico

3. Síntesis Orgánica con Hidrolasas en Medio Orgánico

- Síntesis de antibióticos β -lactámicos
- Transesterificación selectiva de esteroides de madera

Enzimas en Síntesis Orgánica

- Enzimas en solución en reacciones hidrolíticas
- Enzimas inmovilizadas en reacciones de hidrólisis e isomerización

Reacciones degradativas
(escaso valor agregado)

Síntesis Orgánica

- Enzimas con requerimientos de CoE
- Enzimas sin requerimientos de CoE

Reacciones de síntesis
(elevado valor agregado)

Hoy hay tecnologías que se
usan las enz. con CoE.

pero tb.

enz. pueden pararse
activas en sint x 1 de 1/2
de reacción.

Nichos de Oportunidad

- /// alta especificidad *x ej enantioespecificidad (xj talidomina) en d. farmac.*
- /// alta reactividad en condiciones moderadas
- /// origen natural
- /// compatibilidad ambiental

no a molecular eventos e % pura

1. Enzimas en Síntesis Orgánica

2. Enzimas en Medio Orgánico

3. Síntesis Orgánica con Hidrolasas en Medio Orgánico

- i. Síntesis de antibióticos β -lactámicos
- ii. Transesterificación selectiva de esteroides de madera

MEDIO ORGÁNICO

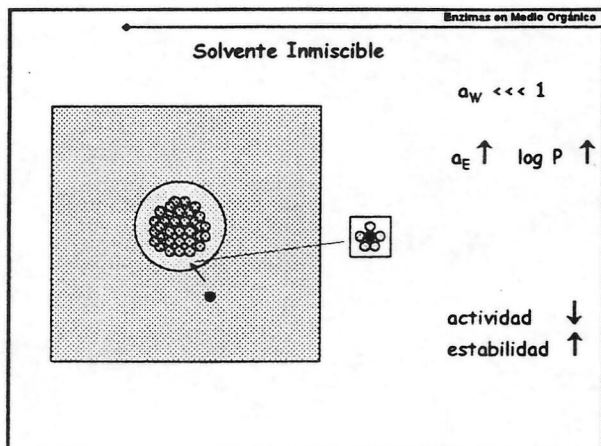
pur } Actividad ↓
Estabilidad ↑

INACTIVACION

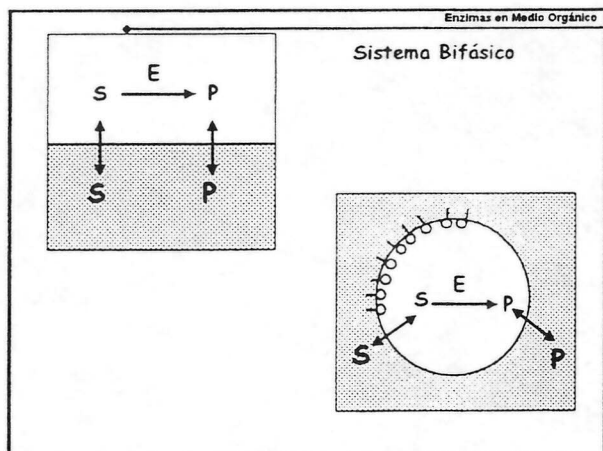
↓
AGUA

↙
reactante

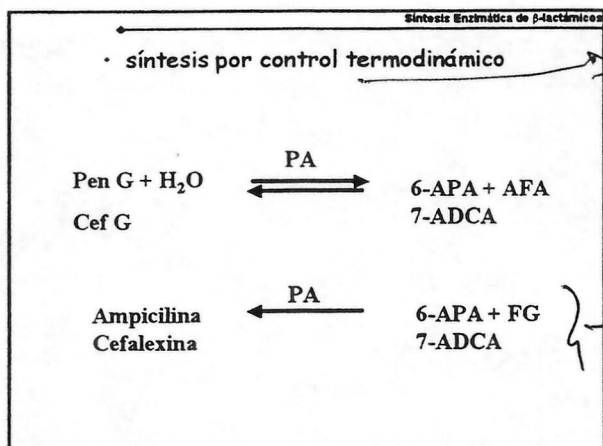
↘
lubricante



Solvente + hidrofóbico mejor
 Expresión actividad de la
 enzima.

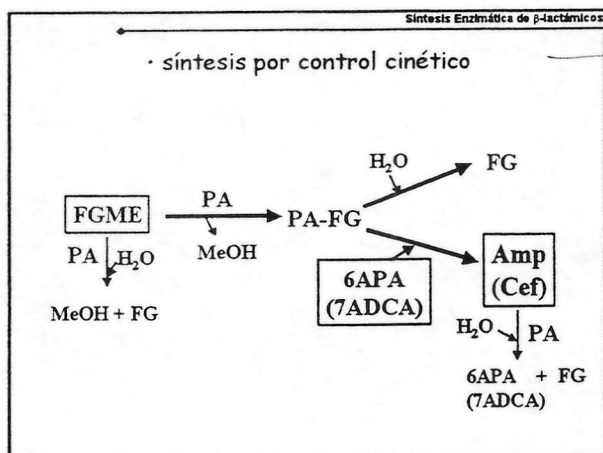


1. Enzimas en Síntesis Orgánica
2. Enzimas en Medio Orgánico
3. Síntesis Orgánica con Hidrolasas en Medio Orgánico
 - i. Síntesis de antibióticos β -lactámicos
 - ii. Transesterificación selectiva de esteroides de madera



manejo del eq. de reacción
[H₂O] muy importante.

→ x modif. de condiciones.
↓
son ~~modificados~~ restringidos.



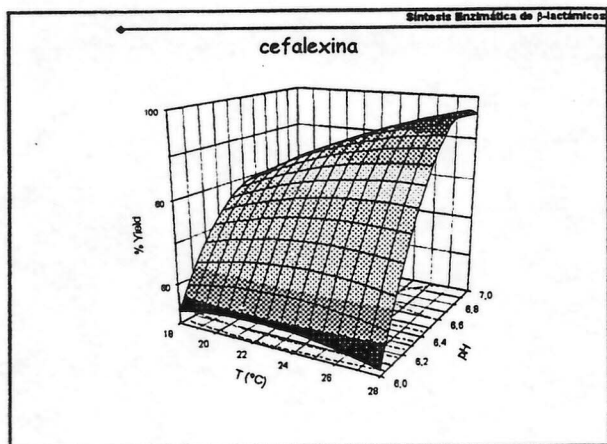
→ modalidad + práctica
destruye el eq. de reacción.

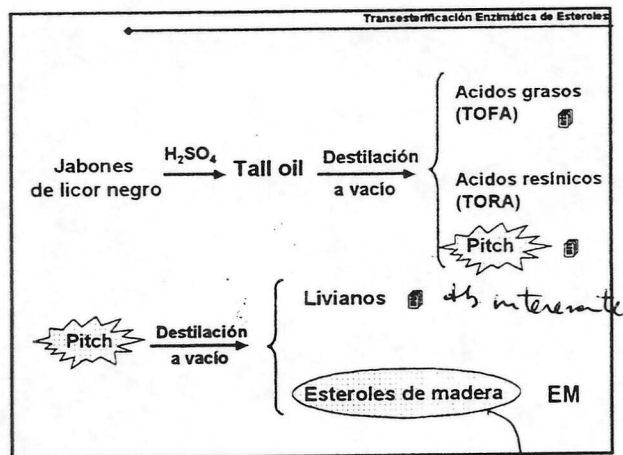
→ muchas reacciones de hidrólisis asociadas.

Síntesis Enzimática de β -lactámicos

Síntesis de Ampicilina y Cefalexina con PAI en Modalidad de Control Cinético

- ⚡ Selección de cosolventes
- ⚡ Optimización de síntesis
 - concentración cosolvente
 - temperatura
 - pH
 - razón FGME/ 6-APA
 - razón PAI/ 6-APA
- ⚡ rendimiento (mM Amp/mM 6-APA)
- ⚡ estabilidad operacional





lipasas actúan en ambientes
hidrofóbicos
enz. versátiles y específicas.

LIPASA enz. que hoy + se publica

mezcla de esteroides y estanoles.
cuando muchas aplicaciones.

Transesterificación Enzimática de Esteroides

Esterol	% en peso
β -sitosterol	75
β -sitostanol	15
Campesterol	7
Campestanol	2
Stigmasterol	< 1

CC(C)[C@H](CCCC(C)C)[C@H]1CC[C@@H]2[C@@]1(CC[C@H]3[C@H]2CC=C4[C@@]3(CC[C@@H](C4)O)C)C

β -sitosterol

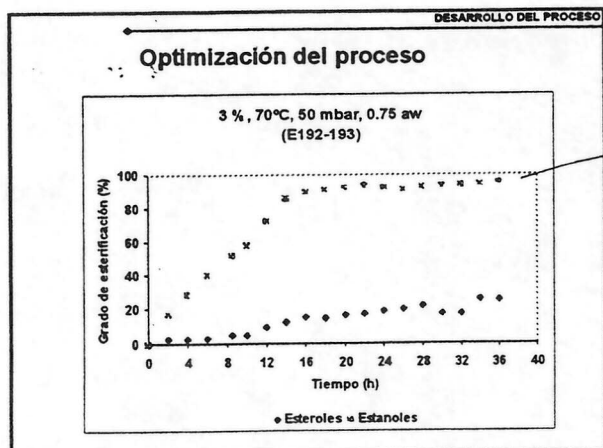
CC(C)[C@H](CCCC(C)C)[C@H]1CC[C@@H]2[C@@]1(CC[C@H]3[C@H]2CC=C4[C@@]3(CC[C@@H](C4)O)C)C

β -sitostanol

alto interés por IND. FARMAC.
drogas esteroidales.

principales componentes muy parecidos
difícil % separables.

industria farmacéutica como
anticolesterolizantes.
(incorporación en drogas)
(ej)



Producto c/99% de pureza.

(líquidos iónicos) suplen
de vapor) reemplazarían uso
de solventes tradicionales).

Fenómeno tecnológico reciente
cuyo impacto es prematuro evaluar

Oportunidades:

- // cuando se requiere alta especificidad
- // cuando Sy P son lábiles
- // cuando hay restricciones sanitarias o ambientales

Desafíos:

- // mayor reactividad, estabilidad y especificidad
- // optimización de medios de reacción
- // diseño de reactores
- // sintonía con desarrollo sustentable

INNOVACION EN LA APLICACIÓN INDUSTRIAL DE ENZIMAS

María Elvira Zúñiga Hansen
VII Curso Latinoamericano de Biotecnología

✓ MERCADO DE ENZIMAS INDUSTRIALES

✓ CASOS

ACEITE VEGETAL

CAFÉ SOLUBLE

PASTA DE TOMATES

→ USOS.

SUSTRATO → PRODUCTO
E

✓ ALTA EFICIENCIA

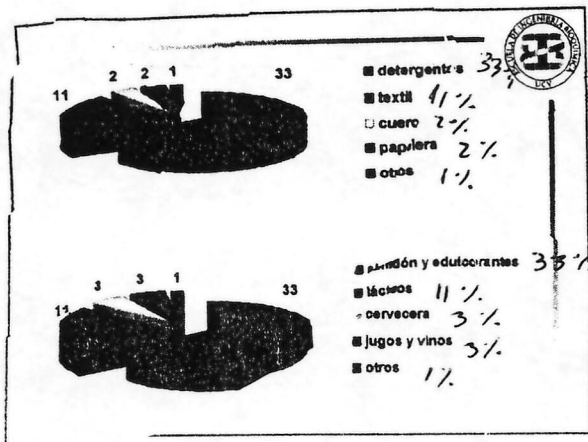
✓ ESPECÍFICAS

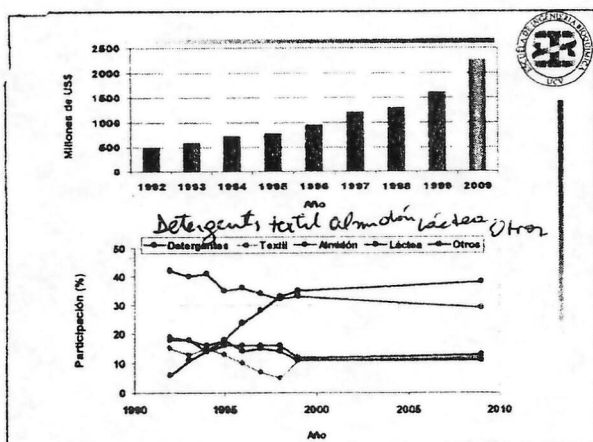
✓ CONDICIONES AMBIENTALES SUAVES

✓ BIODEGRADABLES Y NATURALES

✓ VENTAJAS REGULATORIAS

↓
APLICACIÓN EN INDUSTRIA DE PROCESOS





Otros: papel, alimentos animales.

ING. GENÉTICA + ING. PROTEÍNAS

- Reducción de costos de producción
- Productos más puros
- Productos más estables
- Eliminación de cofactores
- Mayor versatilidad de enzimas

+ imp.

importante mejora de enz. ya usadas



PAISES EN DESARROLLO...

IMPERIOSA NECESIDAD DE INNOVACION TECNOLÓGICA

POR QUE?

- ✓ SEGUNDA FASE EXPORTADORA
COMMODITIES → DIFERENCIADOS
- ✓ AUTONOMÍA
- ✓ DESARROLLO DE CLUSTERS

asoc. de empresas (máquinas de imprimir).



- ✓ PROTEASAS
- ✓ LIPASAS
- ✓ AMILASAS
- ✓ CELULASAS
- ✓ HEMICELULASAS....
- ✓ PECTINASAS
- ✓ PULULANASAS

- ✓ PEROXIDASAS
- ✓ OXIDASAS

- ✓ LIASAS

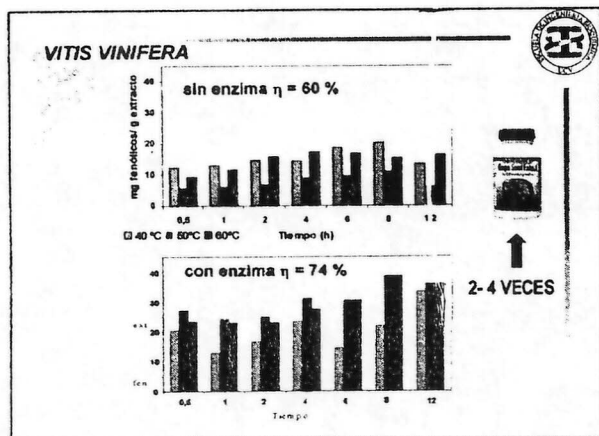
ENZIMAS INMOVILIZADAS

*Mayoría hidrolítica y extra
celulares.*

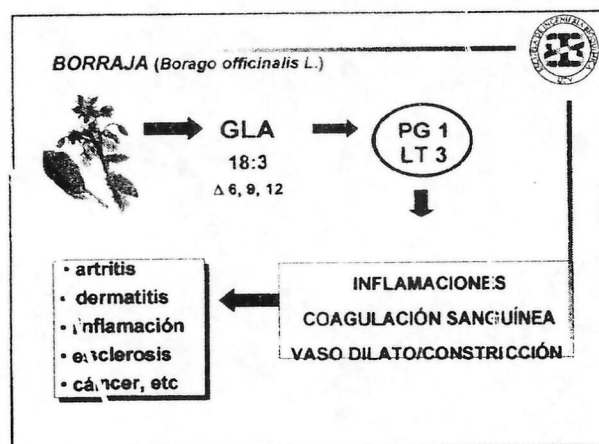


CASOS,

- ✓ ACEITE
- CAFÉ SOLUBLE
- PASTA DE TOMATES



pepa uva haina (antioxidante).

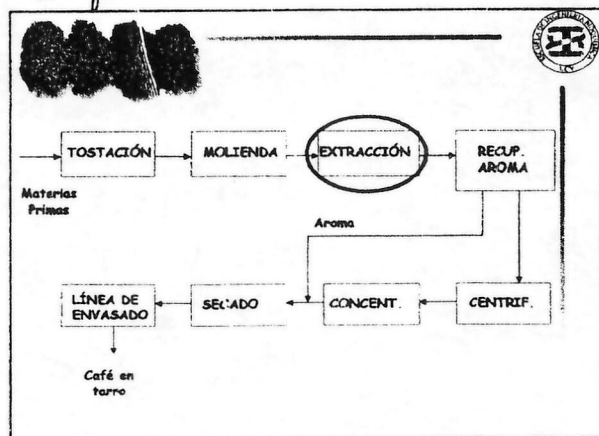


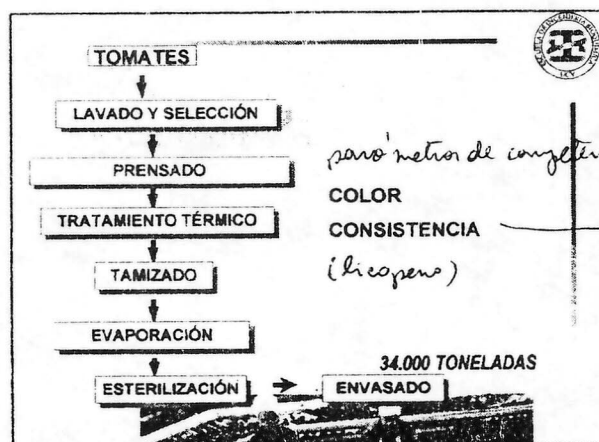
semilla 30% aceite de gamma -
linoleico. (Aceite)

• FUENTES

	Aceite (%)	LA (%)	GLA (%)	ALA (%)
<i>Oenothera spp</i>	21	68-75	8-15	0
<i>Borago officinalis</i>	30	35-40	18-25	0-1
<i>Ribes nigrum</i>	16	45-55	12-18	12-15
<i>Cannabis sativa</i>	31	50-60	1-3	15-25
<i>Mucor javanicus</i>	-	10	19	28

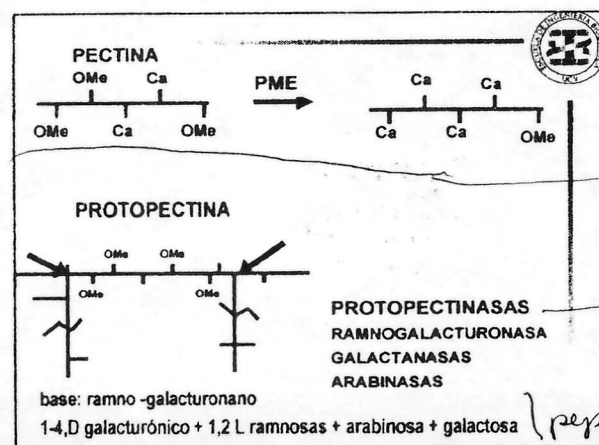
Café





parámetro de control
COLOR
CONSISTENCIA
(licopeno)

capacidad de gelificación (contenido de pectina)



PME: polimetil esterasa

pectina insoluble

pectina neutra que me pectina a membrana

Hidrólisis enzimática de Biopolímeros

Andrea Ruiz O'Reilly
EIB-PUCV

Biopolímeros

• Polímeros biodegradables generados de fuentes naturales renovables que pueden ser producidos por sistemas biológicos o sintetizados químicamente a partir de materiales de origen biológico.

