



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Proyecto de Título

EVALUACIÓN DE LA FACTIBILIDAD TÉCNICO-ECONÓMICA DE  
UNA PLANTA DE PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN ALFA  
BOVINO RECOMBINANTE (rBoIFN- $\alpha$ )

Alumnos: Tomás Carvajal

Nayadet Rodríguez

Profesores Guías: Claudia Altamirano

Julio Berríos

Septiembre, 2017

En primer lugar me gustaría agradecer a nuestros profesores guías Claudia Altamirano y Julio Berrios quienes nos guiaron por este camino, entregándonos su apoyo, aconsejándonos y brindándonos confianza para poder desarrollar un trabajo de tal magnitud y tan importante en nuestras carreras.

Me gustaría agradecer especialmente a mi compañero en esta travesía Tomás Carvajal, quien más que un compañero de trabajo es uno de mis mejores amigos. Gracias por demostrar día a día tu compromiso con esta tarea, por la motivación para salir adelante a pesar de las adversidades y por tu apoyo incondicional.

Siento que se cierra uno de los ciclos más bonitos que he vivido hasta ahora, todo gracias a las personas que se cruzaron en mi camino durante esta carrera. Es por esto que quiero agradecer a mis compañeros y amigos de la generación ICB 2010, por la alegría y los buenos momentos a través de todos estos años.

A mis amigos del alma, quienes fuera de la Universidad me han apoyado y acompañado en todo momento, Rulo, Lilo, Caro y Ale, gracias por escucharme, entenderme, aconsejarme, por entregarme momentos de alegría y diversión, gracias por ser la familia que yo elegí.

De manera especial quiero dar gracias a Dios porque en él siempre he encontrado refugio y fortaleza. A mis padres, quienes me han demostrado su apoyo y amor incondicional, ustedes han sido el impulso que siempre he necesitado para salir adelante, son la mayor bendición que tengo en mi vida, y agradezco a Dios todos los días por tenerlos como mis padres. A mis hermanas que siempre encuentran una manera de hacerme reír y con quienes puedo ser completamente yo. A mi hermoso sobrino, que desde que llegó a mi vida ha sido la razón por la que sonrío todos los días pase lo que pase. Los amo familia.

Gracias,

Nani.

Gracias...

En primer lugar a mis profesores Claudia y Julio, por su apoyo, confianza y enseñanzas durante este proceso.

A mi familia, por ser mi fuente inagotable de amor, apoyo, y consejos.

A mi pareja Catalina y a mi Botitas, por ser mi inspiración y alegría día a día.

A mi compañera Náyadet, por compartir conmigo este proyecto, y muchos años de muy buena amistad.

A mis amigos de Rim Job Fight Club, porque son lo más chévere que me regaló la Universidad.

Al BMX y mis amigos, porque sin sus retos y enseñanzas no hubiera sido lo mismo terminar este proyecto.

A mis seres queridos que ya no están, porque día a día su recuerdo y energía los canalizo para perseverar en mis metas.

Y finalmente, a mi gatina Tania, por ser mi compañera más fiel durante todas esas horas solitarias de encierro, estudio, y reflexión.

Tommy.

## RESUMEN

Los interferones bovinos (BoIFN) son proteínas sintetizadas por células eucariotas en respuesta a virus y otros estímulos antigénicos; actuando como primera línea de defensa del organismo contra infecciones virales.

El mercado de los BoIFN aún se encuentra aún poco explorado, siendo el uso más común de manera terapéutica como complemento para tratar infecciones virales que ya han sido adquiridas por el animal. En este proyecto se propone el uso del BoIFN de manera preventiva, como adyuvantes de vacunas antivirales, que ayuden a potenciar la respuesta inmune en el animal. Si bien la proteína recombinante rBoIFN- $\alpha$  no es comercializada actualmente con fines terapéuticos, un factor importante a considerar son los grandes volúmenes de vacunas que se producen anualmente para llevar a cabo los planes de control de enfermedades en la industria pecuaria, y por ello, el plantear como alternativa la incorporación del BoIFN en la elaboración de las mismas, resulta económicamente atractivo. A partir de un estudio de mercado se optó por abarcar un 10% del mercado, resultando en la necesidad de producir 25 [kg] de rBoIFN- $\alpha$  al año.

El proceso de producción de rBoIFN- $\alpha$  evaluado en este proyecto contempla dos métodos de producción por medio de dos sistemas microbiológicos: *Escherichia Coli* y *Pichia pastoris*. Para el caso de *E. coli* se realiza un cultivo por lote alimentado (CLA), induciendo la producción de la proteína con lactosa, y para el caso de *P. pastoris* también se realiza un CLA, pero induciendo la producción con metanol. La recuperación y purificación en ambos procesos es similar, difiriendo sólo en la recuperación ya que el cultivo con *E. coli* debe ser homogeneizado y centrifugado dos veces debido a que la proteína se encuentra intracelularmente, a diferencia de *P. pastoris* que la secreta al medio. La purificación de la proteína comprende operaciones de cromatografía y ultrafiltración dando como resultado un producto de alta pureza, en ambos casos mayores al 97%.

Si bien las dimensiones de ambos proyectos difieren, siendo mayor para el caso de una planta productora de BoIFN- $\alpha$  con *P. pastoris*, a partir de la evaluación económica se determinó que resulta ser más rentable la producción llevada a cabo en *E. coli*, logrando una TIR de 272%, que es mucho mayor a la tasa de retorno mínima aceptable (TRMA) de 15% dada por los inversionistas, y un VAN de 973.295,74 [UF] versus un TIR de 69% y un VAN de 427.869,36 [UF] en el caso de la producción en *P. pastoris*.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1 .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	2
1.3 SISTEMAS DE PRODUCCIÓN BIOLÓGICOS DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	3
1.3.1 Sistemas de Expresión Bacterianos .....	3
1.3.2 Sistemas de Expresión Eucariontes: Levaduras .....	5
1.4 INTERFERÓN ALFA BOVINO RECOMBINANTE (rBoIFN- $\alpha$ ).....	6
1.4.1 Tratamiento de Cuadros Virales en Respuesta al Uso de IFN .....	9
1.5 ADYUVANTES .....	11
1.5.1 Adyuvantes Particulados .....	12
1.5.2 Adyuvantes No Particulados.....	13
1.6 PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN ALFA BOVINO EN SISTEMAS HETERÓLOGOS ....	15
1.6.1 Producción de rBoIFN- $\alpha$ en <i>Escherichia coli</i> .....	15
1.6.2 Producción de rBoIFN- $\alpha$ en <i>Pichia pastoris</i> .....	17
1.6.3 Modalidades de Cultivo .....	17
1.6.4 Mejoras y Optimizaciones para la Producción de rBoIFN- $\alpha$ .....	21
1.7 OBJETIVOS .....	25
1.7.1 Objetivo general .....	25
1.7.2 Objetivos específicos.....	25
1.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 1 .....	26
CAPÍTULO 2 .....	34
ESTUDIO DE MERCADO, CAPACIDAD Y UBICACIÓN DE LA PLANTA.....	34
2.1 DEFINICIÓN DEL PRODUCTO Y ADYUVANTES.....	34
2.2 ANÁLISIS DE LA OFERTA .....	36
2.2.1 Contexto nacional.....	36
2.2.2 Contexto internacional.....	40
2.3 ANÁLISIS DE LA DEMANDA .....	41
2.3.1 Situación sanitaria animal nacional .....	41
2.3.2 Situación sanitaria en América Latina .....	43
2.4 CAPACIDAD Y UBICACIÓN DE LA PLANTA .....	52
2.4.1 Proyección Optimista.....	53
2.4.2 Proyección Realista.....	55
2.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 2 .....	59
CAPÍTULO 3 .....	63
SÍNTESIS Y SELECCIÓN DE PROCESOS.....	63

3.1 ETAPAS PREVIAS A LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	63
3.1.1 Preparación y propagación del inóculo.....	63
3.1.2 Preparación medio de cultivo .....	66
3.2 PRODUCCION DE PROTEÍNA RECOMBINANTE rBoIFN- $\alpha$ .....	68
3.2.1 Producción de Proteína Recombinante rBoIFN- $\alpha$ en <i>Escherichia coli</i> .....	68
3.2.2 Producción de Proteína Recombinante rBoIFN- $\alpha$ en <i>Pichia pastoris</i> .....	71
3.3 RECUPERACIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE rBoIFN- $\alpha$ .....	75
3.3.1 Recuperación de Proteína Recombinante en <i>Escherichia coli</i> .....	75
3.3.2 Recuperación de Proteína Recombinante en <i>Pichia pastoris</i> .....	77
3.4 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE rBIFN- $\alpha$ .....	77
3.4.1 Concentración por Ultrafiltración .....	77
3.4.2 Separación por Cromatografía .....	77
3.5 RENDIMIENTOS DE PROCESO DE PURIFICACIÓN.....	80
3.6 FORMULACION FINAL DE PROTEÍNA RECOMBINANTE rBoIFN- $\alpha$ .....	80
3.7 ESQUEMA DE PRODUCCIÓN DE rBoIFN- $\alpha$ .....	83
3.7.1 Esquema de Producción de rBoIFN- $\alpha$ en <i>Escherichia Coli</i> .....	83
3.7.2 Esquema de Producción de rBoIFN- $\alpha$ en <i>Pichia pastoris</i> .....	84
3.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 3 .....	85
CAPÍTULO 4 .....	92
BALANCE DE MATERIA Y ENERGÍA .....	92
4.1 BALANCE DE MATERIA Y ENERGÍA <i>P. pastoris</i> .....	92
4.1.1 Diagrama de Flujos .....	92
4.1.2 Etapa de Pretatamiento.....	94
4.1.4 Etapa de Fermentación en <i>P. pastoris</i> .....	109
4.1.5 Etapa de Recuperación y Purificación.....	134
4.1.6 Etapa de Formulación Final.....	143
4.2 BALANCE DE MATERIA Y ENERGÍA EN PROCESO DE PRODUCCIÓN CON <i>E. coli</i> 145	
4.2.1 Medio de cultivo.....	147
4.2.2 Etapas de fermentaciones en <i>E. coli</i> .....	153
4.2.3 Demanda y transferencia de oxígeno (aireación).....	163
4.2.4 Balance de energía y potencia para el proceso de producción con <i>E. coli</i> .....	164
4.2.5 Centrifugación (C-1).....	164
4.2.6 Homogenización (HO-1).....	166
4.2.7 Centrifugación 2 (C-2) .....	170
4.2.8 Cromatografía de intercambio iónico (C-IA) .....	172
4.2.9 Unidad de ultrafiltración (UF-1).....	176
4.2.10 Cromatografía de exclusión molecular (C-EM).....	177
4.2.11 Rendimiento global del proceso de recuperación y purificación .....	179