• Son los compuestos orgánicos más abundantes en la biósfera y constituyen la mayor fracción de las células.

monómeros provenientes de
mat. biológicos

Biopolímeros

Carbohidratos { Almidón
Celulosa
Sustancias pécicas

Proteínas

Ácidos nucleicos

enz. hidrolíticas de biopol.
se diferencian x especificidad.
polímeros son hidrolizados
x un complejo enzimático.

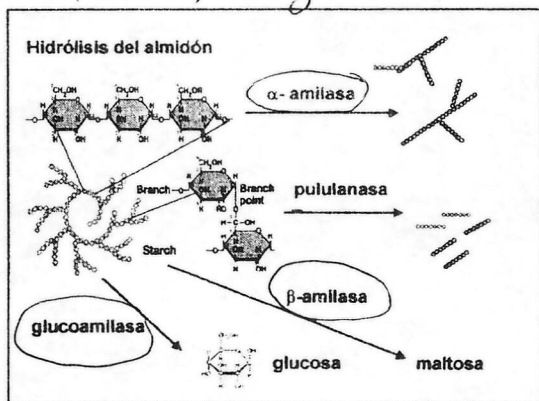
Composición almidones

	Maíz	Trigo	Arroz	Papa
Amilosa (% del almidón)	21-30	19-25	17-19	18-23
Amilopectina (% del almidón)	70-79	76-81	81-83	77-82
Lípidos (% de los sólidos)	0.4-0.8	0.8	0.8	0.1
Proteínas (% de los sólidos)	0.35	0.4-0.8	0.45	0.1
Cenizas (% de los sólidos)	0.1	0.5-0.3	0.5	0.2

componentes principales.

relación $\alpha/1,4$ } depende de comp.
 enlaces $< 1,6$ } de almidón y
 de amilopectina
 tenemos.

varias enzimas.



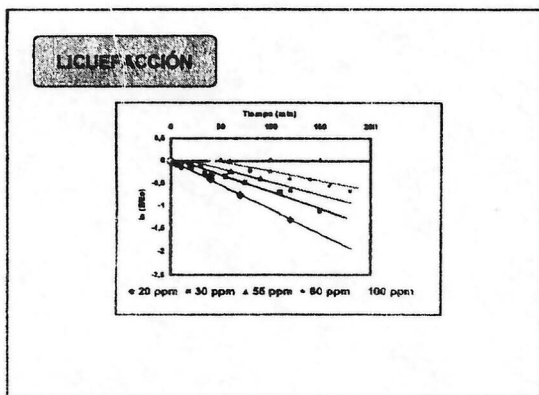
α -amilasa: reduce consistencia de la pasta

glucoamilasa: hidrólisis exo y produce glucosa

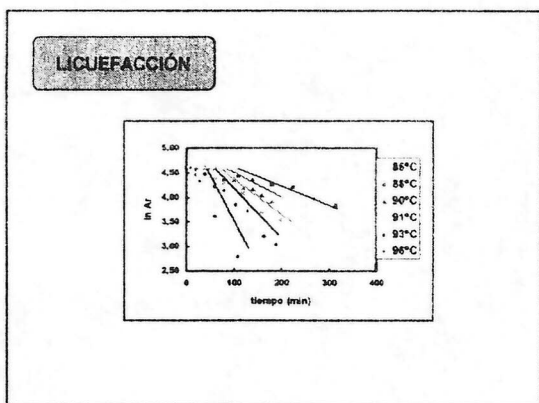
romper enlaces $\alpha-1,6$ pululanasa

Enzimas usadas en la hidrólisis del almidón

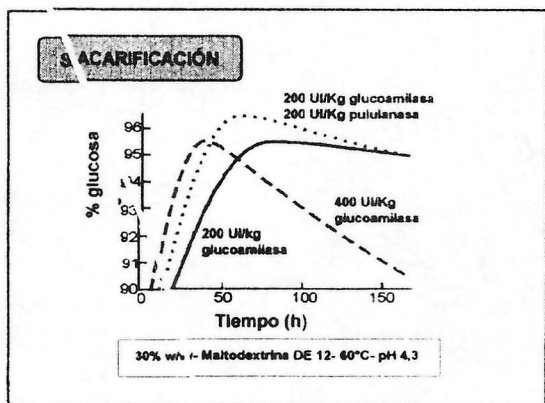
Enzima	Fuente	Enlace	Producto
α -amilasa	<i>B.amyloliquefaciens</i>	$\alpha-1,4$ (endo)	α -dextrinas G2, G3, G6 y G7
	<i>B.licheniformis</i>	$\alpha-1,4$ (endo)	α -dextrinas G3, G4 y G5
	<i>A.oryzae</i> , <i>A.niger</i>	$\alpha-1,4$ (endo)	α -dextrinas G2 y G3
β -amilasa	Cebada maltada	$\alpha-1,4$ (exo)	Dextrinas límites y β -maltosa
Glucoamilasa	<i>A.niger</i>	$\alpha-1,4$ y $\alpha-1,6$ (exo)	β -glucosa
Pululanasa	<i>B.acidophilus</i>	$\alpha-1,6$ (endo)	Dextrinas lineales



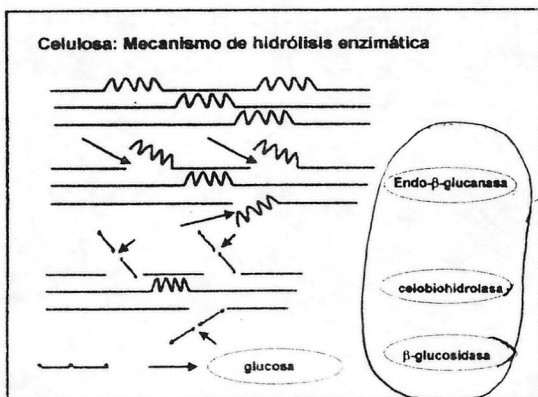
Inactivación térmica
variando $[Ca^{2+}]$



tpo de gracia: tpo entre
to y cuando comienza a
decaer N. media enzima.
← Efecto de T° ; a $>T^{\circ}$ efecto
similar a $\downarrow [Ca^{2+}]$



reacciones hidrolíticas
son reversibles y x
acumulación de ~~productos~~
productos se favorece la
inversa



gto de enz.
ocurre simultanea %

Sustancias pécticas

Polisacáridos ácidos complejos que se encuentran en diversas cantidades en los espacios intercelulares de los tejidos vegetales (lámina media) y en la pared celular primaria y que tienen funciones estructurales

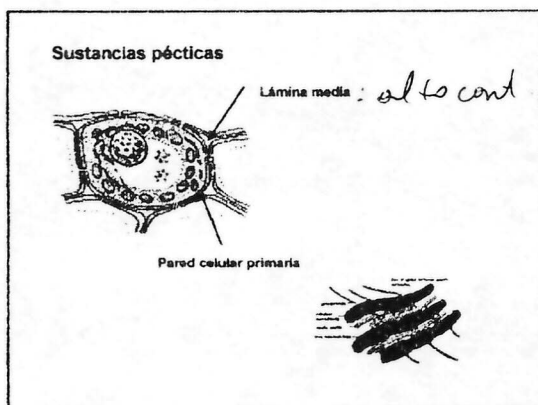
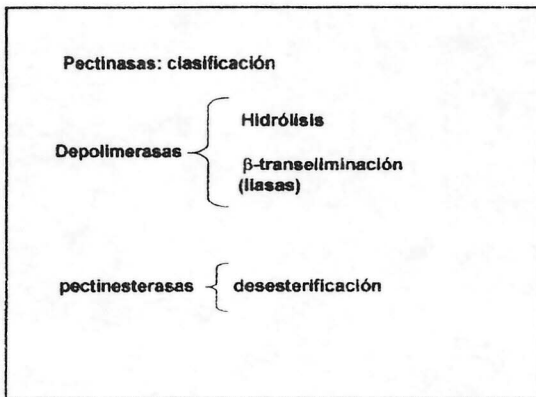
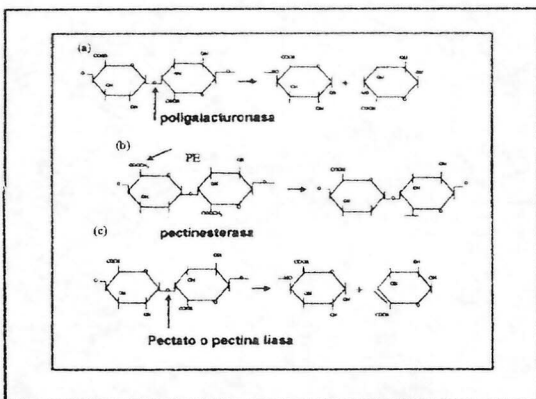


Lámina media : alto cont de sust pecticas



interés principal es llevar a cabo hidrólisis parciales para fines estructurales (y no para la obtención de monómeros)



enz. comerciales vienen mezclados estos

Propiedades de las depolimerasas

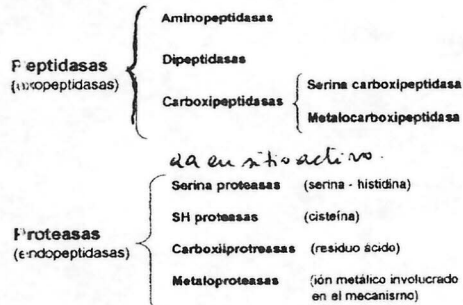
Nombre	Sustrato preferido	Modo de acción
Hidrolasas		
Endopoligalacturonasas	Pectato	random
Exopoligalacturonasa	Pectato	terminal
Liasas		
Endopectato liasa	Pectato	random
Exopectato liasa	Pectato	terminal
Endopectina liasa	Pectina	random

enz. comerciales (peptinasas) son
mezclas:

Proteasas

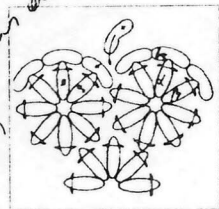
- 40% de las enzimas comerciales
- Proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* en detergentes 1^{er} uso
- Proteasa de *Mucor* en la fabricación de quesos 2^o uso.

Clasificación de las proteasas



producción de queso

Hidrólisis de la κ -caseína de la leche



	% Ptna total
Proteína total	100
Caseína total	79,6
Caseína α S1	30,6
Caseína α S2	6,9
Caseína β	28,4
κ -caseína	10,1
Ptnas suero	19,3

κ -caseína es la responsable
de las micelas.

Dr. Vitalis Moritz.

Inmovilización de células para la producción
de Metabolitos.

CÉLULAS INMOVILIZADAS

análogo a enz. inmovilizadas.

DEFINICIÓN

①

CÉLULAS INMOVILIZADAS SON CÉLULAS FÍSICAMENTE CONFINADAS O LOCALIZADAS EN UNA REGIÓN DEFINIDA DEL ESPACIO, CON RETENCIÓN DE SU ACTIVIDAD CATALÍTICA Y, SI ES POSIBLE O NECESARIO, DE SU VIABILIDAD, PUDIENDO SER USADAS EN FORMA REPETIDA O CONTINUA.

enz. inmovilizados tb. en las cels.
muertas.

(4)

Aplicación de células vegetales y animales

inmovilizadas (heterotrofo (sacarosa ©))

Soporte	Células	Producto
Espuma de poliuretano	<i>Capsicum frutescens</i>	Capsaicina
Alginato de calcio	<i>Digitalis lanata</i>	Digoxina
Alginato de calcio	<i>Catharantus roseus</i>	Alcaloides
Alginato-polilisina	Páncreas murino	Células
Alginato-polilisina	Hibridomas	Anticuerpos monoclonales
Membrana polimérica	Riñón porcino	Sensor de L-aminoac.
Poliacrilamida	Glándula posterior del gusano de seda	Proteína de seda
Alginato-poliivinilamina	Eritroleucemia de rato	Células
Alginato de calcio	Riñón de mono	Células

se inmoviliza
→ en gel de algi-
nato y se recubre
con polilisina.
Se eligen f. mole-
culas de su + q
salen y entran.

transferencia de masa es problema + grave.

5

Aplicación de células inmovilizadas en el tratamiento de residuos contaminantes

Soporte	Células	Substrato
Quitosa lignosulfonato	<i>Methilosinus</i> + Metanógenos aeróbios	Tetracloroetileno
Alginato de calcio	<i>Rhodococcus opacus</i>	Bifenilas policloradas
Gel de alcohol polivinílico	Lodos activos	Carbono + nitrógeno
Cerámica	<i>Rhodococcus</i> sp. B261	Ácido valérico gaseoso
Carbón activado	<i>Bacillus coagulans</i>	Piridina + tolueno + cloruro de metileno
Gel de alcohol polivinílico	<i>Alcaligenes xiloxidans</i>	Thiodiglicol.
Alginato de calcio	<i>Comamonas</i> sp JS46 + <i>Comamonas</i> sp JS47	Ácidos nitrobenzóicos (meta y para)
Vidrio sinterizado	<i>Burkholderia cepacia</i>	Tricloroetileno
Alginato de calcio	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fenol + clorofenoles

(6)

MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS (Hay +).

1. ADHESIÓN SUPERFICIAL

- **Por adsorción natural**
Soportes: virutas de madera, resinas de intercambio iónico, celulosa y sus derivados
- **A través enlaces químicos**
Uso de agentes quelantes; formación de enlaces cruzados

2. AUTOAGREGACIÓN

- **Natural**
Agregados celulares, miceliales.
- **Inducida**
Empleo de: polielectrolitos; agentes bifuncionales (enlaces cruzados) *di al delid*

3. CONFINAMIENTO EN UNA BARRERA

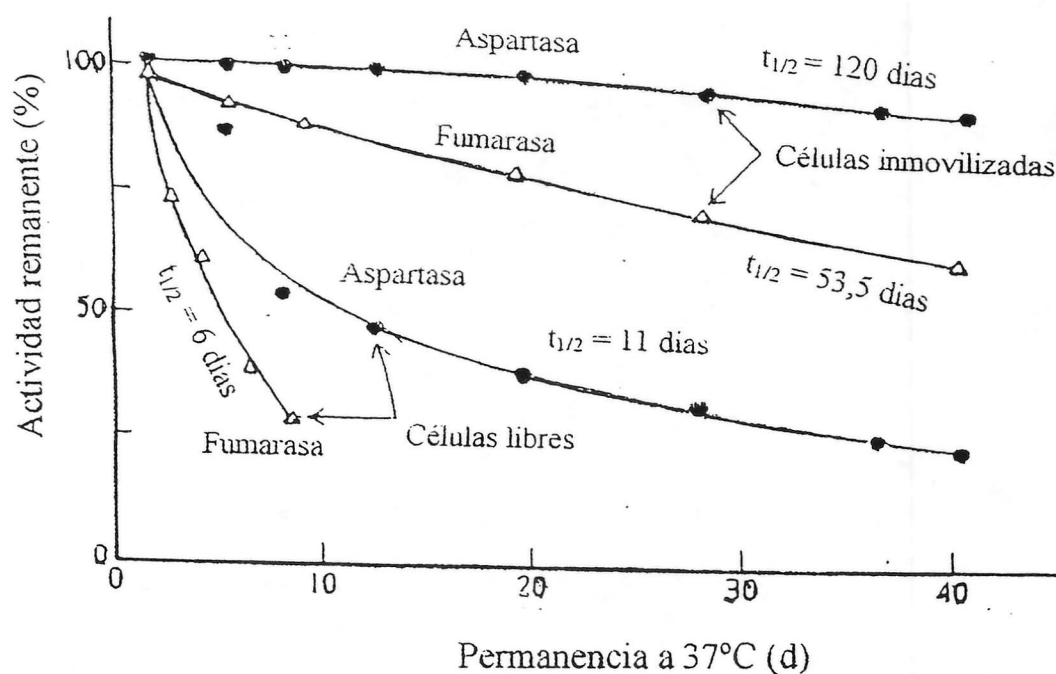
- **Barrera generada durante la inmovilización**
Microencapsulación; emulsificación
- **Barrera preformada**
Uso de membranas de microfiltración, ultrafiltración, diálisis (*o g reactores de fibre buca*).

4. ATRAPAMIENTO EN UNA MATRIZ POROSA + común.

- **Preformada**
Cordierita, cerámicas, vidrio poroso, rocas volcánicas, carbón activado
- **Formada in-situ**
Gel de poliacrilamida, de alginato de calcio, de κ -carragenina, de alcohol poli-vinílico (*criogel*).

CÉLULAS MICROBIANAS

ESTABILIDAD DE CÉLULAS INMOVILIZADAS



Comparación entre la desactivación de aspartasa de *Escherichia coli* y fumarasa de *Brevibacterium amoniagenes* en células de estas bacterias, libres y inmovilizadas

10

CÉLULAS INMOVILIZADAS

RESPUESTAS FISIOLÓGICAS A LA INMOVILIZACIÓN

Organismo	Substrato	Soporte	Respuestas metabólicas
<i>Escherichia coli</i>	Lactosa	Alginato Sr	> valores de μ y $q(s)$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa	Cerámica	> glicerol, > actividad EtOH-deshidrogenasa
<i>Candida stellata</i>	Glucosa+Fructosa	Alginato Ca	Dobla producción EtOH
<i>Tetrahimena thermophila</i>	N.R.	Alginato Ca	> contenido DNA en macronúcleo
<i>Cl. thermosaccharolyticum</i>	Almidón	Alginato Ca	> actividad y productividad amilasas
<i>Claviceps fusiformis</i>	Sacarosa	Alginato Ca	Ausencia producción glucana extracelular
<i>Bjerkandera adusta</i>	L-fenilalanina	Poluretano	Productividad benzaldehído 15X >
<i>Aspergillus niger</i>	Glucosa	Alginato Ca	Alteración en espectro pectinasas
<i>Tolypocladium inflatum</i>	Glucosa	Celite	Represión metabolismo secundario
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Glucosa	k-carragenina	> $Y(p/s)$, < subproductos

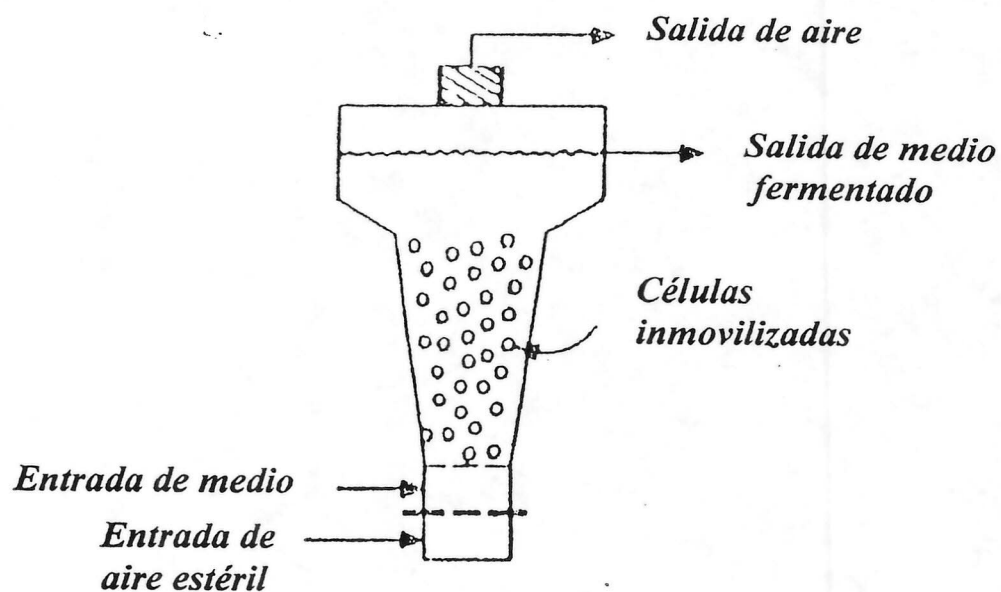
(12)

REACTORES CON CELULAS INMOVILIZADAS

- **REACTORES TUBULARES DE LECHO FIJO Y LECHO FLUIDIZADO**
- **REACTORES DE MEZCLA CON AGITACION MECANICA, DISCONTINUOS Y CONTINUOS**
- **REACTORES DE FIBRA HUECA**
- **OTROS TIPOS DE REACTORES**

13

BIORREACTOR DE LECHO FLUIDIZADO TRONCOCÓNICO



PRODUCTIVIDAD EN BIORREACTORES CON CÉLULAS INMOVILIZADAS

Productividad, $Pr = \frac{p}{Vt} \quad \left(\frac{\text{g de producto}}{\text{litro.hora}} \right)$

Donde

$p = \text{peso de producto, g}$

$V = \text{volumen, L}$

$t = \text{tiempo, h}$

$$(Pr)_T = \frac{p}{V_T t}$$

$$(Pr)_L = \frac{p}{V_L t}$$

$$(Pr)_B = \frac{p}{V_B t}$$

$V_L = \text{Volumen de líquido}$

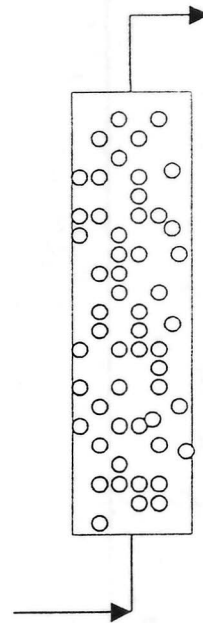
$V_B = \text{Volumen de biocatalisador}$

$V_T = \text{Volumen total}$

Porosidad del reactor: $\varepsilon = \frac{V_L}{V_T}$

$$V_T = V_L + V_B$$

$$1 = \frac{V_L}{V_T} + \frac{V_B}{V_T} \Rightarrow \frac{V_B}{V_T} = 1 - \varepsilon$$

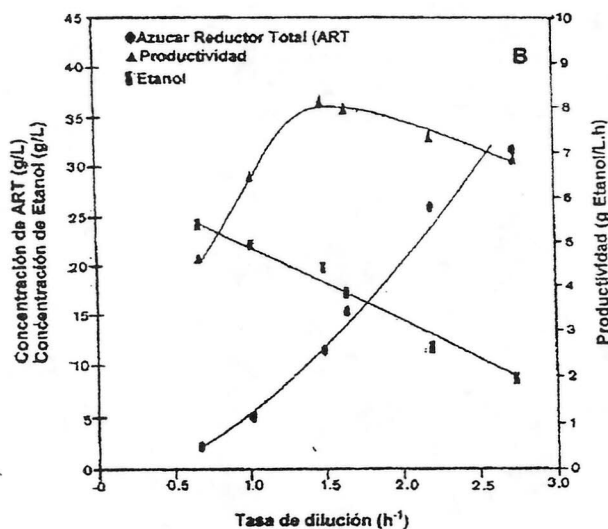


$$(Pr)_L = \frac{p}{V_L t} = \frac{p}{V_T \varepsilon t} = \frac{(Pr)_T}{\varepsilon}$$

$$(Pr)_B = \frac{p}{V_B t} = \frac{p}{V_T (1 - \varepsilon) t} = \frac{(Pr)_T}{1 - \varepsilon}$$

CÉLULAS MICROBIANAS

FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA CON LEVADURAS INMOVILIZADAS SOPORTE: POLIACRILAMIDA-HIDRAZIDA



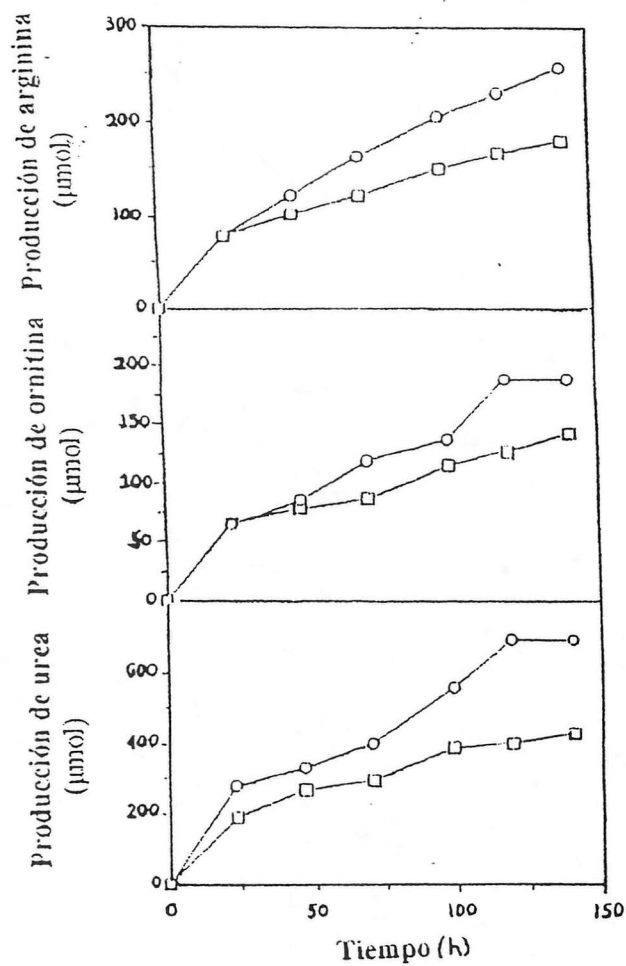
no se necesitan
lavados de cels.
perfiles similares a
fermentaciones continuas
con cel. libres.

Perfil de fermentación alcohólica continua en biorreactor de lecho fijo, flujo descendente, con células de *Saccharomyces cerevisiae*, inmovilizadas en poliacrilamida-hidrazida.

Adaptado de Lopes, J.R. – Fermentação alcoólica com células de leveduras imobilizadas em poliacrilamida. Tese de M. Sc., Escola de Química da UFRJ, Rio de Janeiro, 1987

CÉLULAS ANIMALES

HEPATOCITOS INMOVILIZADOS EN FIBRAS HUECAS (HÍGADO BIOARTIFICIAL)

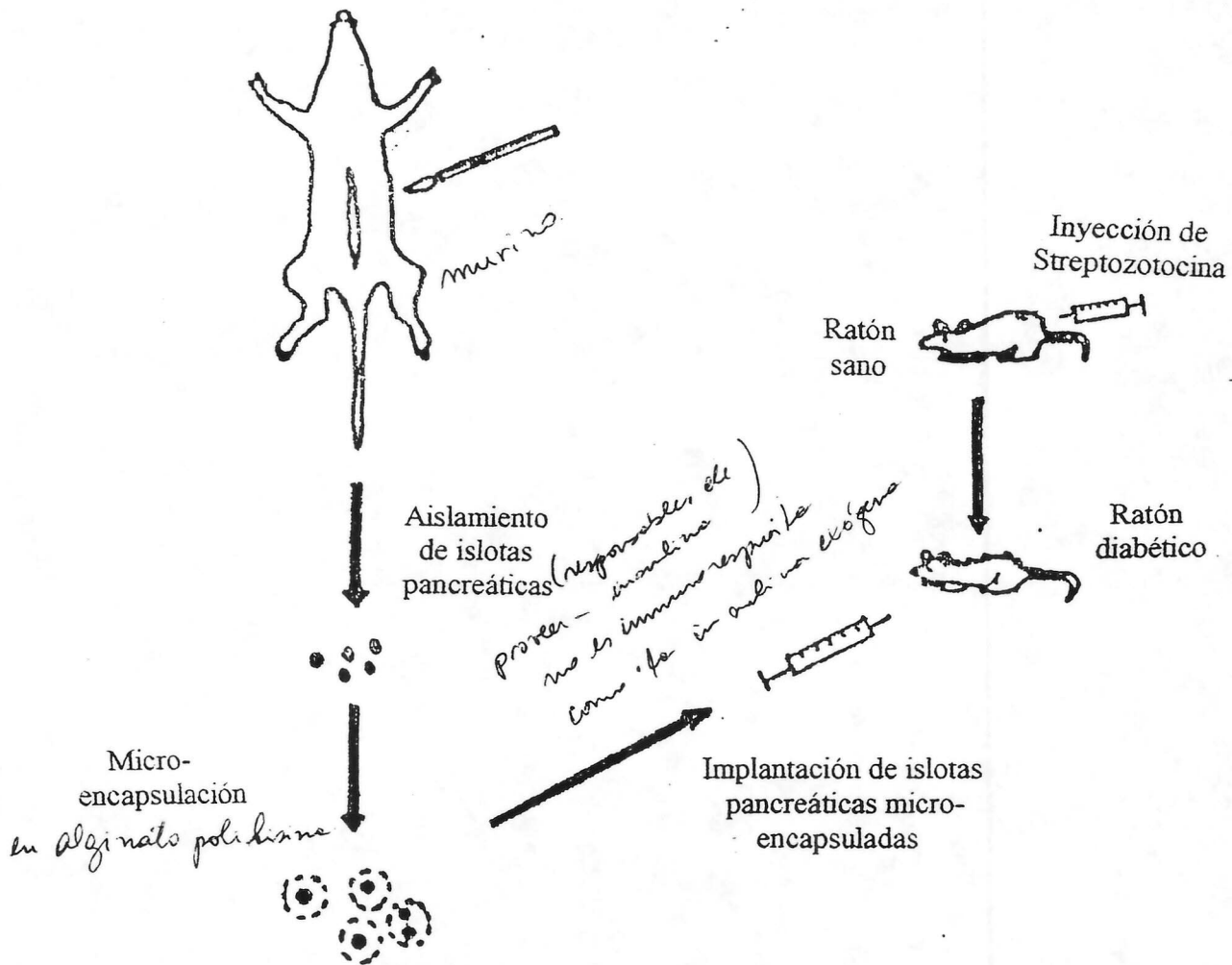


Metabolismo de arginina, ornitina y urea por hepatocitos inmovilizados en
biorreactor de fibras huecas
(Resultados de 2 experimentos distintos)

CÉLULAS ANIMALES

20

MICROENCAPSULACIÓN DE CÉLULAS PANCREÁTICAS



Adaptado de F. Lin, Microencapsulation of Living Mammalian Cells, in Advances in Biotechnological Processes, Vol. 7 - A. Mizrahi (Ed.), Alan R. Liss, New York, 1988

USO DE CÉLULAS INMOVILIZADAS DESVENTAJAS

- PROBLEMAS DE TRANSFERENCIA DE MASA
- COSTO DE DETERMINADOS SOPORTES
- ABRASIÓN DE ALGUNOS SOPORTES
- ROMPIMIENTO DE ALGUNOS SOPORTES POR EVOLUCIÓN DE GASES
- DIFICULTAD EN MONITOREAR EL CRECIMIENTO CELULAR
- PROBLEMAS CON SEPARACIÓN DE PRODUCTOS INTRACELULARES

BIBLIOGRAFIA - Inmovilización de células para la producción de metabolitos

- Blanch, H.W. and Clark, D.S. (1996)– *Biochemical Engineering*. p.113-116. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Chibata, I. Tosa, T. (1983). "Immobilized cells: Historical background". *Applied Biochemistry and Bioengineering*, Vol.4, p. 11-51. (Ed.) Chibata I, Wingard Jr. L. Academic Press, New York..
- Croughan, M.S. Chiou, T-W. Wang, DIC. (1994). "Immobilized animal cell bioreactors". *Bioreactor System Design*, p. 377-410. (Ed.) Asenjo, JA. and Merchuk, J. Marcel Dekker, Inc., New York.
- D'Souza, S.F. (2001). "Microbial Biosensors". *Biosensors and Bioelectronics*, **16**, 337.
- Freeman, A. and Lilly, M.D. (1998). "Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable cells". *Enzyme and Microbial Technology*, **23**, 335
- Fukuda, H. (1994). "Immobilized microorganism bioreactors". *Bioreactor System Design*, p. 339-335. (Ed.) Asenjo, JA. and Merchuk, J. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Junter, G-A. Coquet, L. Vilain, S. Jouenne, T. (2002). "Immobilized-cell physiology: current data and the potentialities of proteomics". *Enzyme and Microbial Technology*, **31**, 201.
- Karel, S.F., Libicki, S.B., Robertson, C.R. (1985). "The immobilization of whole cells: engineering principles". *Chemical Engineering*, **40**, 1321.
- Kennes, C. Thalasso, F. (1998). "Waste gas biotreatment technology". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **72**, 303.
- Lee, G.M. Varma, A. Pallson, B.O. (1991) "Production of monoclonal antibody using free-suspended and immobilized hybridoma cells". *Biotechnology and Bioengineering*, **38**, 821.
- Lim, F. (1988). "Microencapsulation of living mammalian cells". *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 7, p. 185-197. (Ed.) Mizrahi A. Alan R. Liss Inc., New York.
- Linko, P. Linko, Y.Y. (1983) – "Applications of immobilized microbial cells". *Applied Biochemistry and Bioengineering*, Vol 4, p. 53-150. (Ed.) Chibata I, Wingard Jr.,L. Academic Press, New York.
- Moritz, V. (2002). "Reactores con células Inmovilizadas". *Fundamentos de Ingeniería Bioquímica*, p. 199-216. (Ed.) Acevedo F., Gentina J.C., Illanes A. Edic. Universitarias de Valparaíso, Valparaíso.
- Park, J.K. Chang, H.N. (2000). "Microencapsulation of microbial cells". *Biotechnology Advances*, **18**, 303.
- Tharakan, J.P. Gallagher, S.L., Chau, P.C. (1988). "Hollow-Fiber Bioreactors for Mammalian Cell Culture". *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 7, p. 153-184. (Ed.) Mizrahi, A. Alan R. Liss Inc., New York.
- Wilson, P.D.G. Hilton, M.G. (1994). "Plant Cell Bioreactors". *Bioreactor System Design*, p. 413-439. (Ed.) Asenjo, JA. and Merchuk, J. Marcel Dekker, Inc., New York.