4.2.12 Resumen de los flujos más relevantes en <i>E. coli</i> .....	179
4.3 REFERENCIAS CAPÍTULO 4 .....	180
CAPÍTULO 5 .....	182
DISEÑO Y SELECCIÓN DE EQUIPOS .....	182
5.1 FERMENTADORES .....	182
5.2 CENTRIFUGACIÓN .....	197
5.3 HOMOGENIZADOR (HO-1) .....	199
5.4 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO (C-IA) .....	199
5.4.1 Cromatografía de intercambio iónico de <i>P. pastoris</i> .....	199
5.4.2 Cromatografía de intercambio iónico <i>E. coli</i> .....	207
5.5 ULTRAFILTRACIÓN (UF-1) .....	209
5.5.1 Ultrafiltración <i>Pichia pastoris</i> .....	209
5.5.2 Ultrafiltración <i>Escherichia coli</i> .....	212
5.6 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (C-EM) .....	213
5.6.1 Cromatografía <i>Pichia pastoris</i> .....	213
5.6.2 Cromatografía de Exclusión Molecular <i>Escherichia coli</i> .....	216
5.6.3 Sistema Cromatográfico EM .....	218
5.6.4 Resumen etapa de purificación .....	218
5.7 ESTANQUES .....	219
5.7.1 Estanques de medio de cultivo .....	221
5.7.2 Estanques de buffer .....	221
5.7.3 Estanques de retención y almacenamiento de agua .....	222
5.7.4 Requerimientos de Agitación .....	223
5.8 EQUIPOS AUXILIARES .....	225
5.8.1 Sistema de purificación de agua .....	225
5.8.2 Caldera .....	227
5.8.3 Bombas .....	228
5.9 FORMULACIÓN Y ENVASADO .....	234
5.10 MICROFILTROS DE ESTERILIZACIÓN DE MEDIOS .....	235
5.11 CONSUMO ANUAL HÍDRICO Y ENERGÉTICO .....	236
5.11 REFERENCIAS CAPÍTULO 5 .....	237
CAPÍTULO 6 .....	239
ADMINISTRACIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LA PLANTA .....	239
6.1 ORGANIZACIÓN DE LA PLANTA PRODUCTORA DE rBoIFN- $\alpha$ .....	239
6.1.1 Descripción de las funciones de los Departamentos de la Planta .....	240
6.2 ORGANIZACIÓN DEL PERSONAL DE LA PLANTA .....	242
6.2.1 Cargos del área administrativa .....	242
6.2.2 Requerimientos de personal .....	243

6.2.3 Jerarquía de cargos.....	245
6.2.4 Jornadas de trabajo.....	246
6.3 PLANIFICACIÓN DE LAS TAREAS DE PRODUCCIÓN.....	248
6.3.1 Plan de producción en <i>Escherichia coli</i> .....	248
6.3.2 Plan de producción en <i>Pichia pastoris</i> .....	250
6.4 ORGANIZACIÓN DE LA PLANTA.....	250
6.4.1 Diseño de las instalaciones.....	251
6.4.2 Layout de la planta.....	252
6.5 REFERENCIAS CAPÍTULO 6.....	255
CAPITULO 7.....	257
EVALUACIÓN ECONÓMICA.....	257
7.1 CAPITAL DE INVERSIÓN O COSTOS DE CAPITAL (CC).....	257
7.2 COSTO TOTAL DE PRODUCCIÓN (CP).....	271
7.2.1 Costos de Manufactura.....	271
7.2.2 Gastos Generales.....	282
7.3 INGRESOS.....	285
7.4 FLUJO DE CAJA.....	287
7.5 RENTABILIDAD DEL PROYECTO.....	287
7.5.1 Rentabilidad del proyecto para la producción rBoIFN- $\alpha$ en <i>P. pastoris</i> .....	291
7.5.2 Rentabilidad del proyecto para la producción a rBoIFN- $\alpha$ en <i>E. coli</i> .....	293
7.6 REFERENCIAS CAPÍTULO 7.....	299
CAPITULO 8.....	296
CONCLUSIONES.....	296
APÉNDICES.....	305



# ÍNDICE DE FIGURAS

## Capítulo 1

Figura 1.1: Elementos de control del sistema pET.....	5
Figura 1.2: Mecanismo de acción del interferón.....	8
Figura 1.3: Mecanismo de la acción del IFN. ....	9

## Capítulo 2

Figura 2.1: Monto de las exportaciones chilenas de vacunas de uso veterinario para el período 2012-2015.....	37
Figura 2.2: Importaciones chilenas de vacunas de uso veterinario período 2012-2015.....	40
Figura 2.3: Dosis de vacunas bovinas producidas por países latinoamericanos período 2013-2014. ....	45
Figura 2.4: Inventario bovino total de los países en estudio. ....	46
Figura 2.5: Escenario optimista del ganado bovino para 2026. ....	53
Figura 2.6: Escenario realista del ganado bovino para 2026. ....	55

## Capítulo 3

Figura 3.1: Esquema de producción de rBoIFN-a en <i>Escherichia coli</i> .....	83
Figura 3. 2: Esquema de producción de rBoIFN-a en <i>Pichia pastoris</i> .....	84

## Capítulo 4

Figura 4.1: Diagrama de flujo del proceso de <i>P. pastoris</i> . ....	93
Figura 4.2: Corrientes involucradas en estanque (E-2) de medio BSM <i>P. pastoris</i> . ....	100
Figura 4.3: Corrientes involucradas en estanque (E-3) de medio BSM <i>P. pastoris</i> . ....	102
Figura 4.4: Corrientes involucradas en estanque (E-4) de glicerol en <i>P. pastoris</i> . ....	103
Figura 4.5: Corrientes involucradas en estanque (E-5) de metanol en <i>P. pastoris</i> . ....	103
Figura 4.6: Esquema de propagación en <i>P. pastoris</i> . ....	110
Figura 4.7: Corrientes involucradas en el biorreactor 1 (FP1) en <i>P. pastoris</i> .....	111
Figura 4.8: Corrientes involucradas en el biorreactor 2 (FP2) en <i>P. pastoris</i> .....	112
Figura 4. 9: Corrientes involucradas en el biorreactor 3 (FU <sub>lote</sub> ) en toda la etapa de producción en <i>P. pastoris</i> . ....	116
Figura 4.10: Comportamiento de la biomasa en FU <sub>cla1</sub> en <i>P. pastoris</i> .....	121
Figura 4.11: Variación del flujo de alimentación en FU <sub>cla1</sub> en <i>P. pastoris</i> .....	121
Figura 4.12: Comportamiento de la de biomasa y producto en FU <sub>cla2</sub> en <i>P. pastoris</i> . ....	123
Figura 4.13: Variación del flujo de alimentación en FU <sub>cla2</sub> en <i>P. pastoris</i> .....	123
Figura 4.14: Corrientes asociadas a la centrífuga C-1 en <i>P. pastoris</i> . ....	135
Figura 4.15: Corrientes involucradas en la unidad cromatográfica C-IA en <i>P. pastoris</i> . ....	137
Figura 4.16: Corrientes asociadas a la etapa de ultrafiltración (UF-1) en <i>P. pastoris</i> . ....	139

Figura 4.17: Corrientes involucradas en la unidad cromatográfica C-EM en <i>P. pastoris</i> .	141
Figura 4.18: Diagrama de flujos del proceso de <i>E. coli</i> .	146
Figura 4.19: Corrientes involucradas en estanque de medio de cultivo (E-2) en <i>E.coli</i> .	150
Figura 4.20: Corrientes involucradas en estanque de medio de alimentación (E-3) en <i>E.coli</i> .	151
Figura 4.21: Corrientes involucradas en estanque de lactosa (E-4) en <i>E.coli</i> .	153
Figura 4.22: Diagrama de etapas de fermentación en <i>E. coli</i> .	154
Figura 4.23: Cinética de fermentación en cultivos por lote (propagación) de <i>E. coli</i> .	156
Figura 4.24: Corrientes asociadas a la fermentación de propagación (FP1) en <i>E. coli</i> .	156
Figura 4.25: Corrientes asociadas a la fermentación de propagación (FP2) en <i>E. coli</i> .	158
Figura 4.26: Corrientes de la fermentación de producción ( $FU_{lote}$ y $FU_{CLA}$ ) en <i>E. coli</i> .	159
Figura 4.27: Variación del flujo de alimentación en el tiempo en $FU_{cla}$ en <i>E. coli</i> .	162
Figura 4.28: Corrientes involucradas en la primera centrífuga C-1 en <i>E. coli</i> .	165
Figura 4.29: Corrientes involucradas en el estanque E-5 para <i>E. coli</i> .	167
Figura 4.30: Corrientes asociadas al homogenizador HO-1 en <i>E. coli</i> .	168
Figura 4.31: Corrientes asociadas al estanque E-6 de buffer en <i>E. coli</i> .	171
Figura 4.32: Corrientes asociadas a la segunda centrífuga C-2 en <i>E. coli</i> .	172
Figura 4.33: Corrientes asociadas al estanque de buffer E-7 en <i>E. coli</i> .	173
Figura 4.34: Corrientes asociadas a la unidad cromatográfica C-IA en <i>E. coli</i> .	174
Figura 4.35: Corrientes asociadas al equipo de ultrafiltración UF-1 en <i>E. coli</i> .	176
Figura 4.36: Corrientes asociadas a la unidad cromatográfica C-EM en <i>E. coli</i> .	178

## Capítulo 5

Figura 5.1: Parámetros geométricos de un fermentador.	182
Figura 5.2: Sistemas de intercambio de calor en fermentadores.	193
Figura 5.3: Columna cromatográfica vacía (VERDOT Ips <sup>2</sup> EasyPack®).	204
Figura 5.4: Skid para una columna cromatográfica.	207
Figura 5.5: Sistema cromatográfico FlexiPro™ para <i>E. coli</i> .	209
Figura 5.6: Equipos Pellicon.	212
Figura 5.7: Skid cromatográfico de cromatografía de exclusión molecular.	218
Figura 5.8: Esquema de diseño de mezcladores.	220
Figura 5.9: Sistema de purificación de agua Milli-Q® Integral.	226

## Capítulo 6

Figura 6.1: Estructura organizacional de la planta.	240
Figura 6.2: Diagrama jerárquico de la planta.	246
Figura 6.3: Carta Gantt del proceso en <i>E.coli</i> .	249
Figura 6.4: Carta Gantt del proceso en <i>P. pastoris</i> .	250
Figura 6.5: Plano de Arquitectura de la planta de producción en <i>E. coli</i> .	254

## Capítulo 7

Figura 7.1: Payback del proyecto, producción de rBoIFN- $\alpha$ en <i>P. pastoris</i> .....	291
Figura 7.2: Variación del VAN con respecto a la TRMA, producción de rBoIFN- $\alpha$ en <i>P. pastoris</i> .....	292
Figura 7.3: Análisis del TIR en el periodo de 10 años para la producción de rBoIFN- $\alpha$ en <i>P. pastoris</i> .....	292
Figura 7.4: Payback del proyecto, producción de rBoIFN- $\alpha$ en <i>E. coli</i> .....	293
Figura 7.5: Variación del VAN con respecto a la TRMA, producción de rBoIFN- $\alpha$ en <i>E. coli</i> .....	294
Figura 7.6: Análisis del TIR en el periodo de 10 años para la producción de rBoIFN- $\alpha$ en <i>E. coli</i> .....	294
Figura 7. 7: Análisis de sensibilidad para una variación del 50% en el precio de la materia prima en proceso de producción con <i>P. pastoris</i> .....	296
Figura 7. 8: Análisis de sensibilidad para una variación del 50% en el precio de venta de la proteína rBoIFN- $\alpha$ en proceso productivo con <i>P. pastoris</i> . .....	297
Figura 7.9: Análisis de sensibilidad para una variación del 50% en el precio de la materia prima en proceso de producción con <i>E.coli</i> .....	298
Figura 7.10: Análisis de sensibilidad para una variación del 50% en el precio de venta de la proteína rBoIFN- $\alpha$ en proceso productivo con <i>E. coli</i> .....	299

## ÍNDICE DE TABLAS

### Capítulo 1

Tabla 1.1: Resultados para cultivos CLA con metanol de <i>P. pastoris</i> Mut <sup>+</sup> GS115 productora de interferón. ....	20
---	----