Bioseparaciones

Fundamentos de Bioseparaciones



Germán Aroca A.
Escuela de Ingeniería Bioquímica
P. Universidad Católica de Valparaíso

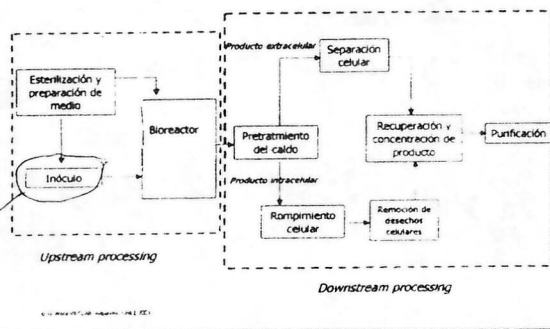
10.10.2010 10:10:10

Fundamentos de Bioseparaciones

- Bioseparaciones → *Downstream processing*
- Características de los productos de bioprocesos
- Secuencias de separación
- Principios de operaciones de separación

10.10.2010 10:10:10

Bioseparaciones *Downstream processing*



en caso de
fermentación

Proceso en el que participa un biocatalizador (una cel o componente de ella: upstream y downstream (después de la etapa de preparación).

Características de los productos de bioprocesos:

- Inicialmente están en soluciones donde también se encuentra una gran variedad de tipos de moléculas
- Inestables su inestabilidad depende de:
 - pH
 - Temperatura
 - Fuerza iónica
 - Tipo de solvente usado
 - Presencia de compuestos tensoactivos

© C. AROCA A. 2011

Características de los productos de bioprocesos

- La mayoría son comercializados por su actividad catalítica
 - Penicilina actividad antibacteriana
 - Taxol actividad anticancerígena
 - Estreptokinasa actividad disolución de coágulos
 - Enzimas por su respectiva actividad
 - *Bacillus thuringensis* actividad insecticida

© C. AROCA A. 2011

Clasificación de productos de bioprocesos

- Compuestos orgánicos de PM bajo a medio
 - Ac. Orgánicos, azúcares, péptidos, hormonas, aminoácidos, antibióticos
- Macromoléculas
 - Polisacáridos, proteínas, ac. nucleicos
- Partículas
 - Células, esporas, organelos, virus, partículas subcelulares (liposomas, ribosomas)

© C. AROCA A. 2011

Proteínas Top 10

- Eritropoietina (estimula generación/crecimiento de glóbulos rojos)
- Factor estimulante de colonias (estimula generación/crecimiento de glóbulos blancos)
- Insulina (Diabetes)
- α Interferon (acción anticancerígena, infecciones)
- Vacuna contra Hepatitis B (Hepatitis B)
- Glucocerebrosidasa (Deficiencia genética)
- Tpa (Tissue plasminogen activator) (Ataques al corazón)
- Hormona de crecimiento somatotrópica (crecimiento deficiente)
- Anticuerpo GPIIb/IIIa (previene coágulos sanguíneos)
- Interferón β -1a (Esclerosis múltiple)

© 2000 American Chemical Society, ACS, Inc.

30 no III

Macromoléculas: proteínas

Estructura primaria
Secuencia de aminoácidos

Estructura secundaria
Enlaces de hidrógeno

Estructura terciaria
Estado tridimensional

Estructura cuaternaria
Interacción con otras moléculas (grupos prostéticos)

Lípidos
Lipoproteína
Oligosacáridos
Glicoproteína
Fosfato
Fosfoproteína
Porfirina férrica
Hemoproteína
Flavin Nucleótido
Flavoproteína
Hierro, Zinc
Metaloproteína

© 2000 American Chemical Society, ACS, Inc.

Estabilidad de proteínas

- Depende de la estructura terciaria y cuaternaria
- Causas de degradación de proteínas
 - Deamidación de asparagina y glutamina
 - Oxidación de metionina
 - Oligomerización
 - Agregación
 - Fragmentación (depimerización)
 - Cross-linking
 - Rearreglos Inter and intramoleculares por intercambios de enlaces disulfuros de cisteína
 - Denaturación: rompimiento de enlaces de hidrógeno y enlaces iónicos que determinan la estructura terciaria

© 2000 American Chemical Society, ACS, Inc.

Objetivos de la secuencia de separación

$$\text{Pureza} = \frac{\text{cantidad de producto}}{\text{cantidad de producto} + \text{Cantidad total de impurezas}}$$

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Unidades de actividad biológica}}{\text{masa}}$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Cantidad de producto a la salida}}{\text{Cantidad de producto a la entrada}}$$

© 1995 Macmillan, 1200 Park Avenue, New York, NY 10028

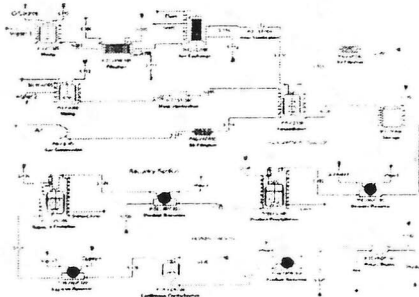
Etapas de una secuencia de separación

Etapas	Objetivo	Operación
Separación de insolubles	Remover o recolectar células, partes celulares, u otras partículas Reducir el volumen	Filtración Sedimentación Extracción Adsorción
Aislamiento del producto	Remover materiales que tienen propiedades muy distintas del producto y de las deseadas en el producto Reducir el volumen	Extracción Adsorción Ultrafiltración Precipitación
Purificación	Remover impurezas remanentes, las cuales normalmente son similares al producto deseado en funcionalidad química y propiedades físicas	Cromatografía Precipitación fraccionamiento Cristalización
Pulido	Remoción de líquido Convertir el producto a una forma cristalina	Secado Cristalización

© 1995 Macmillan, 1200 Park Avenue, New York, NY 10028

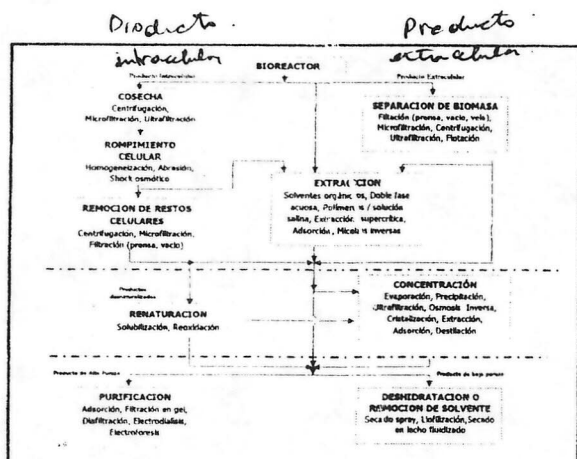
pulido: busca eficiencia en el tiempo.

Diagrama de flujos de la producción de Ac. Cítrico



© 1995 Macmillan, 1200 Park Avenue, New York, NY 10028

HARRISON, R.C., TOLLE, P., PURVIS, S.P., PERDUE, D. BIOSEPARATION SCIENCE AND ENGINEERING, 1st Ed., Oxford University Press, New York, 2003



Se deben optimizar c/e de las etapas

Principios de separación

Propiedad principal	Operación
Tamaño	Filtración, Micro- Ultrafiltración, Cromatografía de exclusión
Densidad	Sedimentación, Centrifugación
Difusividad	Osmosis inversa, diálisis, membranas líquidas
Pto. ebullición	Destilación
Solubilidad	Extracción, Precipitación
Sorción superficial	Adsorción
Carga iónica	Cromatografía de int. iónico
Hidrofobicidad	Cromatografía de int. hidrofóbica
Interacciones esp.	Cromatografía de afinidad

Concentración de biomasa al final de etapa de producción

Tipo de célula	Producto	Concentración % peso seco
Levadura/bacteria	Proteína unicelular	3 - 6 %
Hongo	Ac. cítrico	2 - 3 %
	Penicilina	2 - 4 %
Bacterias	enzimas	3 - 5 %
Células animales	...	0.02 - 0.05
Células vegetales	...	0.1 - 0.5

Técnicas físicas de rompimiento celular

Técnica	Principio	Stress	Costo	Ejemplo
Homogeneización cuchillo o émbolo	Rompimiento de células en mezcladora	Moderado	Moderado	Tejidos animales
Molienda	Molienda de células con abrasivos	Moderado	Barato	Enzimas de levadura
Ultrasonido	Células se rompen por cavitación sónica	Alto	Caro	Suspensiones celulares en pequeña escala
Celdas de presión	Rompimiento celular por esfuerzo de corte cuando son forzadas a pasar por un pequeño orificio	Alto	Moderado	Tratamiento en gran escala de suspensiones celulares
Molino de Bolas	Las células se rompen entre bolitas de vidrio o acero.	Alto	Barato	Tratamiento en gran escala de suspensiones celulares

Sedimentación Gravitacional



$$F_g = F_d + F_b$$

$$F_b = m \cdot a = \frac{\pi}{6} \cdot d_p^3 \cdot \rho_p \cdot g$$

$$F_d = \frac{\pi}{6} \cdot d_p^3 \cdot \rho_p \cdot g$$

$$v_g = \frac{d_p^2 (\rho_p - \rho_f) g}{18 \mu}$$

$$v_g = \frac{10^{-4} \cdot 0,05 \cdot 980}{18 \cdot 0,01} = 2,75 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$$

La partícula demoraría 700 (h) en recorrer 7 (cm)

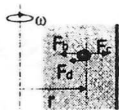
$F_g = f_{ga} \text{ gravitac.}$

$F_d = f_{ga} \text{ roce}$

$F_b = f_{ga} \text{ flotación}$

$\phi \text{ partícula } 10^{-4}$

Sedimentación centrífuga



$$\frac{dv}{dt} = \frac{d}{dt} \left(\frac{\pi}{6} d_p^3 \rho_p \right) = \frac{C d_p^3 \rho_p A \omega^2}{18 \mu}$$

$$\frac{dv}{dt} = \left(\frac{1}{18} \right) \left(\frac{\pi}{6} d_p^3 \rho_p \right) \cdot \frac{C d_p^3 \rho_p A \omega^2}{18 \mu}$$

$$v_c = \frac{(\rho_p - \rho_f) d_p^2 \omega^2 r}{18 \mu} \quad \text{Re} \leq 0,4$$

se diseñan respecto al área de clarificación (área que no dejan de la partícula cuando pp.) Σ

Filtración convencional

$$\frac{1}{A} \frac{dV}{dt} = \frac{\Delta P}{\mu (R_f + R_m)}$$

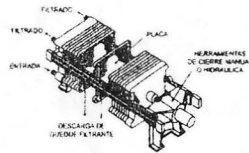
$$\frac{1}{A} \frac{dV}{dt} = \frac{\Delta P}{\mu \cdot \alpha \cdot W_p \cdot (V + V_e)}$$

$$\alpha = \alpha_p (\Delta P)^n$$

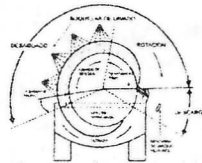
Microorganismo	Filtro	Vel. flujo (cm/s)	Sólido en cald. (g)
Penicillium chrysogenum	PenicBina	3.5-4.0	0.15-0.20
		4.5-5.0	0.20-0.30
Actinomyces orientalis	Vancomicina	2.5-3.0	400-700
Actinomyces streptomycyl	Estreptomycina	3.2-3.6	500-4000
		4.0-4.5	>4000
Saccharomyces cerevisiae	Levadura		0.1-1.0
Carbonato de calcio			0.01

U. N. Ing. Quím. (C) - Mendoza (C) - 2001

Filtro a presión de plato y marco



Filtro rotatorio a vacío



Condiciones de filtración en filtro rotatorio a vacío

Tipo filtro		Bacillus licheniformis	Streptomyces erythraeus
Vel. filtr.	gal/hr-pie ²	Precaza	10
Sólido en barro	(%)	6	25
Temp. barro	(°C)	-	Ambiente
Inmersión	(%)	35	33
Tiempo ciclo	(min)	0.5	3
Humedad queso Grosor queso	(pulg.)	-	0.25-0.38
Medio filtrante		Precaza	Nylon
Apres. filt.	(% barro)	0.4-2.6	No usa
Consumo precaza	(lb/1000 gal filtr.)	-	-

U. N. Ing. Quím. (C) - Mendoza (C) - 2001

Membranas

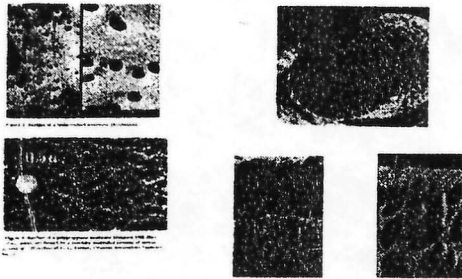


Fig. 1. Membranes (SEM). (1) P. 100, (2) P. 100, (3) P. 100, (4) P. 100, (5) P. 100.

Módulos de membrana

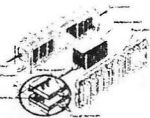
Tubular



Fibra Hueca



Membranas planas



Membranas planas en espiral

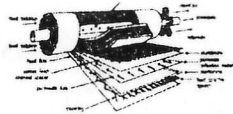
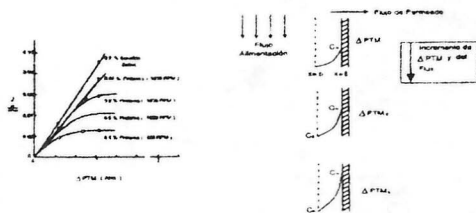


Fig. 2. Membranes (SEM). (1) P. 100, (2) P. 100, (3) P. 100, (4) P. 100, (5) P. 100.

Modelo de polarización de la concentración



Reproducción de Tejeda, A., R.M. Montesinos, & Guzmán, 1995. BIOSEPARACIONES. Editorial Limón, Hermosillo, Sonora México.

Fig. 3. Modelo de polarización de la concentración.

condiciones hidrodinámicas
son muy importantes.

al aplicar presión llegará un
pto q el flux será etc.
El flux tb será dependiente
de la $[C]$ del material a
filtrar + q de la presión.

Módulo Tubular

Flujo laminar ($Re < 2000$)

Correlación de Graetz (1945), Leveque (1928)

$$Sh = 1,62 \left(Re \cdot Sc \cdot \frac{d_i}{L_i} \right)^{1/3} \quad k = \left(\frac{u \cdot D^2}{d_i \cdot L_i} \right)^{1/3}$$

Flujo turbulento ($Re > 2000$)

Correlación de Dittus, Boelter (1930)

$$Sh = 0,023 \cdot Re^{0.8} \cdot Sc^{0.33} \quad k = 0,023 \cdot \frac{u^{0.8} \cdot D^{0.67}}{d_i^{0.2} \cdot \mu^{0.47}}$$

Con Promotor de turbulencia.

Correlación de Pitts y Middelmann (1973)

$$Sh = 4,34 \left(Re \cdot Sc \cdot \frac{d_i}{L_i} \right)^{1/3} \quad k = 4,34 \cdot \left(\frac{u \cdot D^2}{d_i \cdot L_i} \right)^{1/3}$$

Módulo de fibras huecas

Chen, H. y Nichols (1960)

$$k = 0,181 \cdot \frac{u^{0.47} \cdot D^{0.67}}{d^{0.51} \cdot \mu^{0.14}}$$

© 1997 VCH Verlag GmbH & Co. KG

Módulos de membranas paralelas

Flujo laminar

$$Sh = 1,85 \left(Re \cdot Sc \cdot \frac{d_i}{L_i} \right)^{1/3} \quad k = 1,85 \left(\frac{u \cdot D^2}{d_i \cdot L_i} \right)^{1/3}$$

Flujo turbulento

$$Sh = 0,023 \cdot Re^{0.8} \cdot Sc^{0.33} \quad k = 0,023 \cdot \frac{u^{0.8} \cdot D^{0.67}}{d_i^{0.2} \cdot \mu^{0.47}}$$

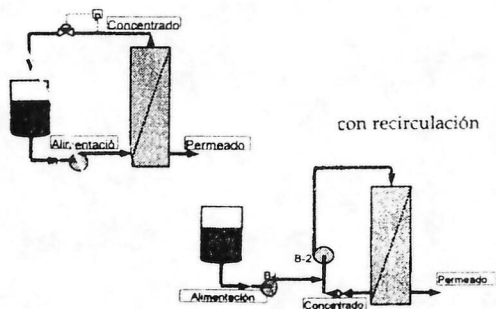
Módulo espiral

Reynolds (1975)

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_{laminar}} + r$$

© 1997 VCH Verlag GmbH & Co. KG

CONCENTRACION OR LOTES



© 1997 VCH Verlag GmbH & Co. KG

Sistemas de extracción de dos fases acuosas

- Sistemas polímero / polímero
 - Polietilenglicol (PEG) – Dextrano
 - PEG – Hidroxipropil de almidón
- Sistemas polímero / solución salina
 - PEG – Fosfato de potasio
 - PEG – Sulfato de potasio

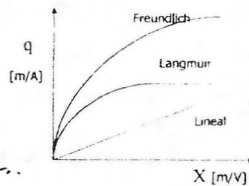
© 2000 Wiley-Liss, Inc. All rights reserved. 100-1-0001

Adsorción

Tipos de Adsorción

- Física
- Iónica
- Hidrofóbica
- Afinidad
- part. magnéticas.

polos opuestos se atraen



© 2000 Wiley-Liss, Inc. All rights reserved. 100-1-0001

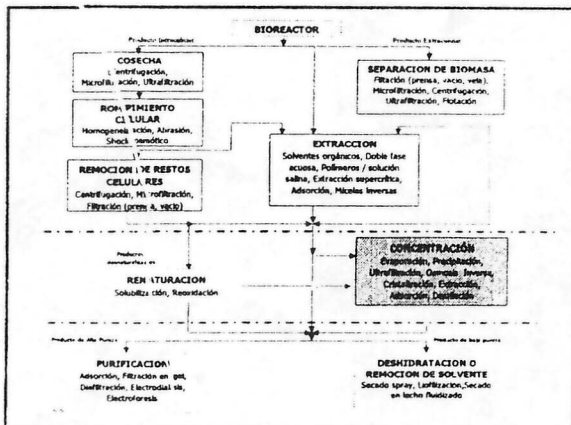
q = concentración en la superficie del adsorbente.

$X = []$ en solución.

lineal con $\ln X$; la

+ típica es Langmuir.

denominados isotermas de adsorción ($a T^o$ cte).