### Capítulo 2

Tabla 2.1: Principales países importadores de vacunas veterinarias producidas en Chile. ....	39
Tabla 2.2: Enfermedades de denuncia obligatoria para bovinos en Chile. ....	42
Tabla 2.3: Resumen de las enfermedades de la lista de la OIE presentes en Chile para 2014. ..	43
Tabla 2.4: Enfermedades de denuncia obligatoria según la OIE para bovinos, 2016. ....	44
Tabla 2.5: Porcentajes de bovinos vacunados por enfermedad en la última década en América Latina. ....	51
Tabla 2.6: Animales vacunados para cada enfermedad y en total al año.....	54
Tabla 2.7: Proyección a 10 años en la producción de interferón.....	55
Tabla 2.8: Animales vacunados para cada enfermedad y en total al año.....	56
Tabla 2.9: Proyección a 10 años en la producción de interferón.....	56
Tabla 2.10: Determinación de la ubicación de la planta.....	58

### Capítulo 3

Tabla 3.1: Características del medio Q-Sepharose fast flow.....	79
---	----

Tabla 3.2: Proceso de purificación de rHuIFN- $\alpha$ 2b desde <i>P. pastoris</i> .	80
Tabla 3.3: Formulación de Interferón humano alfa 2b.	82

## Capítulo 4

Tabla 4.1: Composición química de levaduras.	95
Tabla 4. 2: Concentración de biomasa esperada y volumen de las etapas de fermentación en <i>P. pastoris</i> .	96
Tabla 4.3: Composición del medio de cultivo BSM para <i>P. pastoris</i> .	97
Tabla 4.4: Composición de las fuentes de carbono para las fermentaciones de <i>P. pastoris</i> .	97
Tabla 4.5: Composición del medio de sales traza PTM1 para <i>P. pastoris</i> .	98
Tabla 4.6: Composición de los medios de alimentación al CLA para <i>P. pastoris</i> .	98
Tabla 4.7: Masa de compuestos por cada etapa de fermentación en <i>P.pastoris</i> .	99
Tabla 4.8: Propiedades y volumen de agua utilizado para preparar el medio BSM de <i>P. pastoris</i> .	100
Tabla 4.9: Balance de masa al estanque (E-2) de medio BSM de <i>P. pastoris</i> .	101
Tabla 4.10: Propiedades y volumen de agua utilizado para preparar el medio PTM1 de <i>P. pastoris</i> .	101
Tabla 4.11: Balance de masa al estanque (E-3) de medio PTM1 de <i>P. pastoris</i> .	102
Tabla 4.12: Propiedades y volumen de agua utilizado para preparar medios de alimentación al CLA de <i>P. pastoris</i> .	102
Tabla 4.13: Balance de masa al estanque (E-4) de medio de alimentación con glicerol de <i>P. pastoris</i> .	103
Tabla 4.14: Balance de masa al estanque (E-5) de medio de alimentación con metanol de <i>P. pastoris</i> .	103
Tabla 4.15: Tiempos de esterilización de cada fermentador para <i>P. pastoris</i> .	105
Tabla 4.16: Requerimientos de vapor para esterilización de reactores en <i>P. pastoris</i> .	108
Tabla 4.17: Condiciones de fermentación de las etapas de propagación en FP1 y FP2 con <i>P. pastoris</i> .	111
Tabla 4.18: Balance de masa a FP1 en <i>P. pastoris</i> .	113
Tabla 4.19: Balance de masa a FP2 en <i>P. pastoris</i> .	113
Tabla 4.20: Balance de masa a FU <sub>lote</sub> en <i>P. pastoris</i> .	117
Tabla 4.21: Condiciones de fermentación del cultivo por lote en FU <sub>lote</sub> .	118
Tabla 4.22: Balance de masa a FU <sub>cla1</sub> en <i>P. pastoris</i> .	119
Tabla 4.23: Condiciones de fermetación en FU <sub>cla1</sub> alimentado exponencial con glicerol en <i>P. pastoris</i> .	122
Tabla 4.24: Balance de masa a FU <sub>cla2</sub> en <i>P. pastoris</i> .	122
Tabla 4.25: Condiciones de fermetación en FU <sub>cla2</sub> alimentado exponencial con metanol en <i>P. pastoris</i> .	124
Tabla 4.26: Parámetros para la transferencia de O <sub>2</sub> en <i>P. pastoris</i> .	125
Tabla 4.27: Resultados de la demanda y transferencia de oxígeno en <i>P. Pastoris</i> .	129
Tabla 4.28: Equipo de tranferencia de calor en fermentadores.	131

Tabla 4.29: Resultados del balance de energía <i>P. pastoris</i> .	134
Tabla 4.30: Composición de corrientes asociadas a la centrifuga 1 (C-1) en <i>P. pastoris</i> .	136
Tabla 4.31: Balance de masa al estanque de buffer (E-7) en <i>P. pastoris</i> .	137
Tabla 4.32: Cantidad y composición de soluciones buffer a utilizar en C-IA en <i>P. pastoris</i> .	138
Tabla 4.33: Balance de masa a la columna cromatográfica de intercambio iónico C-IA en <i>P. pastoris</i> .	139
Tabla 4.34: Balance de masa de equipo UF-1 en <i>P. pastoris</i> .	140
Tabla 4.35: Balance de masa cromatografía de exclusión molecular C-EM en <i>P. pastoris</i> .	142
Tabla 4.36: Resumen de composiciones de corrientes y balances de masa del sistema en <i>P. pastoris</i> .	144
Tabla 4.37: Volumen y concentración de biomasa en las etapas de fermentación en <i>E. coli</i> .	147
Tabla 4.38: Composición del medio de cultivo de <i>E. coli</i> .	148
Tabla 4.39: Masa de nutrientes por etapa de fermentación en <i>E. coli</i> .	149
Tabla 4.40: Propiedades y volumen de agua utilizado para preparar el medio de <i>E. coli</i> .	150
Tabla 4.41: Balance de masa al estanque de medio de cultivo (E-2) <i>E. coli</i> .	151
Tabla 4.42: Volumen de agua para diluir el medio de alimentación al CLA en <i>E. coli</i> .	151
Tabla 4.43: Balance de masa estanque de medio de alimentación (E-3) en <i>E. coli</i> .	152
Tabla 4.44: Balance de masa al estanque de lactosa (E-4) de <i>E. coli</i> .	153
Tabla 4.45: Tiempos de esterilización de cada fermentador y estanque para <i>E. coli</i> .	154
Tabla 4.46: Requerimientos de vapor para esterilización de reactores y medios en <i>E. coli</i> .	154
Tabla 4.47: Parámetros cinéticos de las etapas de propagación en <i>E. coli</i> .	155
Tabla 4.48: Balance de masa asociado a FP1 en <i>E. coli</i> .	158
Tabla 4.49: Balance de masa asociado a FP2 en <i>E. coli</i> .	159
Tabla 4.50: Balance de masa para la etapa FU <sub>LOTE</sub> en <i>E. coli</i> .	160
Tabla 4.51: Parámetros cinéticos de la fermentación de producción etapa por lote (FU <sub>LOTE</sub> ) en <i>E. coli</i> .	160
Tabla 4.52: Parámetros de diseño del CLA en <i>E. coli</i> .	161
Tabla 4.53: Condiciones finales del CLA en <i>E. coli</i> .	162
Tabla 4.54: Balance de masa de soluciones añadidas al CLA en <i>E. coli</i> .	163
Tabla 4.55: Resultados de transferencia de oxígeno para <i>E. coli</i> .	163
Tabla 4.56: Resultados balance de energía fermentadores <i>E. coli</i> .	164
Tabla 4.57: Balance de masa a la centrífuga C-1 en <i>E. coli</i> .	166
Tabla 4.58: Balance de masa al estanque de buffer E-5 en <i>E. coli</i> .	168
Tabla 4.59: Balance de masa para el equipo HO-1 en <i>E. coli</i> .	169
Tabla 4.60: Balance de masa para el estanque de mezclado E-6 en <i>E. coli</i> .	171
Tabla 4.61: Balance de masa para la segunda centrífuga (C-2) en <i>E. coli</i> .	172
Tabla 4.62: Balance de masa al estanque de mezcla E-7 en <i>E. coli</i> .	174
Tabla 4.63: Composición y cantidad de soluciones buffer a utilizar en la cromatografía de intercambio iónico en <i>E. coli</i> .	175
Tabla 4.64: Balance de masa a la cromatografía de intercambio iónico (C-IA) en <i>E. coli</i> .	175

Tabla 4.65: Balance de masa a la unidad de ultrafiltración UF-1 en <i>E. coli</i> .....	177
Tabla 4.66: Balance de masa cromatografía de exclusión molecular C-EM en <i>E. coli</i> .....	179
Tabla 4.67: Resumen de la composición de las corrientes del proceso en <i>E. coli</i> .....	180

## Capítulo 5

Tabla 5.1: Relaciones geométricas considerando turbina tipo Rushton .....	183
Tabla 5.2: Dimensiones de fermentadores <i>P. pastoris</i> . .....	185
Tabla 5.3: Dimensiones de fermentadores <i>E. coli</i> . .....	185
Tabla 5.4: Potencia de agitación fermentadores <i>P. pastoris</i> . .....	189
Tabla 5.5: Potencia de agitación fermentadores <i>E. coli</i> .....	189
Tabla 5.6: Características de los filtros de aire de los fermentadores para <i>P. pastoris</i> . .....	193
Tabla 5.7: Características de los filtros de aire de los fermentadores para <i>E. coli</i> .....	193
Tabla 5.8: Valores utilizados para el diseño de las tuberías del serpentín de FU en <i>P. pastoris</i> . .....	195
Tabla 5.9: Resultados del diseño de serpentín de enfriamiento para fermentador FU en <i>P. pastoris</i> .....	197
Tabla 5.10: Especificaciones técnicas de la centrifuga CLARA 20. ....	199
Tabla 5.11: Características del homogenizador (HO-1) Niro Soavi NS2006L/Pony para <i>E. coli</i> .199	
Tabla 5.12: Consideraciones prácticas para intercambio iónico.....	200
Tabla 5.13: Coeficientes de difusividad. ....	202
Tabla 5.14: Datos para el diseño de la columna de intercambio aniónico Q Sepharose Fast Flow.....	202
Tabla 5.15: Diámetros y características de las columnas VERDOT Ips <sup>2</sup> EasyPack®. ....	205
Tabla 5.16: Tabla comparativa de razones v/L. ....	205
Tabla 5.17: Columna cromatográfica de intercambio aniónico para <i>P. pastoris</i> . ....	205
Tabla 5.18: Diámetros y características de las columnas VERDKT Ips <sup>2</sup> EasyPack® para <i>E. coli</i> .208	
Tabla 5.19: Columna cromatográfica de intercambio aniónico para <i>E. coli</i> .....	208
Tabla 5.20: Características de cassette Pellicon® 2. ....	210
Tabla 5.21: Características módulo de ultrafiltración en <i>P. pastoris</i> . ....	212
Tabla 5.22: Características módulo de ultrafiltración en <i>E. coli</i> .....	213
Tabla 5.23: Consideraciones prácticas para cromatografía de exclusión molecular. ....	214
Tabla 5.24: Datos para el diseño de la columna de exclusión molecular Superdex™ 75 en <i>P. pastoris</i> .....	214
Tabla 5.25: Diámetros y características para columnas IsoPak® Merck en <i>P. pastoris</i> .....	215
Tabla 5.26: Tabla comparativa de razones v/L a distintas escalas. ....	215
Tabla 5.27: Columna cromatográfica de exclusión molecular para <i>P. pastoris</i> . ....	216
Tabla 5.28: Diámetros y características para columnas IsoPak® Merck en <i>E. coli</i> . ....	217
Tabla 5.29: Columna cromatográfica de exclusión molecular para <i>E. coli</i> .....	217
Tabla 5.30: Resumen de flujos en operaciones de recuperación y purificación en <i>P. pastoris</i> .219	
Tabla 5.31: Resumen de flujos en operaciones de recuperación y purificación en <i>E. coli</i> . ....	219