Purificación final

- Cromatografía
 - Exclusión, intercambio iónico, afinidad, fase reversa o interacción hidrofóbica, lectin....
- Precipitación fraccionada
- Diafiltración
- Cristalización

dif entre adsorción y
cromatografía

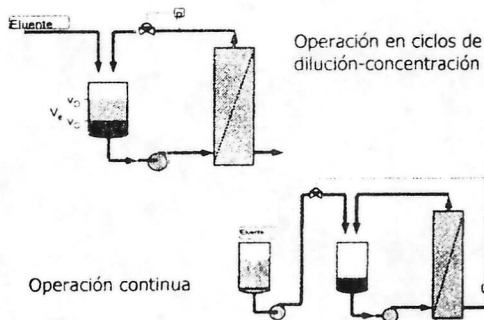
adsorción: agrego material al
sist.

cromatografía: agrego un pulso

Cromatografía en columna

- Exclusión,
- Intercambio iónico,
- Afinidad,
- Fase reversa o interacción hidrofóbica,
- lectin...

DIAFILTRACION





VII Curso Latinoamericano de Biotecnología
XXXVIII Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica
12 - 17 Octubre
Valparaíso - CHILE

SEPARACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LOS ESTEROLES DE MADERA MEDIANTE DESTILACIÓN DE SENDA CORTA.

Andrés Markovits

Escuela de Ingeniería Bioquímica
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

Los esteroides de madera comprenden una mezcla de esteroides saturados o estanoles y esteroides no saturados. El porcentaje de estanoles en la mezcla varía entre 10 a 20 %. Existen incentivos tanto técnicos como económicos para desarrollar un proceso de separación. Los esteroides (no saturados) se utilizan en la industria farmacéutica, donde mediante un proceso microbiano son transformados en compuestos que constituyen el punto de partida para la síntesis de los fármacos esteroideos. El efecto que un elevado contenido de estanoles en la mezcla puede ejercer sobre el proceso de transformación constituye actualmente una incógnita por lo que se prefiere actualmente una mezcla con bajo o ningún contenido de estanoles.

Los estanoles a su vez tienen una creciente demanda en el mercado nutracéutico por sus probadas y aprobadas características hipocolesterolémicas. Por tanto la eventual separación de la mezcla no sólo resolvería un problema técnico sino además incrementaría el valor agregado de los productos separados.

No obstante, las propiedades físico-químicas de los componentes son demasiado similares para permitir el desarrollo de una separación y actualmente no se conoce otra técnica que la que se encuentra en desarrollo en esta Escuela.

El método de separación consiste en dos etapas unitarias. En la primera se realiza una transesterificación enzimática selectiva de los estanoles en la mezcla, lográndose una diferenciación significativa de volatilidad entre los componentes de la mezcla reaccionada, y en la segunda etapa la mezcla se somete a una destilación a vacío.

Separación de los componentes de los esteroides de madera mediante destilación de senda corta. (Shorth path distillation)

Andrés Markovits,
Octubre 2003

Ind pulpos maderos para producción de celulosa

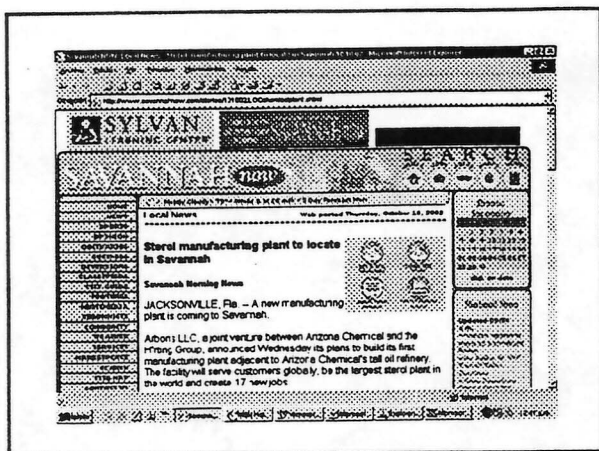
- ♦ Materia prima para la obtención de esteroides de madera:
 - Jabones de licor negro
 - Resíduo pesado destilación tall oil (tall oil pitch).
- ♦ Origen de la materia prima:

Resíduos del proceso de elaboración de celulosa de madera de pino por el proceso Kraft.

*origen maderal de pino.
(esteroides vegetales desechos
(desgomados) de prod. de aceites
vegetales)*

Esquema del proceso

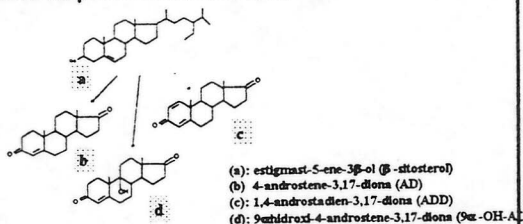




Usos y aplicaciones de los esteroides:

Esteroides:

Materia prima para elaboración de fármacos esteroidales, previa remoción de la cadena lateral mediante un proceso microbiano.



ha sido imposible realizar
 x mét. qco.
 Proceso microbio no complicado
 pero ya este industrializado

Usos y aplicaciones de los esteroides:

Estanoles: (materiales)

Ingrediente de alimentos, como margarinas. (Benecol™) Significativo efecto hipocolesterolémico. Se utiliza la forma esterificada preferentemente.

Motivación para desarrollar un proceso de separación:

- 1) Técnica: La industria farmacéutica prefiere un producto con bajo contenido de estanoles.
- 2) Económica: Aumento del valor agregado.

Estanoles no están presentes en
 aceites vegetales.
 lo obtienen x hidrogenación
 catalítica de un estero. Tienen
 mucha demanda.
 no se conoce efecto de estanoles
 en penetración (de los esteroides)

Destilación molecular implica distancia del orden del camino libre medio de las moléculas de vapor.

- ♦ Molécula de vapor llega al condensador sin sufrir colisiones.
- ♦ Posibilidad de separación en una sólo etapa teórica.
- ♦ Normalmente requiere muy alto vacío.
- ♦ Rara vez ocurre en la práctica
- ♦ Camino libre medio:

$$\lambda = k \frac{T}{\sqrt{2} \cdot \pi \cdot d^2 \cdot P}$$

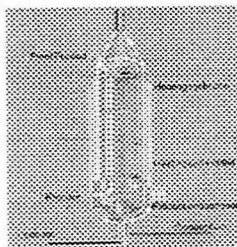
k : Constante de Boltzmann ($1.38 \cdot 10^{-16}$ erg/K)
 d : "diámetro" molecular
 P : presión
 T : temperatura absoluta

* distancia aún + corta
Depende T° , P , ϕ molecular.

molec. no encuentra colisiones
en su camino desde superficie
de evaporación hasta condensación.

Equipo de destilación de senda corta:

Columna de película delgada descendente (superficie de evaporación) y condensador concéntrico. Generalmente opera a presiones de vacío.



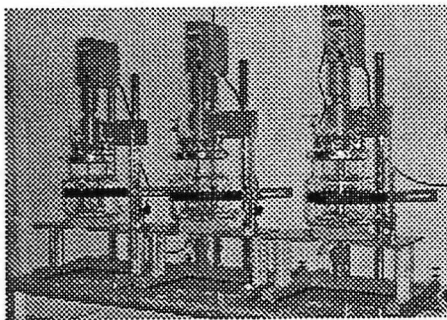
Separación de esteroides y estanoles ésteres debe realizarse a baja presión y temperaturas relativamente altas. Presiones de vapor muy bajas.

Desventajas destilación senda corta:

- ♦ Equivale a menos de una etapa teórica de separación.
- ♦ No puede separar mezclas de multicomponentes. ♦ Separación eficiente, aún para mezclas binarias puede requerir más de una columna o sucesivas pasadas por la misma columna a diferentes condiciones.
- ♦ Costo.

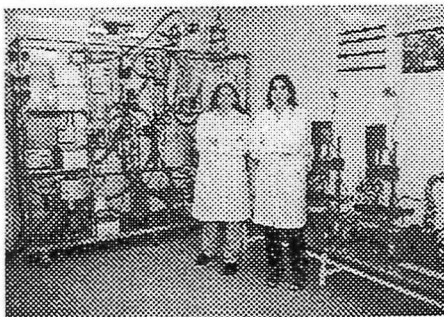
$\downarrow P$ ya qe volatilidad es
muy baja

Reactores para proceso de esterificación



reactores agitados pero
x vacío (remover etanol
y metanol para evitar
efecto tóxico sobre la enzima
y por desplazamiento de reacción)

Laboratorio de Esterificación enzimática



www.esteroles.ucv.cl

EXTRACCIÓN DE ENZIMAS INTRACELULARES

María Elvira Zúñiga Hansen
VII Curso Latinoamericano de Biotecnología



- LIBERAR EL MÁXIMO DE P_i
- MANTENER LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA
- LIBERAR EL MÍNIMO DE CONTAMINANTES
- MINIMIZAR DISGREGACIÓN DE FRAGMENTOS

long. uso industrial muy
poco común

Proteína intracelular

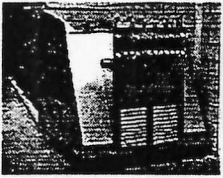
$$\ln\left(1 - \frac{R}{R_m}\right) = -KN$$

$$\ln\left(1 - \frac{R}{R_m}\right) = -kNP^a$$

$$\ln\left(\frac{R_m - R}{R_m}\right) = -kNP^a$$

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) = kNP^a$$

N : n° de pasos
K : f(equipo, T°, P)
k : f(equipo, válvula, T°)
a : f(mo, cultivo, est. fisiológico)



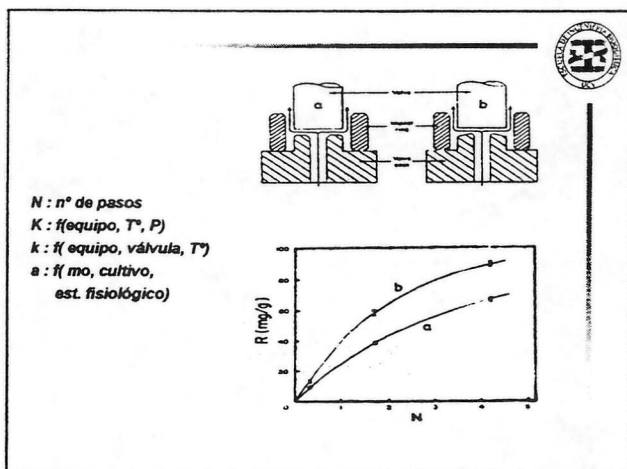
variables de homogenización:

hay muchas modelaciones.

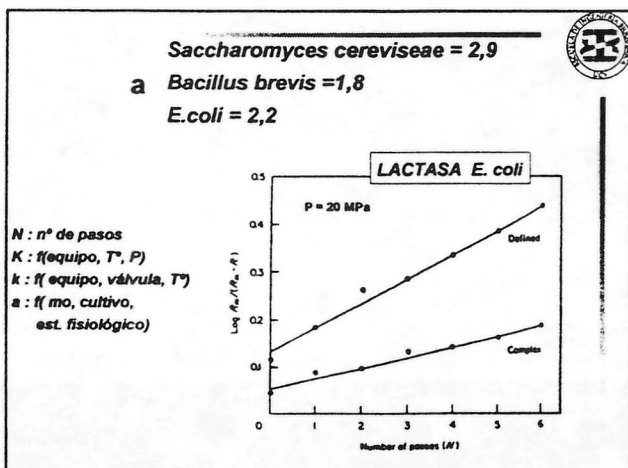
n : n° pasos

R : proteína extraída

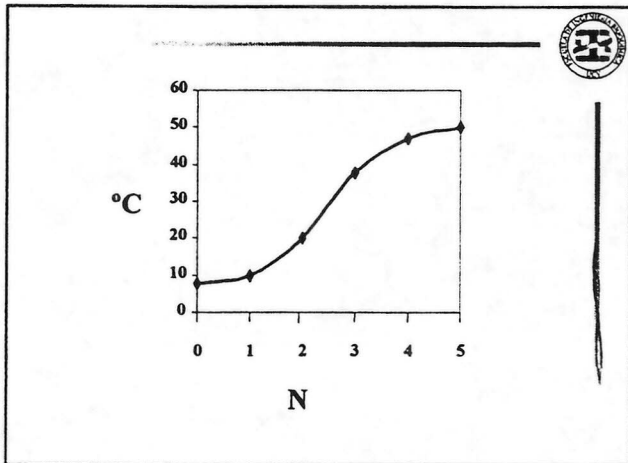
R_m : máx proteína extraíble



≠ tipos de válvulas

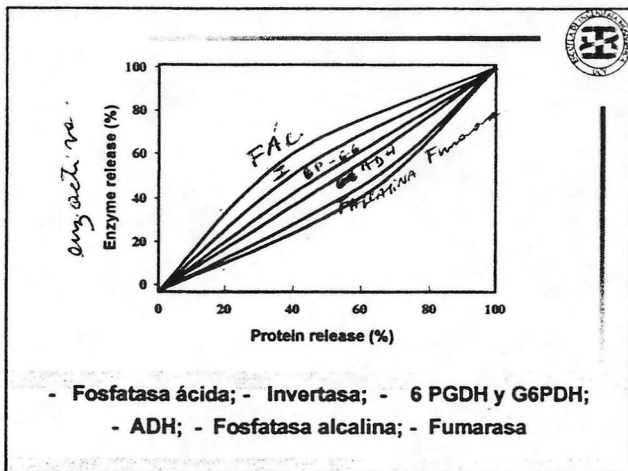


importante 1/2 de cultivo en
algunas estructuras



$>T^\circ$ tienden a denaturarse las enz.

entre cada paso de b_o tener intercambiador de calor.



¿dónde está la enzima?

Eq. homo fermentación

✓ ALTA CAPACIDAD

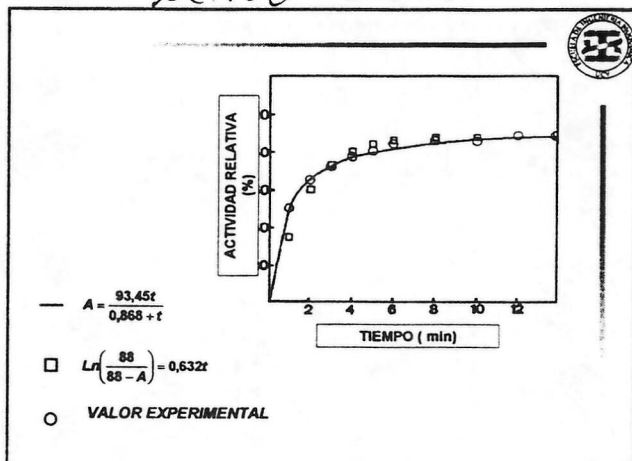
6000 L/h, 140 MPa
5.300 L/h, 55 MPa

✓ CINÉTICA DE PRIMER ORDEN
f(P, N, válvula, célula, cultivo)

✓ REQUIERE ENFRIAMIENTO ENTRE PASOS

✓ POCO APLICABLE A MICROALGAS Y HONGOS

extrac. Octano



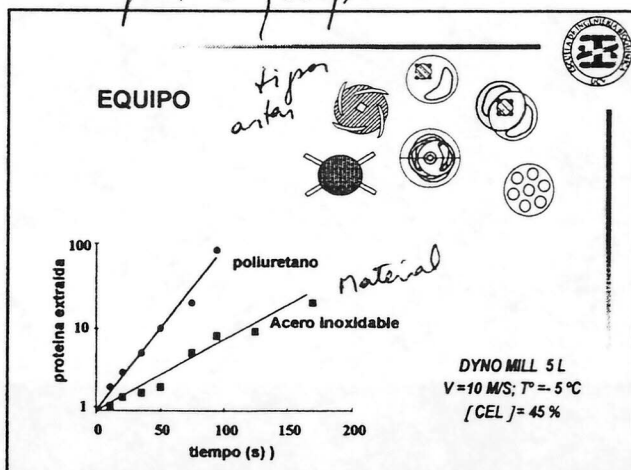
aplicable excepto pa' inh.
enzimatica fuerte (*ej x T°)

R depende de:

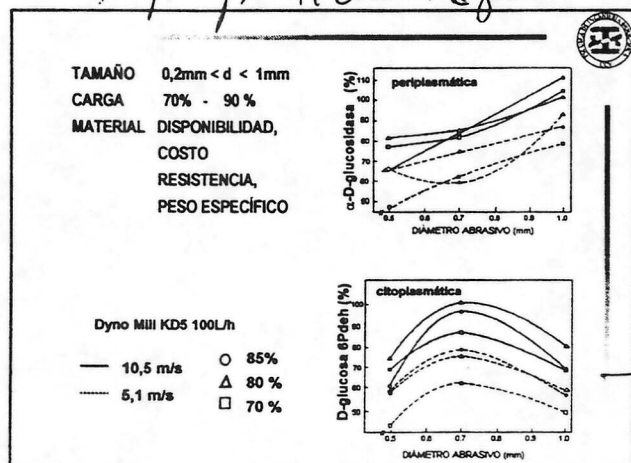
- TIPO DE EQUIPO
- TIPO DE MICROORGANISMO
- CONDICIONES DE CULTIVO
- VELOCIDAD DE AGITACIÓN
- FLUJO
- TEMPERATURA
- ABRASIVO
- CONCENTRACIÓN CELULAR

T° trabajo molienda ajala' 7°C
salida ajala' trabajo 30°C

tipos equipos



Tipo particular (perlas para disrupción celular)

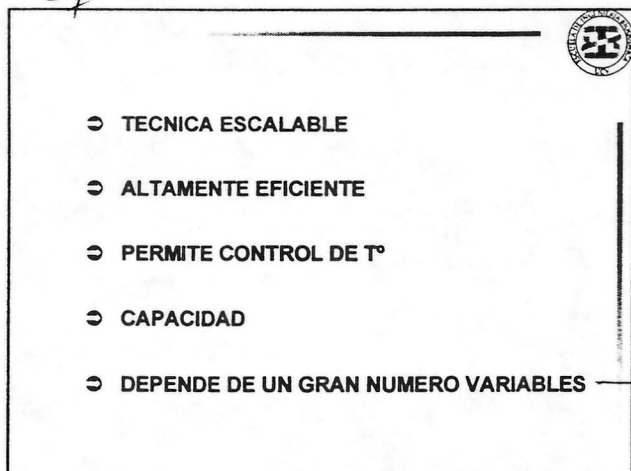


perlas: se agregan x volumen
 ocupado (induciendo factor de huesos)

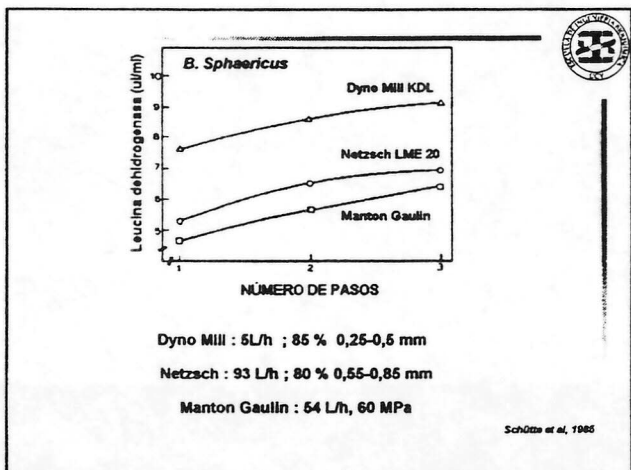
+ difícil de obtener.