Tabla 5.32: Relaciones recomendadas. ....	220
Tabla 5.33: Dimensiones estanques de medio de cultivo y alimentación <i>E. coli</i> . ....	221
Tabla 5.34: Dimensiones estanques de medio de cultivo y alimentación <i>P. pastoris</i> . ....	221
Tabla 5.35: Dimensiones estanques de buffer en <i>E. coli</i> . ....	222
Tabla 5.36: Dimensiones estanques de buffer en <i>P. pastoris</i> . ....	222
Tabla 5.37: Dimensiones estanques de retención en <i>E. coli</i> . ....	222
Tabla 5.38: Dimensiones estanques de retención en <i>P. pastoris</i> . ....	223
Tabla 5.39: Condiciones de agitación y potencia para los estanques de <i>E. coli</i> y <i>P. pastoris</i> . ....	225
Tabla 5.40: Diseño de calderas. ....	227
Tabla 5.41: Cantidad de combustible para calderas. ....	228
Tabla 5.42: Transporte de fluidos que realizan las bombas. ....	229
Tabla 5.43: Largos equivalentes para diferentes accesorios del proceso. ....	230
Tabla 5.44: Accesorios y largo equivalente de B-1 en <i>P. pastoris</i> . ....	230
Tabla 5.45: Potencia requerida para las bombas de los procesos de <i>E. coli</i> y <i>P. pastoris</i> . ....	234
Tabla 5.46: Características de la cápsula de filtración Opticap® XL4 para <i>P. pastoris</i> . ....	235
Tabla 5.47: Tiempo de esterilización de soluciones de metanol en <i>P. pastoris</i> . ....	236
Tabla 5.48: Consumo anual de agua. ....	236
Tabla 5.49: Consumo anual energético. ....	237

## Capítulo 6

Tabla 6.1: Cargos de trabajo por Departamento. ....	242
Tabla 6.2: Puestos de trabajo y perfil técnico de acuerdo al cargo a ocupar. ....	245
Tabla 6.3: Tipos de horario para cada cargo en la planta. ....	247
Tabla 6.4: Horarios de cargos que operan por turnos. ....	247
Tabla 6.5: Superficie utilizada por los equipos del proceso en <i>E. coli</i> . ....	253
Tabla 6.6: Dimensiones de las instalaciones de la planta de <i>E. coli</i> . ....	253
Tabla 6.7: Superficie utilizada por los equipos del proceso en <i>P. pastoris</i> . ....	255

## Capítulo 7

Tabla 7.1: Indicadores económicos utilizados. ....	257
Tabla 7.2: Referencias de cotizaciones de terrenos de Sub-gerente de Kaufen Propiedades. ....	259
Tabla 7.3: Índices CEPCI para determinación de costos de equipos. ....	261
Tabla 7.4: Costos de instalación por equipo como porcentaje del costo equipo comprado. ....	262
Tabla 7.5: Costos de equipos para la producción de rBoIFN- $\alpha$ con <i>P. pastoris</i> . ....	264
Tabla 7.6: Continuación costos de los equipos para la producción de rBoIFN- $\alpha$ con <i>P. pastoris</i> .....	265
Tabla 7.7: Costos de los equipos para la producción de rBoIFN- $\alpha$ con <i>E. coli</i> . ....	266
Tabla 7.8: Continuación costos de los equipos para la producción de rBoIFN- $\alpha$ con <i>E. coli</i> . ....	267

Tabla 7.9: Porcentaje de costos entregado para el cálculo de costos por I&C, cañerías e instalaciones eléctricas. ....	268
Tabla 7.10: Resultados de los costos de capital fijo directo para proceso productivo con <i>P. pastoris</i> y <i>E. coli</i> .....	269
Tabla 7.11: Resumen los Gastos de Capital Fijo Indirecto. ....	270
Tabla 7.12: Resumen del Capital Total de Inversión.....	271
Tabla 7.13: Costos Materias Primas para la Producción de rBoIFN- $\alpha$ con <i>P. pastoris</i> . ....	272
Tabla 7.14: Continuación Costo Materias Primas Fermentación para la producción de rBoIFN- $\alpha$ con <i>P. pastoris</i> .....	273
Tabla 7.15: Costos Materias Primas para la Producción de rBoIFN- $\alpha$ con <i>E. coli</i> .....	274
Tabla 7.16: Continuación Costos Materias Primas para la Producción de rBoIFN- $\alpha$ con <i>E. coli</i> . .....	275
Tabla 7. 17: Costos Materias Primas para la Formulación de rBoIFN- $\alpha$ de <i>P. pastoris</i> .....	275
Tabla 7.18: Costos Materias Primas para la Formulación de rBoIFN- $\alpha$ de <i>E. coli</i> .....	275
Tabla 7.19: Costo de mano de obra para producción con <i>P. pastoris</i> y <i>E. coli</i> .....	277
Tabla 7.20: Requerimientos hídricos en proceso productivo de rBoIFN- $\alpha$ con <i>P. pastoris</i> .....	278
Tabla 7.21: Requerimientos hídricos en proceso productivo de rBoIFN- $\alpha$ con <i>E. coli</i> .....	279
Tabla 7.22: Costos de Agua en el Proceso Productivo con <i>P. pastoris</i> y <i>E. coli</i> .....	279
Tabla 7.23: Requerimientos Energéticos en proceso Productivo de rBoIFN- $\alpha$ con <i>P. pastoris</i> y <i>E. coli</i> .....	280
Tabla 7.24: Costos de Energía Eléctrica en el Proceso Productivo de rBoIFN- $\alpha$ con <i>P. pastoris</i> y <i>E. coli</i> .....	280
Tabla 7.25: Costo de combustible en el Proceso Productivo de rBoIFN- $\alpha$ con <i>P. pastoris</i> y <i>E. coli</i> . .....	281
Tabla 7.26: Resumen de Costos de Suministros Básicos en el Proceso Productivo con <i>P. pastoris</i> y <i>E. coli</i> .....	281
Tabla 7.27: Resumen de Costos de Manufactura de la Planta .....	282
Tabla 7.28: Resumen de costos generales de la planta .....	284
Tabla 7.29: Valores comerciales de vacunas para bovino .....	286
Tabla 7.30: Resultados principales del balance de masa para la capacidad de la planta .....	287
Tabla 7.31: Depreciación de los costos de edificación y equipos instalados. ....	289
Tabla 7. 32: Flujo dinero [UF] durante los 10 primeros años de operación de la planta productora de rBoIFN- $\alpha$ en <i>P. pastoris</i> . ....	290
Tabla 7.33: Flujo de dinero [UF] durante los 10 primeros años de operación de la planta productora de rBoIFN- $\alpha$ en <i>E. coli</i> . ....	290



# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una gran cantidad de enfermedades que afectan al ganado bovino, muchas de ellas ocasionan cuantiosas pérdidas en la industria, y se encuentra aún hoy en día, sin un tratamiento efectivo. Muchas de estas enfermedades adquieren relevancia a nivel de país puesto que afectan directamente el comercio exterior, y con ello, gran parte de las exportaciones/importaciones de los países involucrados. Esto ocurre porque según el tipo de enfermedad que se presente en determinado territorio, va a depender de si este país va a poder comercializar sus productos en otros mercados cuyas políticas de control sanitarias pudieran colisionar con la calidad del ganado.

Existe hoy en día en América Latina, especial interés por mantener ciertas enfermedades bajo control, sobre todo por las consecuencias que podrían tener en la salud humana. Enfermedades como la rabia, o la fiebre aftosa son de especial preocupación por el riesgo que implican en la salud de las personas. En la actualidad existen programas de erradicación en la mayoría de los países latinoamericanos, que han logrado disminuir las pérdidas y los riesgos que suscitan estas enfermedades. Entre las medidas mayormente adoptadas para el control de estas enfermedades se encuentra la vacunación masiva del ganado bovino. Es en este punto entonces donde nace la posibilidad de insertar en el mercado un producto innovador.

La cantidad de vacunas que se utilizan anualmente para llevar a cabo los planes de control de las enfermedades es considerable, y por ello, el plantear como alternativa la incorporación en la elaboración de las mismas la proteína interferón alfa bovino recombinante (rBoIFN- $\alpha$ ) parece económicamente atractivo.

Décadas atrás, el rBoIFN- $\alpha$  fue bastante estudiado por su capacidad de actuar frente a infecciones de todo tipo, pero más marcadamente, frente a infecciones virales. La actividad antiviral de éste interferón llevó a que se desarrollaran diversos estudios y patentes para tratar algunos tipos de virus que ocasionaban enfermedades en el ganado de diferentes especies. Los intentos no llegaron más allá debido a múltiples factores, entre otros, la falta de investigación que pudiera proporcionar un equilibrio entre rentabilidad y efectividad en el uso de los interferones. Las patentes fueron

abandonadas, y la investigación en torno a los interferones se dirigió con mayor fuerza al tratamiento de algunos tipos de cáncer en el ser humano, dejando de lado el gran potencial que tiene su función antiviral como primer mecanismo de defensa del organismo frente a una infección.

Una propuesta atractiva para retomar el desarrollo de la producción de esta proteína recombinante es utilizar el interferón como adyuvante para vacunas, esta idea no es del todo nueva. Se desarrollaron en el pasado patentes que utilizaron interferón para potenciar el efecto inmunológico de algunas vacunas utilizadas en diferentes especies de mamíferos. Sin embargo, su uso estuvo restringido principalmente a la administración por vía oral y en bajas dosis. En este proyecto se plantea una forma diferente e innovadora de utilizar el interferón como agregado a vacunas que son de uso frecuente, y están bien establecidas en mercados veterinarios.

## **1.2 PROTEÍNAS RECOMBINANTES**

Gracias al desarrollo de la ingeniería genética se han logrado sintetizar proteínas, que normalmente se encuentran en bajas concentraciones o no se producen, en organismos heterólogos (que no son los productores nativos) los cuales funcionan como verdaderos reactores biológicos (Drago & Sainz, 2006).

Es necesario identificar la secuencia de DNA desde un organismo donador para poder cortarla por medio de enzimas de restricción. Luego el fragmento es introducido en un vector de expresión, que puede ser un virus o un plásmido bacteriano para que de esta manera pueda ser incorporado a un sistema de expresión celular (Griffiths et al., 2000). El fragmento de ADN insertado en un organismo productor se denomina ADN recombinante, y el producto obtenido de la síntesis se denomina proteína recombinante.

En el ámbito de la producción de biofármacos el proceso de producción del mismo puede dividirse en tres etapas principales. La primera de ellas se denomina “upstream” que comprende la elaboración del vector de expresión y su posterior inserción en el sistema de expresión elegido, la preparación del medio de cultivo y de las condiciones de fermentación (cultivo). Luego, la etapa de producción propiamente tal por fermentación. Finalmente la etapa denominada “downstream” que comprende los procesos de recuperación, y purificación de la proteína ya sintetizada (Drago & Sainz, 2006).

### **1.3 SISTEMAS DE PRODUCCIÓN BIOLÓGICOS DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES**

Existen diversos sistemas biológicos de producción de proteínas recombinantes en la actualidad. Por un lado se tienen los sistemas de producción bacterianos, que son ampliamente utilizados en la industria debido a las altas productividades que se alcanzan y lo sencillo de su metabolismo. Por otro lado están las células eucariontes, más complejas, y que se subdividen en más grupos, en las que podemos encontrar diversos tipos de levaduras, hongos filamentosos, y sistemas aún más complejos como las células de insectos o las células mamíferas.