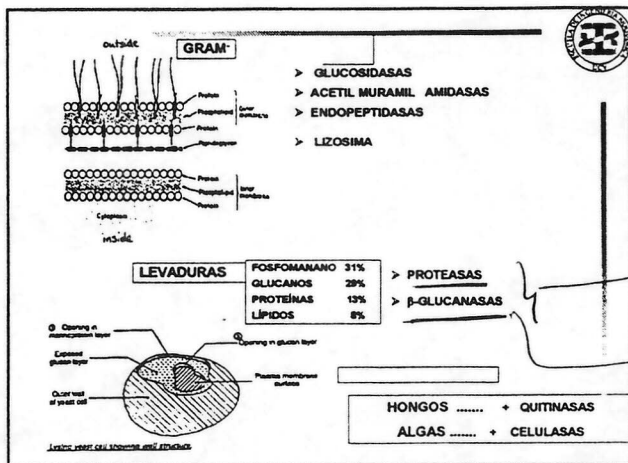
[celular] no hay mucha dependencia
 después del proceso de concentración,
 pero ojo $\Delta > T^\circ$ si lo "crema" es + espeso

Ej. moliendo:



se pueden hacer + modificaciones
 para lograr el éxito

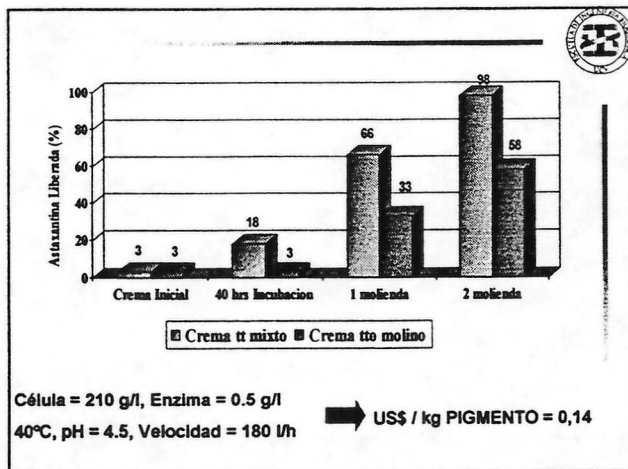




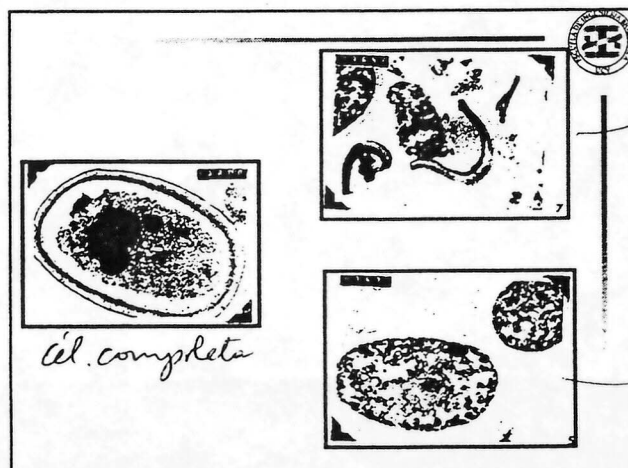
Para agregar enz. exógenas
debemos estudiar estructuras.

alternativas industriales.

(levaduras, hongos, algas etc).



sistemas mixtos. de ruptura
dan buenos resultados.





MODELACIÓN DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA: PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

M.Elena Lienqueo Contreras

mlienque@cec.uchile.cl

Centro de Ingeniería Bioquímica
Departamento de Ingeniería Química
Universidad de Chile

Se describen el funcionamiento de una cromatografía líquida y los principales modelos que se han desarrollado para predecir el comportamiento de las proteínas al ser purificadas por estas técnicas. Los modelos analizados son Modelo Equilibrio, Modelos Estadísticos, Modelos de balance de masa y Modelo de platos. Se coloca principal interés en el modelo de platos desarrollado por Yamamoto, dado que presenta la ventaja de poder predecir en forma bastante adecuada el comportamiento de una mezcla multi-componente, característica que no tienen los otros modelos. Finalmente, se presentan los estudios realizados para estimar los tiempos de retención de las proteínas bajo Cromatografías de Intercambio Iónico, Interacción Hidrofóbica y Permeabilización por geles a partir de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, como son densidad de carga, hidrofobicidad superficial y peso molecular, respectivamente.

Bibliografía :

- Garrido, C. 1997. "Modelación y Simulación de Procesos Cromatográficos de Separación de Proteínas". Memoria de título de Ingeniero Civil Químico, Universidad de Chile.
- Janson J-C , Jonsson J-A (1998) "Introduction to Chromatography" en "Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods, and Applications", Editado por J-C Janson , L. Ryden, 2 Edition, Wiley-Liss, New York, 3-40.
- Lienqueo M.E., Mahn A., Vásquez L, Asenjo J. A. (2003). " A methodology for predicting the separation of proteins by Hydrophobic Interaction Chromatography and its application to a cell extract" Chromatogr A, 1009: 189-196.
- Lucero, A. 2003. "Modelación y simulación de cromatografía para predecir procesos de purificación de proteínas". Memoria para optar al título de Ingeniero Civil Químico y Biotecnología, Universidad de Chile.
- Olivares, G. A. 2002. "Simulación Computacional de la Purificación de Proteínas mediante Cromatografía de Intercambio Iónico". Memoria para optar al título de Ingeniero Civil Químico, Universidad de Chile.
- Sofer G , Hagel L.(1998) " Handbook of process Chromatography : A guide to Optimization, Scale-Up, and Validation" Academic Press, San Diego, 387pp
- Yamamoto, S., Nakanishi, K. y Matsuno, R. 1988. "Ion Exchange Chromatography of Proteins". Chromatographic Series, 43. Marcel Dekker Inc. New York.

Modelación de Cromatografía Líquida

M. Elena Lienqueo
Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología
Universidad de Chile

mlienque@cec.uchile.cl

Modelos perfiles

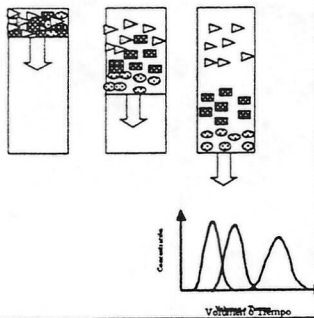
Correlaciones tr.

otras parámetros.

Proceso de cromatografía Líquida

La cromatografía es un método de separación para separar mezclas y aislar componentes.

La base de la cromatografía es la migración diferencial, es decir, el retardo selectivo de las moléculas de soluto durante su paso a través del lecho de partículas de resina (Columna).



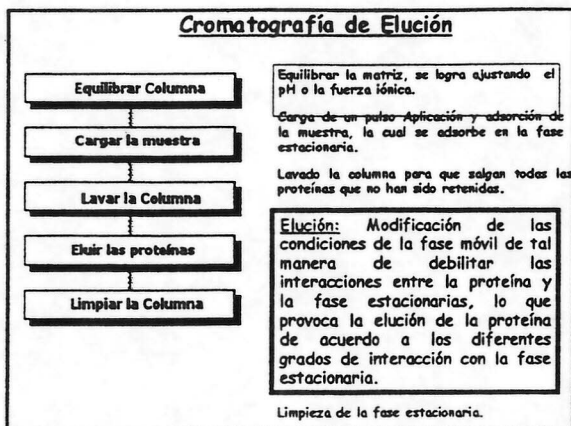
perfiles cromatográficos que ni los modelos nos dan las condiciones de mejor separación.

Tipo de Cromatografía

Tipo de Cromatografía	Propiedad Fisicoquímica o Bioquímica	Características
NO ADSORCION		
Permeabilización Filtración por Gases (GF) o Exclusión por Tamaño	Peso Molecular	Resolución: Moderada Capacidad: Baja Velocidad: Baja
ADSORCION		
Afinidad (AC)	Afinidad Biológica	Resolución: Excelente Capacidad: Alta Velocidad: Alta
Intercambio Iónico (IEC) (Aniónico Catiónico)	Carga a diferentes pH	Resolución: Alta Capacidad: Alta Velocidad: Alta
Cromatofocusing	Punto Isoeléctrico	Resolución: Muy Alta Capacidad: Muy Alta Velocidad: Alta
Interacción Hidrofóbica (HIC)	Hidrofobicidad Superficial	Resolución: Alta Capacidad: Alta Velocidad: Alta
Fase Reversa (RPC)	Interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas	Resolución: Excelente Capacidad: Intermedia Velocidad: Alta

para proteínas.

my buena (en prot. recombinantes se puede poner una parte q otorga afinidad)



La Elución puede ser llevada a cabo de varias formas:

-Isocrática:

La composición de eluyente se mantiene constante

-Gradiente

La composición del eluyente varía gradualmente

- Lineal
- Escalonada

Porque me de las procesamiento.

• ahorrando tpo de experimentación

• ahorrando reactivos.

• Seleccionar condiciones óptimas de pH.

Modelos formulados para Procesos Cromatográficos

Los modelos de diseño

- Predicen los tiempos de retención.
- La forma de las curvas.

Los modelos son del tipo:

- Equilibrio.
- Estadísticas.
- Modelos de balance de masa.
- De platos.

Modelo el perfil cromatográfico.

Modelos de platos

1. Modelo de plato Tradicional

- Divide la columna en una serie de pequeñas celdas artificiales perfectamente mezcladas
- Se obtienen ecuaciones diferenciales de primer orden que describen la adsorción y la transferencia de masa en la interfase.

* No son generalmente apropiados para cromatografía multicomponente debido a que el estado de equilibrio no puede ser asumida igual para componentes diferentes.

2. Modelo de Platos de Yamamoto

(para cromat. intercambio iónico)

- Se basa en factores de distribución que determinan el equilibrio en cada etapa para cada componente.
- Incluye balance de masa para las proteínas y la sal.
- La solución del modelo envuelve iteraciones recursivas preferentemente de sistemas de ecuaciones diferenciales.
- Los modelos de distribución más conocidos son el modelo de Craig (sobrecarga en la columna)

Modelo 1 Teoría del Modelo de platos

Consiste en simular el lecho fijo como un conjunto de N reactores perfectamente agitados en serie.

Balance de soluto

{Acumulación de soluto en el líquido} = {Entrada de soluto}

-{Salida de soluto} -{Adsorción en la matriz}

$$\xi \cdot V_e \cdot \frac{\partial y_n}{\partial t} = F \cdot y_{n-1} - F \cdot y_n - (1 - \xi) \cdot V_e \cdot \frac{\partial q_n}{\partial t}$$

ξ : fracción de volumen de líquido por etapa o fracción de huecos por etapa

V_e : Volumen de la etapa n (líquido + adsorbente)

Equilibrio

Relación lineal

$$q_n = k \cdot y_n$$



Modelos de aproximación numérica

Se define la variable: Tiempo adimensional τ

$$\tau = \frac{F \cdot t}{[\xi + (1 - \xi) \cdot k] \cdot V_e}$$

Con esto la ecuación de balance queda:

$$\frac{\partial y_n}{\partial \tau} = (y_{n-1} - y_n)$$

Con las condiciones para integrar:

I) Para todo $\tau < 0$ $y_n = 0$ $n = 1, 2, \dots, N$.

II) Inyección inicial de un pulso muy corto $\tau = 0$ $y_1 = y_f$

Con esto la respuesta a esta integral es una Distribución de Poisson

$$y^n = y_f \cdot \left[\frac{e^{-\tau}}{\tau^n} \cdot \exp(-\tau) \right]$$

Donde y_f : Concentración en el pulso de alimentación

Supuestos del modelo de Yamamoto (1988)

La columna consiste de un cierto número de placas teóricas equivalentes (constante)

Proteínas: N_p

Sal: N_p'

El flujo es continuo sin mezcla entre los platos.

El equilibrio de solutos entre las dos fases es alcanzado instantáneamente.

$$q = K[pH, C, I] \cdot C$$

Donde K difiere de componente a componente.

Disminuye con el aumento de la concentración de proteína y/o de la fuerza iónica.

1.- Balance de Masa para la proteína i.

Suponiendo: $F_e = F_s = F$

$$F[C_{(n-1,i)} - C_{(n,i)}] = \frac{V_e}{N_{p,i}} \frac{dC_{(n,i)}}{dt} + \frac{V_s - V_e}{N_{p,i}} \frac{dq_{(n,i)}}{dt}$$

Realizando cambios de variable

$$\theta = t \cdot F / V_0$$

$$H = (V_t - V_0) / V_0$$

$$N_{p,i} [C_{(n-1,i)} - C_{(n,i)}] = \frac{dC_{(n,i)}}{d\theta} + H \cdot \frac{dq_{(n,i)}}{d\theta}$$

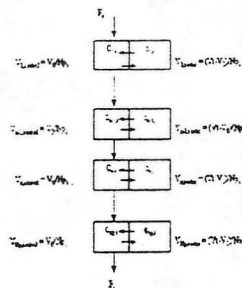
Condición de equilibrio

$$q_i = K_i [C_{(n-1,i)}, I] \cdot C_i$$

$V_{e,i}$ móvil: Volumen de la fase móvil.

$V_{s,i}$ estacionaria: Volumen de la fase estacionaria.

$N_{p,i}$: Número de platos teóricos para la proteína i.



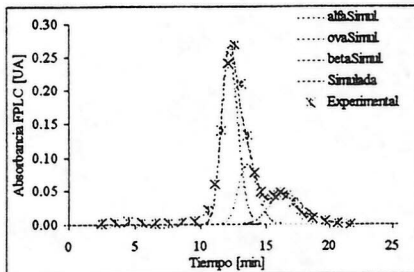
Reorganizando

$$\frac{dC_{(n,i)}}{d\theta} = \frac{N_{p,i} [C_{(n-1,i)} - C_{(n,i)}] - H \cdot C_{(n,i)} \cdot \frac{dK_i [C_{(n-1,i)}, I]}{d\theta}}{1 + H \cdot K_i [C_{(n-1,i)}, I] + H \cdot C_{(n,i)} \cdot \frac{dK_i [C_{(n-1,i)}, I]}{d\theta}}$$

Esta ecuación es no lineal con respecto a la concentración de proteína y la fuerza iónica, por lo tanto se deben usar métodos numéricos para la integración.

Supuestos:

-Muestras con baja concentración de proteínas



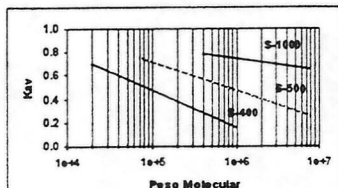
Comparación entre curva de elución experimental y simulada para un flujo de 0,3 ml/min y una pendiente del gradiente de sal igual a 0,1 M/ml. (Lucero, 2003)

en este modelo puedo $\times$
 flujo, y gradiente de sal
 etc. $\Rightarrow$ computador puedo
 incluir condiciones y tener
 los adecuados para hacerlos
 en el lab.

Estimación de los tiempos / volúmenes
 de retención en cromatografía a
 partir de las propiedades
 fisicoquímicas de las proteínas

Cromatografía de NO-adsorción

Cromatografía de Permeabilización por Geles
 (Filtración por Geles)

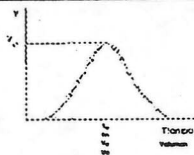


Relación entre los pesos moleculares y los coeficientes K_{av} para diferentes matrices
 analíticas de Filtración por Geles (Adaptado de Pharmacia, 1997)

$$K_{av} = (V_R - V_o) / (V_f - V_o) = A - B \log mw$$

relac. lineal entre t_{por} de
 retención y $\log$ Masas
 moleculares.

1.-Volumen o tiempo de Elución



2.Factor de Capacidad

$$k = \left(\frac{V_e - V_H}{V_H} \right) C$$

V_H : Volumen de huecos, ie, el volumen de líquido existente en la columna que no se encuentra en el interior de las partículas

3.-Selectividad o retención relativa, α

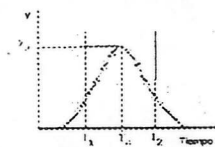
Cuando se tienen dos proteínas, se puede comparar su nivel de retención comparando los factores de capacidad.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

4.- Recuperación o yield

La cantidad de soluto recuperando entre un tiempo t^* y t respecto al total inyectado (y_F)

$$\text{yield} = \frac{\text{Cantidad de proteína Recuperada entre } t = t_1 \text{ y } t = t_2}{\text{Cantidad de proteína inyectada}}$$



Desde Tablas de Integrales

Cantidad recuperada entre t_1 y $t_2 =$

$$\left\{ \sqrt{\frac{\pi}{2}} \cdot F \cdot y_e \cdot t_e \cdot \sigma \right\} \cdot y_e \cdot \left\{ \text{erf} \left[\frac{t_2/t_e - 1}{\sqrt{2} \cdot \sigma} \right] - \text{erf} \left[\frac{t_1/t_e - 1}{\sqrt{2} \cdot \sigma} \right] \right\}$$

Donde erf (x) es la función error.

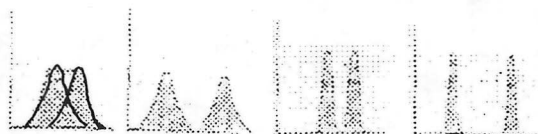
$$\text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot \int_0^x e^{-u^2} du$$

Con esto:

$$\text{yield} = \frac{1}{2} \cdot \left\{ \text{erf} \left[\frac{t_2/t_e - 1}{\sqrt{2} \cdot \sigma} \right] - \text{erf} \left[\frac{t_1/t_e - 1}{\sqrt{2} \cdot \sigma} \right] \right\}$$

Valores de Resolución esperados

$R_s > 1.5$ Corresponde a una separación casi completa.



$R_s < 1$

$R_s < 1.3$

$R_s > 1.3$

$R_s > 1.5$

ejemplo $R_s > 1.5$

Algunas relaciones interesantes

$$N = 16 \left(\frac{V_r}{w} \right)^2$$

$$\text{Resolución} = \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot \left(\frac{V_{e2} - V_{e1}}{V_{e2}} \right)$$

Si se utilizan los conceptos de factor de capacidad, k , y selectividad, δ ,

$$k = \left(\frac{V_0 - V_H}{V_H} \right)$$

$$\delta = \frac{k_2}{k_1}$$

$$\begin{aligned} \text{Resolución} &= \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot \left(\frac{\delta - 1}{\delta} \right) \cdot \left(\frac{K_2}{K_2 + 1} \right) \\ &= \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L}{HETP}} \cdot \left(\frac{\delta - 1}{\delta} \right) \cdot \left(\frac{k_2}{k_2 + 1} \right) \end{aligned}$$

Y nos da lo q' permiten estimar modelos cromatog (bueno el de Yamamoto)

→ correlaciones q' predicen tiempos de elución de prot. en función de prop físico-quím.



RECUPERACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE USO TERAPÉUTICO

Dra. Marina Etcheverrigaray
Universidad Nacional del Litoral

Los productos biológicos presentan dificultad para la consistencia en su fabricación así como para su caracterización completa. La habilidad para producir un producto consistente y de calidad apropiada es el paso limitante en la velocidad para alcanzar el mercado. Cambios en la producción o en la formulación a menudo conducen a variaciones en el producto.

La expresión de proteínas recombinantes puede ser intracelular, extracelular o periplásmica. La estrategia de expresión intracelular puede ser, a su vez, directa o como proteínas de fusión. Cada uno de los métodos presenta ventajas y desventajas.

Se discute sobre los pasos requeridos antes de la separación cromatográfica dependiendo de la localización del producto.

La mayoría de las proteínas intracelulares se expresan en agregados, los cuerpos de inclusión. Se plantean los procedimientos involucrados en la recuperación de proteínas a partir de los mismos. Un aspecto fundamental es el *refolding* de las proteínas provenientes de cuerpos de inclusión, ya que son inactivas en ese estado. El grado de agregación proteica depende de: parámetros del entorno, especificidad del contacto proteína-proteína. Las proteínas difíciles de renaturalizar a menudo contienen uniones disulfuro. Se discute sobre los factores que influyen en el rendimiento del *refolding*.

Con respecto a las proteínas de fusión, se muestran los métodos de clivaje según las secuencias reconocidas. Asimismo, se ejemplifican proteínas de fusión diseñadas para facilitar la purificación y los ligandos de purificación adecuados.

El proceso de purificación de proteínas en la industria farmacéutica puede ser dividido en 3 etapas: captura, purificación intermedia y *polishing*. Cada una de ellas tiene distintas finalidades. Se presenta la conveniencia de las técnicas clásicas de purificación para la estrategia de purificación en 3 etapas.

Cada paso cromatográfico tiene parámetros que deben ser optimizados. Dichos pasos deben elegirse según las propiedades de la proteína a purificar y las características de la muestra. Existen contaminantes críticos de un procesamiento *downstream*.

Los parámetros evaluadores de la *performance* de cada etapa de purificación son: actividad específica, factor de purificación y rendimiento.

El escalamiento de los procesos cromatográficos se realiza por: medida de las isotermas de adsorción en el equilibrio y por determinación de la capacidad dinámica. Se presenta el modelo de Chase como aproximación teórica para la predicción del comportamiento de las proteínas en cromatografía de afinidad. La relación entre la concentración de adsorbato en la fase líquida y su concentración en la resina en el equilibrio está dada por las isotermas de Langmuir. Las curvas de *breakthrough* se realizan para determinar la capacidad dinámica de la columna. Existen parámetros operacionales que influyen en la forma de dichas curvas.

Se presentan consideraciones sobre el escalamiento de los procesos de HPLC de fase reversa.

El escalamiento de una separación involucra el cálculo de: factor de escalamiento, capacidad de carga, flujo y duración del gradiente.

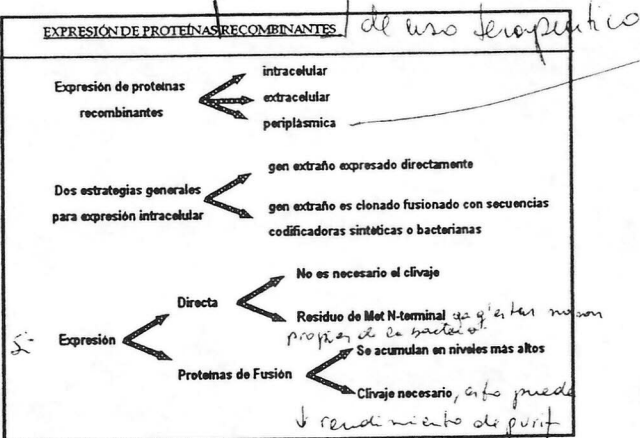
El producto debe ser caracterizado, determinándose su pureza, identidad y estabilidad. Se debe realizar la caracterización fisicoquímica, *tests* biológicos para determinar identidad y potencia, y control de contaminantes. El control de calidad del producto es de fundamental importancia y debe satisfacer los requerimientos establecidos por la autoridad sanitaria competente.

"Recuperación y purificación de proteínas recombinantes de uso terapéutico"

Dra. Marina Etcheverrigaray

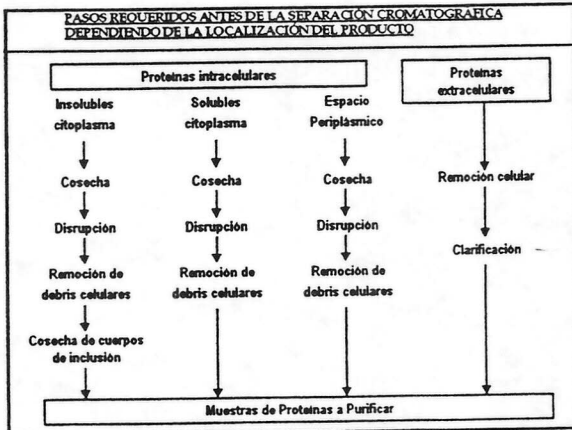
Octubre 2003

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES



*Recuperación x células como
esferoplastos + trat x lisosoma
+ shock osmótico débil
E coli + utilizado en prot. intracelular
en bacterias: solo prot. con act. biológica
sin modificaciones post traduccionales
Prot. de fusión: fáciles de purificar.
(pueden de afinidad o pseudo afinidad)*

**PASOS REQUERIDOS ANTES DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRAFICA
DEPENDIENDO DE LA LOCALIZACIÓN DEL PRODUCTO**



7 + 8 Filtración x mb. con flujo tangencial

INACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS DURANTE LA RENATURALIZACIÓN:

- Por agregación.
- Por intercambio de uniones disulfuro.
- Por alteración de la estructura primaria por modificación química de cadenas laterales de los aminoácidos.
- Por ausencia de grupos prostéticos y metales.
- Por asociación errada de subunidades en proteínas multiméricas.

RENATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE CUERPOS DE INCLUSIÓN

(corefolding)

- ❖ Grado de agregación proteica dependiente de parámetros del entorno:
 - pH cercano al pI (*tenden a agregarse*).
 - temperatura elevada (*favorece agregación*).
 - concentración proteica elevada (*no favorece agregación*).
- ❖ Especificidad del contacto proteína-proteína en la agregación:
 - Proteínas extrañas no interaccionan con monómeros de triptofanasa.
 - Interacción de dímeros parcialmente renaturalizados → formación de dímeros intermediarios → agregación de bGH.

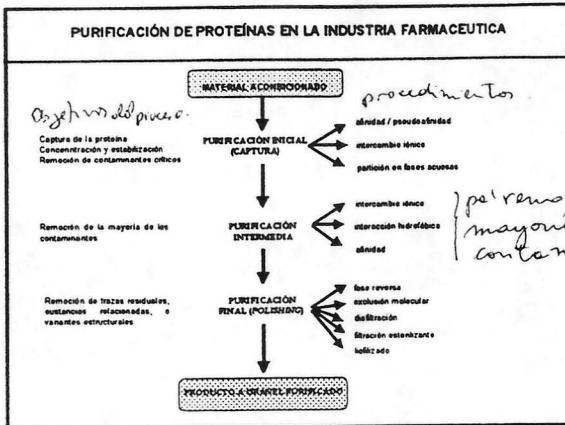
monómeros de det. prot.
tenden a agregarse solo
entre sí.

Las proteínas difíciles de renaturalizar a menudo contienen uniones disulfuro.

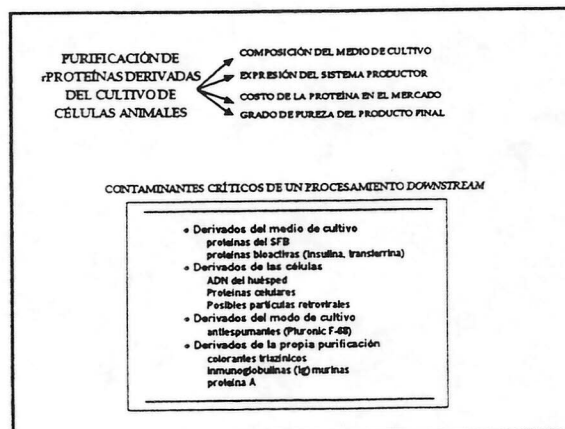
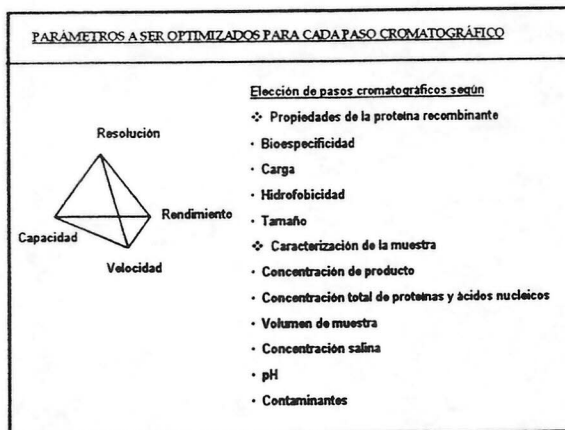
Formación de uniones disulfuro entre cisteínas por:

- oxidación por el aire catalizada por Cu^{2+} y Co^{2+} .
- presencia de agentes reductores y compuestos oxidantes de grupos tioles.

↓
 β -mercaptoetanol
ditiotretol
glutathion



Variantes estructurales
"neofastas". las $\neq$ isoformas (con $\neq$ H₂O) de la proteínas, algunas deben removerse



MEDIDA DE LAS ISOTERMAS DE ADSORCIÓN

Modelo simplificado: Boyer y col. (1992)



Velocidad de adsorción: $\frac{dq}{dt} = k_1 \cdot c \cdot (q_m - q) - k_{-1} \cdot q$

c = concentración de proteína en el líquido ($\mu\text{g/ml}$)

q = concentración de proteína adsorbida ($\mu\text{g/ml}$)

q_m = capacidad máxima de adsorción de la resina ($\mu\text{g/ml}$)

k_1 = constante cinética directa ($\text{ml} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

k_{-1} = constante cinética reversa ($\text{ml} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

t = tiempo

En el equilibrio = Isoterma de Langmuir

$$q = \frac{c^* \cdot q_m}{c^* + K_d}$$

q = cantidad de adsorbato unida en el equilibrio por unidad de volumen de matriz cromatográfica.

c^* = concentración de adsorbato libre en el equilibrio

q_m = capacidad máxima de la matriz cromatográfica

K_d = constante de disociación entre adsorbente y adsorbato

$$= k_{-1}/k_1$$

Describe la relación entre la concentración de adsorbato en la fase líquida y su concentración en la resina en el equilibrio.

CAPACIDAD DINÁMICA DE LA COLUMNA

Método frontal:

Muestra



Elución de adsorbato

Curva de breakthrough: Análisis frontal.
Variación de la concentración de adsorbato a la salida de la columna en función del tiempo.

Estudio de la influencia de diferentes parámetros operacionales sobre la forma de la curva de breakthrough $\longrightarrow$ optimización del sistema:

- composición y pH de la solución de equilibrio del sistema
- flujo
- concentración de la muestra



PROTEIN PURIFICATION EMPLOYING MEMBRANE ADSORBERS

Leda R. Castilho

Universidade Federal do Rio de Janeiro
COPPE - Programa de Engenharia Química
Caixa Postal 68502, Ilha do Fundão, 21945-970 Rio de Janeiro/RJ, Brasil
e-mail: leda@ufrj.br

Adsorptive membrane chromatography reflects technological advances in both membrane filtration and fixed-bed liquid chromatography. Membrane adsorbers are a hybrid synthesis of these two technologies (Roper and Lightfoot, 1995), aiming at combining the selectivity of chromatographic separations with the high productivity associated with filtration membranes (Klein, 2000). Therefore, membrane chromatography was introduced as a technology specially suited for large-scale processes (Thömmes and Kula, 1995).

Membrane adsorbers consist fundamentally of microfiltration membranes, to whose pores specific ligands have been attached. Like perfusion beads, which were proposed as an attempt to increase the permeability of the sorbent while keeping diffusional pathways in the cross-linked particles as short as possible (Gebauer et al., 1997), membrane adsorbers have been developed as an alternative to conventional gel bead chromatography (Charcosset, 1998).

One of the severe limitations for engineering efficient process-scale separation systems is the intrinsic compressibility of agarose gel beads. Under typical process-scale operating conditions, agarose gel beds get compressed and tightly packed, thus seriously compromising the throughputs of such systems. Small sized silica supports of greater structural rigidity have been developed to minimise bed compression and allow for the high throughputs necessary for a commercial process system. This, however, is possible only at the expense of high operating pressures (Brandt et al., 1988).

Additionally, gels present such problems as air entrapment, drying, cracking, cumbersome column handling and, most importantly, slow flow rates due to intraparticle diffusion of liquids and analytes. In membranes, accidental drying does not damage or disturb the process (Malakian et al., 1993).

The porous nature and hydrophilicity of some membrane beds may account for additional advantages. Clogging by insoluble precipitates produced during adsorption is reduced relative to packed beds. The interstitial void volume due to empty spaces between spherical beads in a packed bed is avoided in membranes. This has been reported to reduce the non-adsorptive dead volume by 26% (Roper and Lightfoot, 1995).

According to Darcy's law (Darcy, 1856), throughput is, for a given pressure drop across the bed, inversely proportional to bed height. Therefore, design engineers have tried to maximise throughput by developing shorter and wider beds. This means that the "ideal" column geometry would have an infinitely short bed height (to minimise operating pressures and maximise throughputs) and an infinite width (to maximise ligand loading and binding capacity) (Brandt et al., 1988). Membrane sorbents resemble this ideal form of a very short and wide column.

Although the specific permeability of a microporous membrane is similar to a typical packing in FPLC (Gebauer et al., 1997), the shorter adsorbent length allows higher flow rates at low pressure drop to be achieved in membrane systems. Despite their abbreviated flow path, adsorptive membrane columns achieve resolutions comparable to those with packed chromatographic beds (Roper and Lightfoot, 1995; Thömmes and Kula, 1995). Josic et al. (1992) reported stacked membrane separations of model protein systems which were comparable to similar high-pressure liquid chromatographs without requiring high-pressure columns, peripherals or pumps.

In membrane-based chromatographic separations, elution is accomplished very fastly, so that the target molecule remains for just a short time under conditions which favour its degradation. In slower, conventional processes, variants of proteins and nucleic acids are generated during downstream processing by deamidation, oxidation, proteolysis, nicking and aggregation. The fraction of degradation products increases with residence time, so shorter process times can result in higher recoveries and product purity (Roper and Lightfoot, 1995).