Para el fin de este proyecto los sistemas a estudiar son: la bacteria *Escherichia coli* y la levadura *Pichia pastoris*.

#### **1.3.1 Sistemas de Expresión Bacterianos**

El microorganismo más ampliamente utilizado en estos sistemas de expresión es *Escherichia coli*. Sin embargo, el problema de estos sistemas de expresión es la incapacidad de realizar modificaciones postraduccionales en una proteína (Lara, 2011). En el ámbito de la producción de fármacos esta carencia puede significar que la proteína pueda incluso perder su actividad biológica. A pesar de que muchos subtipos de IFN son glicosilados, en el caso de IFN- $\alpha$  recombinante no glicosilados obtenidos desde *E. coli* no parecen requerir ninguna modificación posterior a la traducción para tener actividad biológica completa, encontrándose igualmente activos en una serie de ensayos de comparación con sus homólogos.

Otro problema bastante común en el uso de sistemas de expresión por *E. coli* es la formación de cuerpos de inclusión (Demain & Vaishnav, 2009). La formación de estas estructuras se debe principalmente a la aparición de puentes disulfuro que no son propios de la proteína de interés y ocasionan plegamientos incorrectos, que generan muchas veces una proteína inactiva. Es necesario agregar agentes denaturantes y reductores para poder solubilizar y replegar estos cuerpos de inclusión con el fin de poder recuperar la actividad perdida.

Hasta el día de hoy *E. coli* sigue siendo el hospedero más utilizado debido a múltiples razones (Demain & Vaishnav, 2009); entre las cuales se pueden destacar el amplio conocimiento que se tiene sobre su genoma, lo que facilita la manipulación genética del mismo; su metabolismo es bien conocido; la existencia de múltiples vectores, ampliamente utilizados para la producción de proteínas recombinantes; y por último, la capacidad de crecer rápidamente en medios relativamente sencillos con altas

producciones de proteínas recombinantes. Estos son algunos de los motivos por los que *E. coli* resulta atractivo para sistemas de producción de proteínas recombinantes.

Generalmente la cepa BL21 de *E. Coli* es preferida en el ámbito industrial, específicamente la cepa BL21 (DE3). Esta cepa carece de las proteasas Lon (citoplasma) y OmpT (membrana externa), lo cual reduce considerablemente la degradación de la proteína recombinante, produce bajas cantidades de acetato (subproducto metabólico altamente indeseable) lo que resulta ampliamente atractivo. La designación DE3 significa que la respectiva cepa contiene  $\lambda$ DE3 (lisogen) que contiene el gen para la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5*. El promotor *lacUV5* es un promotor *lac* mutante (con una sustitución en la región -10), que es más potente que el promotor silvestre (*lac*), esta variante es reprimible por *LacI* e inducible por IPTG y lactosa, además este promotor es relativamente insensible a la regulación mediada por CAP en comparación con el promotor silvestre *lac* que para que haya expresión de genes además de que el represor no esté unido al operón *lac*, ha de haber un activador, éste es una proteína que se llama CAP (proteína activadora por catabolito), también llamada CRP (Proteína Receptora de cAMP), necesitando del complejo cAMP-CAP unido al promotor para comenzar la transcripción. Entonces, si los niveles de glucosa son bajos, los niveles de cAMP son altos, en ausencia de glucosa la proteína CAP se une con AMPc, y este complejo se une cerca del promotor, ayudando a la ARN polimerasa a comenzar la transcripción. Para el caso del promotor *lacUV5* el complejo cAMP-CAP unido al promotor no es necesario para que la RNA polimerasa se una al promotor e inicie la transcripción.

El gen de interés es clonado en un plásmido (uno de la serie de vectores pET) detrás del promotor T7 reconocido por la polimerasa RNA T7, que, en cambio, se encuentra inserta en la cepa huésped bajo control del promotor *lacUV5*. Por lo tanto, la polimerasa, controlada por el promotor *lac*, es inducible por IPTG y lactosa, una vez inducida, esta polimerasa altamente activa transcribe el gen objetivo, y se pueden obtener rendimientos de proteína recombinante que exceden el 50% de la proteína celular total. Esta actividad es tan eficiente, que interfiere con la producción de las proteínas esenciales y es eventualmente tóxica para la célula (Novagen, 2006). La Figura 1.1 muestra el hospedero y los elementos del vector que se encuentran disponibles para el control de los niveles de T7 RNA polimerasa y la subsecuente transcripción de un gen objetivo clonado en un vector pET.

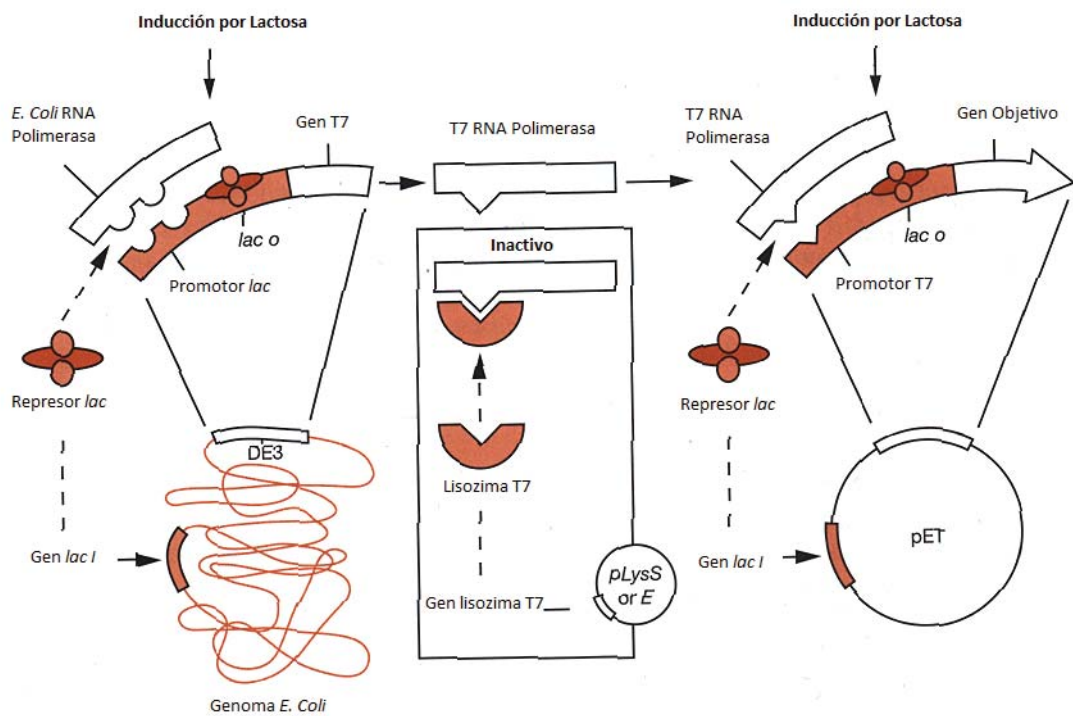


Figura 1.1: Elementos de control del sistema pET. Copyright de Novagen, Inc.

En  $\lambda$  DE3 lisogenes (lysogens), el gen de la T7 RNA polimerasa está bajo el control del promotor *lacUV5*, que permite bajos niveles de transcripción en un estado no inducido. Para un control más estricto de la expresión, hospedero que contienen ya sea pLysS o pLysE se encuentran disponibles. El plásmido pLys codifica la lisozima T7, un inhibidor natural de T7 RNA polimerasa, y por lo tanto reduce su habilidad de transcribir genes objetivos en células no inducidas.

### 1.3.2 Sistemas de Expresión Eucariontes: Levaduras

Otro sistema de producción de proteínas recombinantes que se usa bastante son las levaduras. Las más utilizadas en la actualidad son *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae* (Drago & Sainz, 2006). Se las prefiere en los casos en que se necesita cierto grado de glicosilación en la proteína, cuando el sistema de producción bacteriano no es suficiente. Otras ventajas que presentan son los altos rendimientos alcanzados, y también las altas densidades celulares que generan, y su rápido crecimiento en medios definidos (Demain & Vaishnav, 2009).

Gracias a las modificaciones post-traduccionales que realiza *P. pastoris* y la capacidad de expresión hacia el medio extracelular, se facilita bastante la tarea de recuperación y

purificación de las proteínas recombinantes (Viader, 2011). Esto es una ventaja importante cuando se busca escalar procesos.

La levadura *P. pastoris* se utiliza generalmente como cepa hospedera para expresar proteína recombinante, utilizada a nivel académico como a nivel industrial.

El genoma de *P. pastoris* contiene dos genes de alcohol oxidasa, alcohol oxidasa 1 (AOX 1) y alcohol oxidasa 2 (AOX2). Por lo que las cepas *P. pastoris* son clasificadas en cuanto a su capacidad de metabolizar el metanol (Mut) en: Mut<sup>+</sup> estas poseen un crecimiento en metanol igual al de la cepa silvestre, ya que portan los genes AOX1 y AOX2 funcionales; las cepas Mut<sup>s</sup> (s representa "slow") poseen un lento crecimiento en presencia de metanol respecto a la cepa silvestre a causa de que sólo el gen AOX2 se encuentra funcional; el último grupo lo componen las cepas Mut<sup>-</sup>, las cuales no pueden emplear metanol como fuente de carbono y energía, ya que poseen los genes AOX1 y AOX2 inactivados (Fickers, 2014). Estos tres grupos se distinguen por sus velocidades de crecimiento en presencia de metanol: Mut<sup>+</sup>: (0.14 h<sup>-1</sup>), Mut<sup>s</sup> (0.04 h<sup>-1</sup>), y Mut<sup>-</sup> (0.0 h<sup>-1</sup>) (Stratton et al., 1998).

#### **1.4 INTERFERÓN ALFA BOVINO RECOMBINANTE (rBoIFN- $\alpha$ )**

Los interferones (IFN) son una familia de proteínas específicamente citoquinas que son reconocidas como componentes claves en la respuesta inmune innata y la primera línea de defensa contra una infección viral (Sadler & Williams, 2008). Fue reportado por primera vez por Isaacs y Lindenmann en 1957, viendo que células de pollo infectadas por el virus de la influenza producían interferones que mediaban la transferencia de un estado activo resistente a los virus. Son productos biológicos sintetizados por células de vertebrados en cantidades muy pequeñas, pero de gran importancia. Actúan en primera línea de defensa del organismo contra infecciones virales, parasitarias y tumores (Shimotohno, 2000; Hengel et al., 2005). Junto con los llamados Toll-like receptors (TLRs), que son receptores de transmembrana de tipo I que reconocen moléculas conservadas de patógenos, constituyen la familia de receptores más importante para detectar la presencia e iniciar la defensa contra patógenos (Rodríguez, 2006). Los TLR, de los cuales se conocen de momento once miembros, son capaces de inducir citoquinas pro-inflamatorias, primar la inmunidad adquirida e inducir la producción de IFN.

Existe un conjunto de genes que codifican distintos interferones (Platanias, 2005; Stark et al., 1998). Pueden ser reducidos a dos clases principales: el interferón de tipo I (alfa

y beta), y el de tipo II (gamma). El IFN de tipo I lo producen todo tipo de células, mayoritariamente los fibroblastos y células leucocitarias en respuesta a infecciones víricas. Se ha dilucidado el mecanismo de inducción de IFN por virus y RNA bicatenario (Katze et al., 2002). Diversos agentes pueden inducir la síntesis y secreción de IFN. Los virus son los más potentes inductores de la expresión de los genes de IFN. El estímulo principal para su producción parece ser la formación de RNA viral de doble cadena durante la replicación viral dentro de la célula. Por eso los virus DNA, por regla general, son inductores menos potentes de la síntesis de IFN que los virus RNA.

Los IFN poseen propiedades inmunomoduladoras y antiproliferativas, pero fueron sus propiedades antivirales las que primero llamaron la atención de los científicos y las que hoy día sirven como base para este proyecto.

El mecanismo de acción de los interferones es complejo y todavía no se conoce a cabalidad. Sin embargo, Sotoca en su revisión *“Cuarenta años de interferones”* distingue tres acciones principales de estas citoquinas:

- 1) Acción Antivírica: Según si la célula está infectada o no es la acción que va a ejercer el IFN. Si la célula ya se encuentra infectada, el interferón promoverá la apoptosis, o muerte celular de ésta, mientras que en las células no infectadas generan un estado antiviral (Tanaka et al., 1998). En la Figura 1.2 se muestra el mecanismo de acción del interferón en células no infectadas.

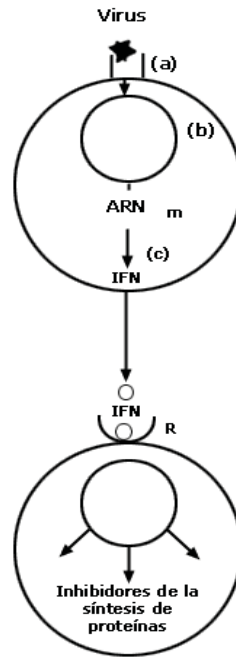


Figura 1.2: Mecanismo de acción del interferón. El virus infecta a la célula 1 después de unirse con el receptor (a). La infección viral enciende la maquinaria celular para permitir la replicación del genoma viral (b). La presencia de ácido nucleico viral induce la expresión de genes de interferón (c). El interferón es secretado por la célula infectada y se pega a su receptor específico presente en la membrana de una célula no infectada (d). La unión del interferón con su receptor induce la producción de enzimas que interfieren con la síntesis de proteínas. Una de estas enzimas inhibe la traducción de ARN mensajero viral, mientras que otra enzima estimula la acción de enzimas endonucleasas que degradan el ARN mensajero viral. De esta manera, la célula receptora del interferón queda protegida de la infección viral. Al inducir estas dos acciones enzimáticas que interfieren con la síntesis de proteínas, el interferón inhibe también el crecimiento de las propias células, por ello ha sido utilizado experimentalmente como inhibidor de la proliferación de células cancerosas (Aranda, 1995).

- 2) Acción inmunomoduladora: Todos los IFNs tienen acción inmunomoduladora, aunque ésta es más importante en el IFN gamma. Los interferones inducen en la superficie de la célula tumoral la expresión de antígenos asociados al tumor incluidos en el sistema mayor de histocompatibilidad (HLA) de tipo I y únicamente el IFN gamma en el tipo II, incrementando la actividad citotóxica de las células asesinas y la capacidad fagocítica de los macrófagos (Cirelli et al., 1996).
- 3) Acción antiproliferativa: Se ejerce sobre cualquier célula, aunque especialmente sobre las cancerígenas, obligando a éstas a entrar y mantenerse en la fase  $G_0$  del ciclo celular, evitando así su replicación (McEvoy, 1998). En la Figura 1.3 se muestra el mecanismo de acción del IFN alfa.



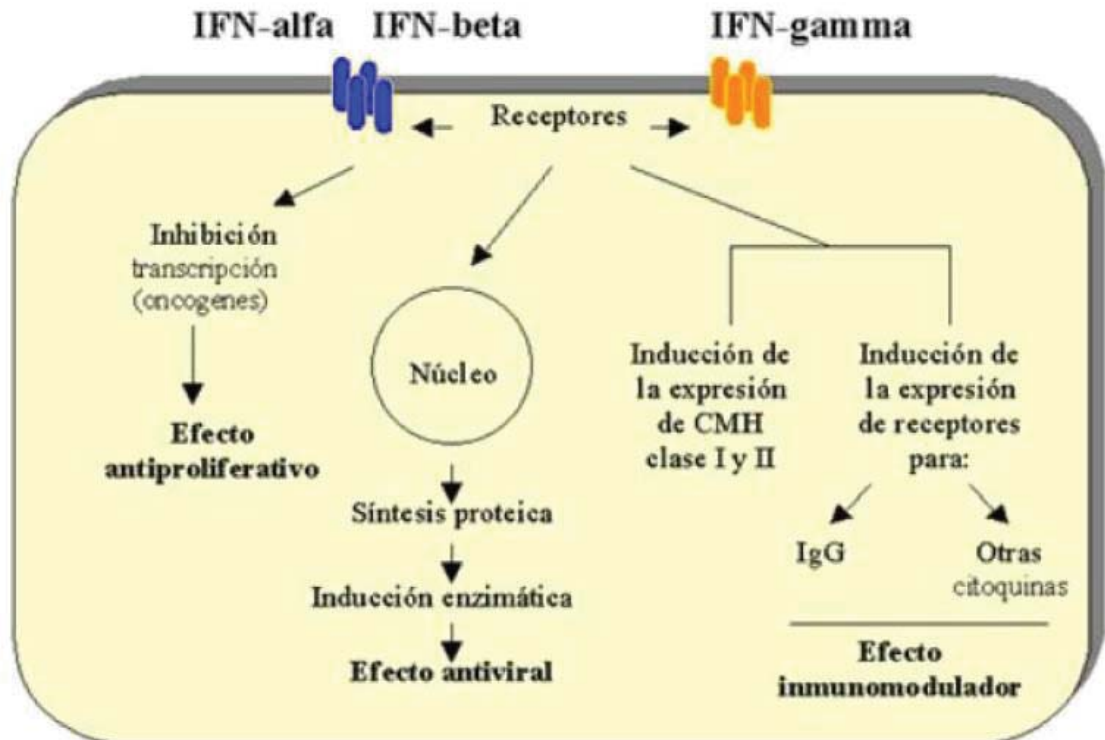


Figura 1.3: Mecanismo de la acción del IFN: Los interferones actúan mediante la unión a receptores específicos de la superficie celular. La mayoría de las células poseen receptores de alta afinidad para IFN. IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  comparten el mismo receptor (receptor tipo I), aunque con diferente afinidad, mientras que el IFN- $\gamma$  tiene un diferente receptor (receptor tipo II). (Facultad de Medicina, U.N.N.E).

#### 1.4.1 Tratamiento de Cuadros Virales en Respuesta al Uso de IFN

Una infección respiratoria por virus a menudo conduce a una mayor susceptibilidad a la neumonía bacteriana en seres humanos y animales (Babiuk et al., 1984; Finland et al., 1942; Jakab, 1982). En el ganado vacuno, estas interacciones sinérgicas entre los virus y las bacterias, con frecuencia, se producen tras el estrés generado por el movimiento de los animales desde las granjas, relativamente aisladas, a grandes corrales de engorde. Las condiciones de manejo son tales que la infección por algún tipo de virus a menudo se produce antes de que la inmunidad por vacunación se haya desarrollado, desencadenando una infección que se conoce como enfermedad respiratoria bovina.

Hace más de tres décadas existió el interés por controlar la enfermedad; uno de estos mecanismos de control para la enfermedad respiratoria bovina fue mediante el uso de interferón. El interferón había demostrado en aquellos tiempos su capacidad para inhibir la replicación de una amplia variedad de virus *in vitro*; por lo tanto, generó un

considerable interés en su potencial aplicación como un agente antiviral *in vivo* (Arvin et al., 1976; Dziewanowska & Petska, 1982; Merigan et al., 1978; Merigan et al., 1973). Además, el interferón bovino no recombinante demostró ser eficaz en la protección de animales frente al menos alguno de los agentes virales implicados en la iniciación de la enfermedad respiratoria bovina (Cummins & Rosenquist, 1980). Por lo tanto, el modelo de la enfermedad respiratoria bovina, que implica interacciones virales-bacterianas, pareció ser excelente para probar la eficacia del interferón recombinante bovino en el ganado.

Durante los años 80 se realizaron varias investigaciones con interferón aplicado a bovinos. Fulton y colaboradores demostraron que interferones de tipo I lograban reducir la actividad de ciertos virus que atacaban el sistema respiratorio bovino. Los experimentos fueron llevados a cabo en células extraídas del tracto respiratorio de vacas y expuestas a la acción de diversos virus: múltiples virus de la familia herpesvirus 1, virus de la diarrea viral bovina, virus de la parainfluenza tipo 3, virus sincicial bovino, adenovirus tipo 7 bovino, y virus de la estomatitis vesicular. Los resultados mostraron que todos estos virus eran sensibles a la acción del interferon, logrando reducirse el efecto citopático ocasionado por los mismos.

El interferón de una determinada especie no está limitado solamente al uso en dicha especie. El profesor Joseph Cummins es dueño de varias patentes, ya caducadas muchas de ellas, en las que utilizaba interferones heterólogos en diferentes especies de mamíferos, incluyendo bovinos y humanos. Su trabajo se centra, entre otros temas, en el tratamiento de diferentes enfermedades con bajas dosis de interferón, administradas por vía oral. En el caso de los bovinos, utilizó el interferón alfa humano para tratar una enfermedad respiratoria conocida comúnmente en inglés como “fiebre de traslado” (shipping fever), que no es más que un cuadro respiratorio que afecta al ganado al ser sometido a situaciones estresantes, como por ejemplo, traslados entre granjas. Este cuadro tiene su origen en múltiples virus, la gran mayoría son los mencionados en el estudio anterior, desencadenando un estado de inmunosupresión que deja al animal expuesto a la infección por otros agentes, causando cuantiosas pérdidas. Diversos estudios llevados a cabo *in vivo* lograron determinar que bajas dosis de interferón eran suficientes, y más adecuadas, para tratar la enfermedad. A medida que transcurrían los días después de la exposición al agente viral, los animales tratados con interferón presentaban estados febriles más cortos, con peaks de temperatura más bajos, con recuperación más pronta, menores pérdidas de peso, menor tiempo de recuperación de peso, y mejoraron la producción de anticuerpos.

Casi no existen estudios realizados con interferón alfa bovino, pero Babiuk et al., realizaron algunas pruebas con este interferón recombinante. Expusieron a los animales a *herpesvirus* tipo 1 y unos días después los expusieron a *Pasteurella haemolytica*. Este modelo de infección reportaba una mortalidad de entre el 60 y 80 por ciento. Trabajaron con dosis que iban desde 1 mg hasta los 50 mg de interferón, encontrando que las dosis de 5 y 10 mg eran suficientes, y que dosis mayores no generaban efectos adversos. Los animales tratados con interferón estuvieron menos días con fiebre, resistieron mejor la segunda infección por *P. haemolítica*, y presentaron un menor compromiso pulmonar. Es importante destacar que los mejores resultados se obtuvieron cuando el tratamiento con interferón se comenzó un día antes de la exposición al virus, esto suscita un problema: *in vivo* no se puede predecir cuándo un animal va a contraer la enfermedad, por lo que administrar interferón previo a la infección no es viable.

Bielefeldt et al., hicieron una completa revisión publicada el año 1986 sobre los interferones bovinos en medicina veterinaria. En ese artículo especifican tres métodos posibles para usar interferón en animales: (i) La inducción de interfon endógeno por medio de la exposición a agentes virales no virulentos, (ii) la inducción de interferón endógeno por medio de inductores químicos o sintéticos, y (iii) administrar interferón exógeno en una dosis determinada. Las tres posibilidades fueron descartadas por los autores. La segunda por ser tóxica, la primera por demostrarse que los virus son menos sensibles de esa manera a los interferones, y la tercera por ser necesarios inmensos esfuerzos económicos.