- Castilho LR, Anspach FB, Deckwer WD (2002), Comparison of affinity membranes for the purification of immunoglobulins, *J Membrane Sci*, 207, 253-264.
- Castilho LR, Deckwer WD, Anspach FB (2000), Influence of matrix activation and polymer coating on the purification of human IgG with Protein A affinity membranes, *J Membrane Sci*, 172, 269-277.
- Cattoli F, Sarti GC (2003), Use of microporous affinity membranes for protein purification: a case study. In: Bhattacharyya D, Butterfield DA (Eds.), *New Insights into Membrane Science and Technology: Polymeric and Bifunctional Membranes*, Chapter 13. Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Champluvier B, Kula MR (1992), Sequential membrane-based purification of proteins applying the concept of multidimensional liquid chromatography (MDLC), *Bioseparation*, 2, 343-351.
- Charcosset C (1998), Purification of proteins by membrane chromatography, *J Chem Technol Biotechnol*, 71, 95-110.
- Chaudhary A, Mehrota B, Prestwich GD (1997), Rapid purification of reporter group-tagged-inositol hexakisphosphate on ion exchange membrane adsorbers, *BioTechniques*, 23, 427-432.
- Chiu C, Etzel M (1998), Fractionation of lactoperoxidase and lactoferrin from bovine whey using a cation exchange membrane, *J Food Sci*, 62, 996-1000.
- Dancette OP, Taboureau JL, Toumier E, Charcosset C, Blond P (1999), Purification of immunoglobulins G by protein A/G affinity membrane chromatography, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 723, 61-68.
- Darcy HPG (1856), *Les fontaines publiques de la ville de Dijon: Exposition et application à suivre et des formules à employer dans les questions de distribution d'eau*. Victor Dalmont, Dijon.
- Demmer W, Fischer-Frühholz S, Nußbaumer D, Melzner D (2003), Economic production of biopharmaceuticals by high-speed membrane adsorbers. In: Bhattacharyya D, Butterfield DA (Eds.), *New Insights into Membrane Science and Technology: Polymeric and Bifunctional Membranes*, Chapter 14. Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Demmer W, Nussbaumer D (1999), Large scale membrane adsorbers, *J Chromatogr A*, 852, 73-81.
- Deshmukh RR, Warner TN, Hutchison F, Murphy M, Leitch II WE, De Leon P, Srivatsa GS, Cole DL, Sanghvi YS (2000), Large-scale purification of antisense oligonucleotides by high-performance membrane adsorber chromatography, *J. Chromatogr A*, 890, 179-192.
- Endres HN, Johnson JA, Ross CA, Welp JK, Etzel MR (2003), Evaluation of an ion-exchange membrane for the purification of plasmid DNA, *Biotechnol Appl Biochem*, 37, 259-266.
- Etzel M (1999), Membrane chromatography R&D, *FoodTech Cyber Magazine*, 6, 1-7.
- Freitag R, Splitt H, Reif OW (1996), Controlled mixed mode interaction chromatography on membrane adsorbers, *J Chromatogr A*, 728, 129-137.
- Friedrichs G, Hanley TR, Klein E, Baumeister U (2000), Design of an affinity adsorption membrane module for heparin removal. In: *Proceedings of the 11th Annual Conference of the North American Membrane Society, USA*.
- Gebauer K, Thoemmes J, Kula MR (1996), Membrane chromatography: performance and scale-up, *Chimia*, 50, 422-423.
- Gebauer K, Thoemmes J, Kula MR (1997), Breakthrough performance of high-capacity membrane adsorbers in protein chromatography, *Chem Eng Sci*, 52, 405-419.
- Gebauer K, Thoemmes J, Kula MR (1997), Plasma protein fractionation with advanced membrane adsorbents, *Biotechnol Bioeng*, 54, 181-189.
- Gerstner JA, Hamilton R, Cramer SM (1992), Membrane chromatographic systems for high-throughput protein separations, *J Chromatogr*, 596, 173-180.
- Ghosh R (2001), Separation of proteins using hydrophobic interaction membrane chromatography, *J Chromatogr A*, 923, 59-64.
- Ghosh R (2002), Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges, *J Chromatogr A*, 952, 13-27.
- Guo W, Ruckenstein E (2001), A new matrix for membrane affinity chromatography and its application to the purification of concanavalin A, *J Membrane Sci*, 182, 227-234.
- Guo W, Ruckenstein E (2003), Crosslinked glass fiber affinity membrane chromatography and its application to fibronectin separation, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 795, 61-72.
- Henriksen G (1996), Membrane adsorbers find acceptance as a new technique for bioseparations, *Genetic Engineering News*, 16, 06. Jul.
- Josic D, Reusch J, Löster K, Baum O, Reutter W (1992), High-performance membrane chromatography of serum and plasma membrane proteins, *J Chromatogr*, 590, 59-76.
- Josic D, Strancar A (1999), Application of membranes and porous units for the separation of biopolymers, *Ind Eng Chem Res*, 38, 333-342.

Protein purification employing membrane adsorbers

Leda Castilho

*Universidade Federal do Rio de Janeiro
COPPE - Programa de Engenharia Química (PEQ)
Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares*

*Caixa Postal 68502, 21945-970 Rio de Janeiro/RJ, Brasil
e-mail: leda@ufrj.br*

mem. de afinidad e
intercambio iónico

Membrane adsorbers: a combination of separation processes

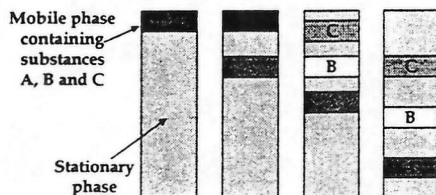
→ Membrane separations

- microfiltration
- ultrafiltration

→ Protein liquid chromatography

- affinity
- ion-exchange
- hydrophobic interaction

Chromatographic separations



→ The substances are individually retarded when passing through the stationary phase according to interactions of different types:

- biospecific recognition (affinity)
- eletrostatic interactions
- hydrophobic interactions

Membrane processes and modes of operation

→ Applicable membrane processes for membrane chromatography

Microfiltration

Ultrafiltration

solvent
 low-MW solute
 high-MW solute
 particle

→ Modes of operation

Dead end filtration

Cross-flow filtration

Membranes vs. gel beads

Chromatography
Packed bed with porous chromatography gel beads

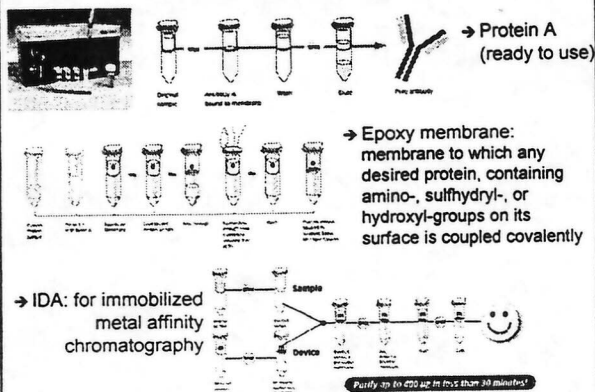
Membrane chromatography

- Media deformation and bed consolidation
- Dependence on intra-particle diffusion
- Large processing times
- Large liquid volume for elution
- Channeling and short-circuiting, poor bed utilisation
- Improved mechanical resistance
- Solute transport predominantly by convection
- Relatively high flow rates at significantly lower pressure drops
- Reduced processing time
- Relative ease of scale-up

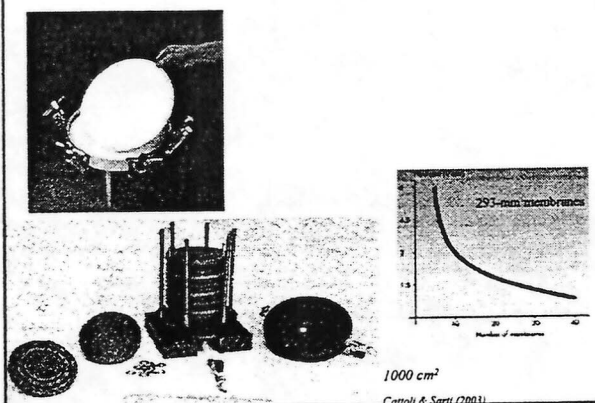
Membrane adsorbers vs. agarose beads

→ Sartobind Q (Sartorius) vs. Sepharose Q Fast-Flow (Amersham)

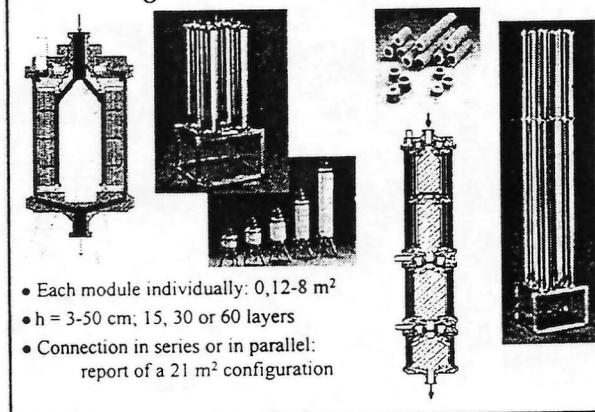
Lab scale "spin columns"



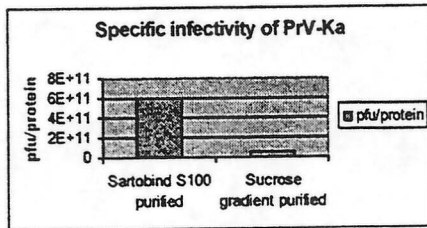
Pilot-scale devices



Large-scale commercial modules



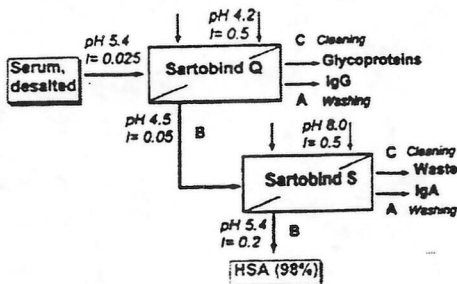
Alphaherpesvirus purification from a cell culture supernatant (porcine kidney cells)



Karger A, Bettin B, Granzow H, Mettenleiter TC (1998), Simple and rapid purification of alphaherpesviruses by chromatography on a cation exchange membrane, *Journal of Virological Methods*, 70, 219-224.

$$pfu = ufc.$$

Human serum albumin purification from human serum



Gebauer KH, Thoemmes J, Kula MR (1997), Plasma protein fractionation with advanced membrane adsorbents, *Biotechnol Bioeng*, 54, 181-187.
Gebauer KH, Thoemmes J, Kula MR (1997), Breakthrough performance of high-capacity membrane adsorbents in protein chromatography, *Chem Eng Science*, 52, 405-419.

Monoclonal antibody purification

Monoclonal Antibody Concentration with the S100 Strongly Acidic Cation Exchanger

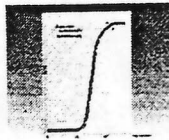
CONDITIONS:

Protein: Mouse/Mouse IgG1
Initial concentration: 0.04 mg/ml
Loading buffer: 25 mM MES, pH 5.9-A
Application mode: Adsorption / Desorption
MA unit: S100 (connected to peristaltic pump)
Washing buffer: A
Elution: A + 250 mM KCl

pI: 7.4
Volume: 3000 ml
Flow rate: 100 ml/min unit
Volume: 30 ml
Volume: 10 ml

RESULTS:	Before Sartobind MA	After Sartobind MA	Evaluation
Volume (ml)	3000	10	99.7% volume reduction
Concentration (mg/ml)	0.04	12	300 fold concentration
Protein (mg)	120	120	100% recovery

Total time needed: 35-38 minutes



Since dynamic binding capacities are directly proportional to membrane area, scale up from mg to 2 kg scale is easy to achieve. Sartobind units can be cleaned, regenerated, reprogrammed and stored using 1% NaOH and 1M HCl.

www.sartorius.com

Kinetic analysis of elution

→ At the initial stages of desorption (under elution conditions):

- the forward reaction can be neglected and $q \rightarrow q^*$

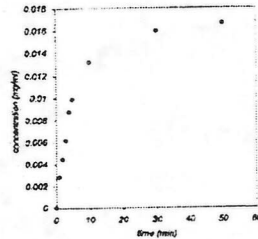
$$\frac{dq}{dt} = -k_2 q^*$$

$$\frac{dq}{dt} = -k_2 q^*$$

Fitting the elution data to the kinetic model:

$$k_2 = 2.4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$k_2 = k_2$$



Characteristic times of membrane-based affinity purification

Parameter		
Diffusion coefficient D		$5.4 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$
Tube radius r_p		12.5 μm
Volume of liquid within the pores V_{int}		8.25 mL
Flow rate Q		0.2 mL/s
Total external area A		1000 cm^2
Maximum binding capacity q_m		0.015 mg/cm ²
Forward reaction kinetic constant k_1		0.01 mL/(mg $\cdot$ s)
Surface degree of coverage θ		0
Characteristic times		
Time for protein diffusion within the pores	$t_p = r_p^2/D$	2.9 s
Binding reaction time	$t_b = V_{\text{int}}/(A k_1 q_m (1-\theta))$	459 s
Interaction time	$t_i = t_p + t_b$	462 s
Residence time	$t_r = V_{\text{int}}/Q$	41.2 s

Conclusion: larger membrane areas or lower flow rates should be employed, since for efficient adsorbate capture $t_i \ll t_r$

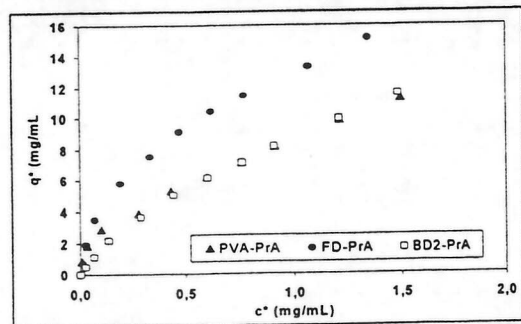
ti tiempos de interacción

Affinity membranes vs. affinity resins: processing times

Table 1

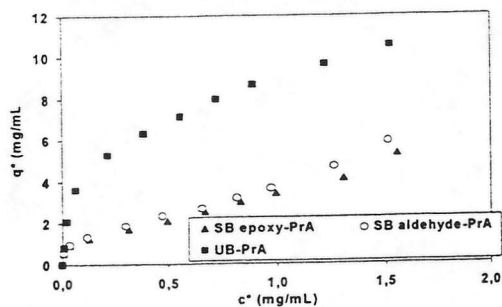
(a) Geometrical Features		
	affinity resins	affinity membranes
internal diam.	2.5 cm	5 cm
column height	10 cm	12 cm
liquid internal vol.	25 mL	50 mL
total membrane area		1000 cm ²
(b) Operative Conditions Maintained during the Separation Process of MBP-Fusion Proteins from Cell Lysate for a System Based on the Use of Affinity Resins and a System Based on the Use of Affinity Membranes		
	affinity resins	affinity membranes
Adsorption		
flow rate	1 mL/min	12 mL/min
adsorption time	several hours	40 - 80 min
Washing		
flow rate	1 mL/min	25 - 35 mL/min
vol. applied	12 column vol.	1.5 - 2.5 column vol.
washing time	5 h	30 - 45 min
Elution		
flow rate	1 mL/min	6 mL/min
vol. applied	2 - 4 column vol.	1.5 column vol.
elution time	2 h	15 min

Protein A (PrA) immobilized onto nylon membranes coated with hydrophilic polymers



Adsorption conditions: 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4

Protein A immobilized onto commercial pre-activated membranes



Adsorption conditions: 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4

Overview of thermodynamic parameters

Affinity membrane	Association constant ¹ (M ⁻¹)	IgG binding capacity ¹ (mg mL ⁻¹)
IDA:Zn ⁺² - BD2	2.4 x 10 ⁵	4.5
Thiophilic - BD2	1.5 x 10 ⁵	6.1
L-histidine - PVA	—	—
TG19318 - UB	3.0 x 10 ⁵	3.9
PrA - BD2	3.3 x 10 ⁵	8.1
PrA - UB	2.1 x 10 ⁶	6.6
PrA - SB aldehyde	2.5 x 10 ⁶	2.1
PrA - SB epoxy	3.0 x 10 ⁶	1.9

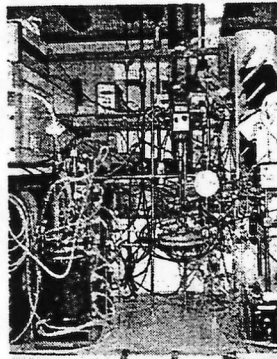
¹Values calculated by fitting data to multilayer Langmuir isotherm model:



Integrated perfusion/purification process

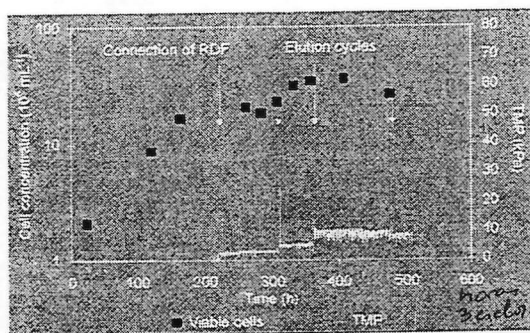
Experimental conditions:

- recombinant CHO-3D6 cell line, producing a human anti-HIV IgG
- protein-free culture medium (SMIF-6) with 0.1% Pluronic F68
- Protein A - Sartobind epoxy affinity membranes (257 cm² = 7 mL)



Filter + Bioreactor

Integrated perfusion/purification process

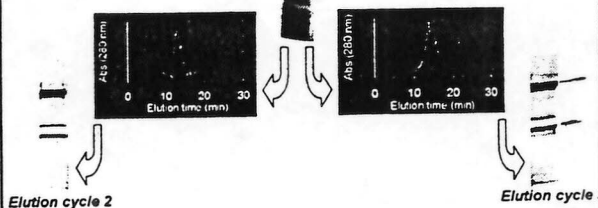


Integrated perfusion/purification process

→ Evaluation of purity of eluates

Bioreactor sample

* silver-stained SDS-PAGE gels carried out under reducing conditions



Carrilho LR, Anspach FB, Deckwer WD (2002). An integrated process for mammalian cell perfusion cultivation and product purification using a dynamic filter. *Biotechnol. Prog.* 18, 776-781.