Al ser consultado un profesional del área veterinaria, profesor de la Universidad de Concepción, el Dr. Carlos Muñoz; éste mencionó que una de las alternativas que podrían resultar atractivas para el uso efectivo del interferón sería utilizarlo como adyuvante.

## **1.5 ADYUVANTES**

El objetivo principal de una vacuna contra una enfermedad infecciosa es otorgar inmunidad prolongada contra dicha infección al cabo de un número determinado de dosis. No obstante, en muchos casos, la inmunogenicidad, o la capacidad del sistema inmune a reaccionar frente a un antígeno, de la vacuna es reducida y por ello tienden a administrarse junto con un adyuvante.

Los adyuvantes se utilizan para la formulación de vacunas combinados con los antígenos para aumentar su inmunogenicidad e inducir mecanismos inmunitarios asociados a la protección (Morris et al., 1999). Además ayudan a la reducción de la cantidad de antígeno a utilizar en la elaboración, así como también el número de inmunizaciones requeridas (Roitt, 1991).

Un buen adyuvante debe ser capaz de generar una respuesta inmune potente, persistente, de calidad y específica contra un antígeno determinado, además no debe ser tóxico, debe ser biodegradable, biocompatible y químicamente definido (Gupta & Siber, 1995).

Si bien existen varias formas de clasificar los tipos de adyuvantes, Cox y Coulter realizaron una revisión bastante útil de los tipos de adyuvantes y su mecanismo de acción. En ella, definen dos grupos de adyuvantes: (i) los adyuvantes particulados, y (ii) los no particulados.

### **1.5.1 Adyuvantes Particulados**

Son partículas microscópicas. Su capacidad de desencadenar una respuesta inmune satisfactoria se ve aumentada si el inmunógeno (comúnmente un antígeno) está incorporado dentro, o asociado a la partícula. Dentro de los más comunes, se pueden encontrar los siguientes:

#### *a) Sales de Aluminio*

Son precipitados insolubles de hidróxido de aluminio, o fosfato de aluminio y han sido usados ampliamente en medicina veterinaria. El agente inmunogénico se une a ellas por medio de interacciones electrostáticas. Las ventajas de estos adyuvantes son los bajos costos y lo sencillo de su formulación, además de ser bastante seguros (Bomford, 1988).

#### *b) Emulsiones*

Se genera a partir de dispersiones de dos fases líquidas inmiscibles. Según cual sea la fase dispersa y la fase dispersante podemos tener las de agua en aceite (w/o), o las de aceite en agua (o/w). Son las más utilizadas en medicina veterinaria junto con las sales de aluminio, aunque pueden producir ciertas reacciones adversas como granulomas en el sitio de la inyección y abscesos, y/o fiebre (Aucouturier et al., 2001).

#### *c) Liposomas*

Su forma consta de una carcasa compuesta por una bicapa lipídica y en el interior una fase acuosa. El antígeno puede estar dentro del liposoma, en la fase acuosa, o bien, si es liposoluble puede encontrarse formando parte de la bicapa lipídica. Gracias a su estructura estos cuerpos son capaces de incorporar una gran variedad de moléculas de diferente actividad farmacológica (Gregoriadis et al., 2014). Son biodegradables y no tóxicos, y una propiedad muy importante es su capacidad de albergar el antígeno mezclado con alguna sustancia inmunoestimuladora (Leserman, 2004).

#### d) *Virosomas*

Se componen de una membrana lipídica la cual tiene asociadas proteínas virales y antígenos, propiciando así la respuesta inmune (Moser et al., 2003). Tienen la particularidad de emular al virus pero carecen del material genético del mismo, por lo que son reconocidos por el sistema inmune, pero no desencadenan una infección. Una propiedad importantes de los virosomas, y que los hace atractivos para su uso contra infecciones de tipo viral, es su capacidad de estimular la respuesta citotóxica mediada por linfocitos T (Wilschut et al., 2009).

#### e) *Complejos inmunoestimulantes (ISCOM's)*

Los constituyen un complejo miscelar formado por colesterol, fosfolípidos, saponinas, y un agente responsable de desencadenar la respuesta inmunológica. Han demostrado inducir una respuesta en las células T, y en los linfocitos T citotóxicos en diferentes modelos de animales (Sjölander et al., 1998). Se han utilizado de forma experimental en bovinos para el herpesvirus de tipo I y contra el virus de la diarrea viral bovina (Trudel et al., 1988; Carlsson et al., 1991). Tienen ciertas limitaciones en cuanto a costos, toxicidad, y estabilidad.

### **1.5.2 Adyuvantes No Particulados**

Están asociados principalmente por funcionar como inmunomoduladores, esto es, que desencadenan una respuesta inmune por medio de la activación de otros efectores inmunológicos. Se han obtenido buenos resultados al asociárseles con adyuvantes particulados. Los más comunes son los siguientes:

#### a) *Saponinas*

Formados por complejos de triterpenoides extraídos desde el árbol *Quillaja saponaria*. Desencadenan una fuerte respuesta de tipo Th1 y Th2. Han sido bastante utilizados en medicina veterinaria gracias a los bajos costos, lo sencillo de su formulación, y a que normalmente son seguros.

*b) Muramil dipéptido (MDP)*

Forma parte de un peptidoglicano extraído de *Mycobacteria*. Tiene varios derivados y dependiendo del cual se trate será la respuesta que inducirá. Activan principalmente a IL-1, y desencadenan respuestas Th1 y Th2. Se potencian sus propiedades si son administrados en conjunto a un adyuvante de tipo emulsión.

*c) Polímeros no iónicos*

Conformados por una región de polioxipropileno y otra de polioxietileno, se usan principalmente como aditivos en la fase oleosa de los adyuvantes tipo emulsión. Realzan la respuesta al administrarse con moléculas anfipáticas, también pueden actuar como inmunomoduladores. Se ha visto que pueden generar efectos adversos en el sitio de la inyección.

*d) Citoquinas*

Son glicoproteínas de peso molecular cercano a los 20 kDa y que han sido propuestas como aditivos para vacunas. Dependiendo de la citoquina de la cual se trate es la respuesta inmune que se desencadenará. Por ejemplo, IL-1 promueve la maduración de células B y T, IFN- $\gamma$  está asociado a una respuesta Th1, mientras que el IFN- $\alpha$  está relacionado con una cascada de reacciones que conllevan a la expresión de antígenos de histocompatibilidad y a la inducción de otras citoquinas.

El problema de usar citoquinas como adyuvantes, es el costo, son específicas de cada especie, y pueden desencadenar reacciones adversas. Sin embargo, para el desarrollo del presente proyecto, la complicación más cercana es el costo de producción del interferón alfa bovino, cuya evaluación será parte de este trabajo. Los demás problemas se saben superados debido a que el interferón bovino debiera ser administrado a ejemplares de la misma especie, y en concentraciones bajas (menores a 10 mg) los efectos adversos son casi inexistentes.

Se recomienda la utilización de las citoquinas en conjunto con adyuvantes particulados.

## 1.6 PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN ALFA BOVINO EN SISTEMAS HETERÓLOGOS

La producción a gran escala de los interferones se puede realizar tanto por métodos naturales o mediante el uso de tecnología de DNA recombinante. Aunque los interferones humanos de ambas fuentes están disponibles en un amplio suministro para el uso humano en investigación y ensayos clínicos, esto no ocurre para la mayoría de los interferones veterinarios. Interferones de varios animales (bovinos, porcinos y equinos) han sido producidos en pequeñas cantidades. Se han desarrollado técnicas para la producción recombinante de interferón bovino alfa, beta, y gamma. Sin embargo, han tenido una disponibilidad limitada para su uso en investigaciones veterinarias, y ninguno ha sido aprobado para uso clínico en la actualidad.

La producción de BoIFN a partir de células de la especie bovina es poco práctica debido a los bajos rendimientos obtenidos y a la complejidad del proceso (Cohen et al., 1986). Sin embargo, la tecnología de DNA recombinante ha llevado a la identificación y el aislamiento de genes que codifican interferones (Nagata et al., 1980; Taniguchi et al., 1979). En los últimos años se ha utilizado ampliamente esta tecnología, se han diseñado y optimizado sistemas de expresión, así también procesos de producción y los medios de cultivos, proporcionando una base para la producción industrial de rBoIFN- $\alpha$  y su potencial uso en la prevención y curación de enfermedades virales del ganado bovino. Como se ha mencionado anteriormente los interferones alfa bovinos (BoIFN- $\alpha$ ) pueden llegar a ser agentes antivirales de amplio espectro en la medicina veterinaria lo cual es un gran incentivo para desarrollar sistemas productivos para la obtención de esta proteína.

Interferones humanos y porcinos han sido expresados y producidos a escala comercial utilizando diversos sistemas heterólogos: *Escherichia coli*, *Baculovirus*, *Pichia pastoris*, y células CHO (Chen et al., 2007; Huang et al., 2012). A pesar de que actualmente la producción de rBoINF- $\alpha$  se ha llevado a cabo solo con propósitos de investigación, son varios los ensayos en los que a partir de sistemas de expresión recombinantes desarrollados en *E. coli* y *P. pastoris*, se han obtenido cada vez mejores rendimientos y proteína recombinante con una actividad biológica similar a la de BoIFN- $\alpha$  nativos (Tu et al., 2016; Velan et al., 1984; Shao et al., 2014).

### 1.6.1 Producción de rBoIFN- $\alpha$ en *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es la especie más empleada y estudiada tanto genética como fisiológicamente. Entre las ventajas que brinda este microorganismo como hospedero

están: rápida generación de biomasa, fácil manipulación genética, no posee requerimientos costosos asociados a medios de cultivo o equipamiento, alta eficiencia en la incorporación de material genético foráneo, gran variedad de vectores de expresión y variantes mutantes (Jonasson et al., 2002; Choi et al., 2006).

En *E. coli* altos niveles de expresión de proteína eucariotas a menudo resultan en deposiciones citoplasmáticas como cuerpos de inclusión (CI) no solubles. La microscopía electrónica muestra típicamente los cuerpos de inclusión como agregados amorfos que carecen de una organización estructural definida (Carrió et al., 2000). Por lo tanto, la formación de CI se puede producir como consecuencia de la acumulación intracelular de las formas parcialmente desplegada de la proteína recombinante (Puri et al., 1992). Esta acumulación en CI depende de factores como la secuencia de la proteína, la fuerza del promotor, la temperatura, velocidad de crecimiento, entre otros factores, pero hasta el momento no es fácil predecir su formación. En ocasiones es deseable la formación de CI (incluso se agregan proteínas de fusión para conducir a su formación), ya que protegen a la proteína de la proteólisis. Sin embargo, los CI pueden tener agregadas grandes cantidades de contaminantes como ADN, ARN y chaperonas, haciendo que la proporción de la proteína recombinante en el CI sea baja (Ferrer Miralles et al., 2009).

Para superar las limitaciones inherentes en la expresión de proteínas citoplásmicas, muchos grupos de investigación han utilizado sistemas secretores en la producción de proteínas recombinantes para apuntar al espacio periplásmico (Choi y Lee, 2004). La producción secretora tiene varias ventajas, la actividad de proteasa se considera que es mucho más baja en el espacio periplásmico que en el citoplasma, por lo que la degradación de la proteína es un problema menor, la purificación de la proteína recombinante se simplifica ya que el periplasma contiene un número mucho menor de proteínas nativas del huésped y la formación correcta de enlaces disulfuro pueden facilitarse porque el espacio periplásmico proporciona el entorno oxidativo necesario (Hockney, 1994). Aunque ésta opción resulta ser muy atractiva como solución a la formación de cuerpos de inclusión, para el caso particular del interferón no se han logrado mejores rendimientos a los que han sido reportados por métodos de producción convencionales, en los que se obtiene interferón a partir de cuerpos de inclusión. Tan et al., el año 2011 produjeron interferón humano huIFN- $\alpha$ 2b secretado al espacio periplásmico de *E. coli* en un medio optimizado, obteniendo un rendimiento de 336  $\mu$ g/L de IFN purificado, ésta concentración es muy baja en comparación con los rendimientos obtenidos en producción citoplasmática de IFN, ya sea desde CI o en forma soluble, concentraciones que van desde 70 mg/L hasta 300 mg/L de interferón



purificado (EL-Baky et al. 2015). Esta diferencia se puede atribuir a limitaciones de la técnica, como la traslocación ineficiente de la proteína desde el citoplasma al espacio periplásmico.

Otra alternativa que se ha desarrollado para la producción de IFN es la solubilización de la proteína en el medio citoplasmático, evitando así la agregación de proteína y material no proteico en formas de cuerpos de inclusión, y como consecuencia simplificando el procesamiento *downstream* de gran manera, evitando pasos de replegamiento, renaturalización, lavados y solubilización de los cuerpos de inclusión. Este proyecto apunta a la producción de rBoIFN- $\alpha$  de forma soluble en el citoplasma, por lo que el proceso y los rendimientos se verán con mayor detalle en el capítulo 3.

### **1.6.2 Producción de rBoIFN- $\alpha$ en *Pichia pastoris***

La levadura *Pichia pastoris* es muy adecuada para la fabricación de proteínas recombinantes, debido a que tiene varias ventajas, tal como la presencia de un promotor del gen que codifica la enzima alcohol oxidasa (pAOX1), el cual se caracteriza por ser eficiente, estrictamente regulado, y por utilizarse para la expresión de genes foráneos, se puede cultivar a altas densidades celulares, y posee un procedimiento de purificación simple ya la proteína es que secretada al medio de cultivo. Por otra parte, *P. pastoris* puede llevar a cabo modificaciones post-traduccionales, como glicosilación de proteínas recombinantes (Cregg et al., 1993).

Hasta la fecha muchas proteínas recombinantes, incluyendo interferón porcino activo, han sido exitosamente expresadas en *P. pastoris*.

### **1.6.3 Modalidades de Cultivo**

#### **Modalidades de Cultivo para la producción en *Escherichia coli***

El modo de operación en bioreactor, mediante el cual se desarrolla el cultivo bacteriano, tiene importancia relevante en la optimización de proceso productivo. Entre los modos de operación más importantes se encuentran el cultivo por lote, cultivo por lote alimentado y cultivo continuo (Asenjo & Merchuk, 1995; Jonasson et al., 2002).

La modalidad por lote alimentado es la más utilizada para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*. El cultivo por lote alimentado (CLA) es una modalidad de fermentación, cuyas características hacen atractiva su aplicación a una variada gama de procesos de fermentación, tanto en el área de la investigación, como en el área de producción (Acevedo & Gentina, 2002). Principalmente se trata de una operación semi-continua, durante la cual los nutrientes o parte de ellos ingresan al fermentador

por una corriente de alimentación, y al no existir una corriente de descarga, resulta en una continua variación del volumen de fermentación. Las condiciones iniciales de un cultivo por lote alimentado se logran a través de una etapa previa de carácter obligatoria de cultivo por lote. Una vez que se han alcanzado las condiciones deseadas, se inicia la alimentación, marcando el comienzo del CLA.

En el sistema por lote alimentado, la estrategia de alimentación es crítica porque afecta los flujos de las vías metabólicas y, como consecuencia, afecta la concentración máxima de biomasa alcanzable, la productividad de proteínas recombinantes y la formación de subproductos (Choi et al., 2006). Existen varias estrategias de alimentación que han sido utilizadas con el fin de obtener cultivos de alta densidad en *E. coli*. Estrategias de alimentación simples tales como: velocidad de alimentación constante, velocidad de alimentación variable y velocidad de alimentación exponencial, han sido exitosamente aplicadas (Babu et al., 2000; Wong et al., 1998). El método de alimentación exponencial en CLA es uno de los más utilizados para el crecimiento de *E. coli* a alta densidad celular, puesto que en esta metodología el proceso es fácil de implementar y se puede manipular la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), permitiendo en la mayoría de los casos, a las células crecer a  $\mu$  constante mediante el uso de glucosa (u otra fuente de carbono) como un nutriente limitante del crecimiento (Lee, 1996). Uno de los inconvenientes asociados a los cultivos de alta densidad celular es la acumulación de acetato (Kleman y Strohl, 1994). Sin embargo la formación de acetato puede minimizarse mediante el control de la velocidad de crecimiento específico por debajo de un cierto valor, dependiendo de la cepa y la composición del medio (Shojaosadati et al., 2008).

### **Modalidades de Cultivo para la producción en *Pichia Pastoris***

La estrategia de cultivo más común para la producción de proteínas recombinantes bajo el pAOX1, está estructurada en dos etapas esencialmente. La primera consiste en generar altas concentraciones de biomasa utilizando fuentes de carbono con un alto rendimiento de sustrato en biomasa, tales como el glicerol, desarrollando un cultivo por lote. La segunda etapa consiste en inducir el promotor AOX1 utilizando metanol. Sin embargo, también se han llevado a cabo un gran número de investigaciones en la que se utiliza la modalidad de cultivo continuo, ya que otorga la ventaja de mantener la velocidad específica de crecimiento en un valor constante.

### *Cultivo por lote alimentado*

Para lograr altas densidades celulares en cultivo de *P. pastoris*, este sistema ha sido diseñado como un proceso de control de tres etapas, que tiene por objetivo controlar la represión/desrepresión y de inducir AOX1, así como el consumo de oxígeno a altas densidades celulares. La primera fase es un proceso por lote que tiene por objeto producir rápidamente grandes cantidades de biomasa en un medio que contiene glicerol. El crecimiento se lleva a cabo hasta que el glicerol es completamente consumido. Los protocolos estándar sugieren la realización de este paso utilizando una concentración de glicerol máxima de 40 g/L, a concentraciones más altas se inhibe el crecimiento. Durante esta fase la alcohol oxidasa no es producida por las células y, por lo tanto, un aumento repentino de metanol en el medio daría lugar a muerte celular. Este problema se supera por un corto crecimiento en modalidad CLA limitado por glicerol (etapa dos – fase de transición). Una vez que todo el glicerol es consumido en la fase de crecimiento en lote, se inicia una alimentación de glicerol para aumentar la biomasa celular bajo condiciones limitantes. El nivel de proteína expresada depende de la biomasa celular generada durante la fase de alimentación de glicerol. Esta etapa permite la desrepresión del promotor AOX1. A veces, la fase de transición se complementa con bajas cantidades de metanol (menores de 4 g/L), con el objetivo de facilitar y acelerar la desrepresión del promotor AOX1 y la inducción. Esta estrategia se denomina alimentación mixta y se realiza a una velocidad de alimentación de glicerol limitada. En la estrategia estándar, la velocidad de alimentación exponencial es preferida a la alimentación constante, ya que ofrece una mayor productividad de biomasa y una velocidad de crecimiento constante, donde la velocidad de consumo específico máximo de glicerol es 0,0688 [g/g/h] (Cos et al., 2006).

Todo el glicerol necesita ser consumido antes de comenzar la alimentación de metanol para inducir completamente el promotor AOX1. Es importante introducir el metanol lentamente para adaptar el cultivo al crecimiento en metanol; si el metanol se añade muy rápido, puede causar muerte celular. Una vez el cultivo se ha adaptado al metanol, es muy determinante usar las variaciones de oxígeno disuelto para analizar el estado del cultivo.

Wu et al., (2011) utilizaron una cepa de *P. pastoris* mutante (Mut<sup>+</sup>) productora de interferón consenso humano recombinante (cIFN) para estudiar la influencia de la concentración de metanol en el nivel de producción y la calidad cIFN. Llevaron a cabo cinco cultivos por lote alimentado controlando las concentraciones de metanol residual

a niveles que oscilan entre 0,25 y 1% (p/v). La fermentación se dividió en tres fases, primero una en modalidad de lote con glicerol, luego una fase por lote alimentado con glicerol y finalmente una fase por lote alimentado con metanol para la inducción. Los resultados que obtuvieron mostraron que una alta concentración de metanol al inicio de la fase de inducción fue importante para el nivel de expresión, mientras que la velocidad de crecimiento específica fue crítica para la calidad del producto en cIFN por lo que sigue de la fase de inducción. Probaron un cultivo por lote alimentado a alta densidad celular combinado, donde la fase de inducción se realizó en dos etapas de control de metanol, la primera consta de mantener el metanol a 5% en las primeras 6 horas de inducción y manteniendo  $\mu$  a 0,027 [ $\text{h}^{-1}$ ]. Durante la segunda etapa la inducción se realizó mediante el control de la concentración de metanol a 0,75%, produciendo un alto nivel de producto cIFN de alta calidad. En la Tabla 1.1 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 1.1: Resultados para cultivos CLA con metanol de *P. pastoris* Mut<sup>+</sup> GS115 productora de interferón.

Concentración de Metanol (%)	Máxima velocidad específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ )	Máxima velocidad de consumo de metanol ( $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	Máxima productividad específica ( $\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	Concentración total a 66 h de inducción ( $\text{g L}^{-1}$ )
0,25	0,022 $\pm$ 0,001	0,062 $\pm$ 0,003	0,028 $\pm$ 0,002	1,67 $\pm$ 0,12
0,5	0,023 $\pm$ 0,0012	0,069 $\pm$ 0,005	0,031 $\pm$ 0,002	1,87 $\pm$ 0,15
0,75	0,026 $\pm$ 0,0015	0,084 $\pm$ 0,006	0,035 $\pm$ 0,002	2,09 $\pm$ 0,17
1	0,014 $\pm$ 0,001	0,118 $\pm$ 0,008	0,043 $\pm$ 0,003	0,76 $\pm$ 0,04
Estrategia combinada <sup>a</sup>	0,027 $\pm$ 0,0013	0,136 $\pm$ 0,009	0,056 $\pm$ 0,003	2,97 $\pm$ 0,19

<sup>a</sup> La concentración de metanol se controló a 5% durante las primeras 6 h de inducción, momento en el cual la concentración de metanol se redujo lentamente a 0,75%, entonces la tasa de crecimiento específico se controló a 0,025  $\text{h}^{-1}$  mediante el mantenimiento de 0,75% la concentración de metanol en el proceso siguiente. Media  $\pm$  desviación estándar.

## 1.6.4 Mejoras y Optimizaciones para la Producción de rBoIFN- $\alpha$

### Mejoras y optimizaciones para la producción de rBoIFN- $\alpha$ en *Escherichia coli*

La optimización de la producción de proteínas recombinantes puede realizarse a nivel del microorganismo productor, del vector de expresión o de las condiciones de cultivo. Condiciones de cultivo tales como, temperatura de crecimiento y temperatura de inducción, velocidad específica de crecimiento y composición del medio de cultivo.

#### a) Temperatura

El uso de temperaturas inferiores a la de crecimiento óptimo de *E. coli* (37 [°C]), en algunos casos puede reducir respuestas metabólicas indeseables para la síntesis de proteínas foráneas y, como consecuencia, mejorar el rendimiento y/o la solubilidad de la proteína de interés (Donovan et al., 1996). Se ha demostrado que la sobreproducción de proteínas recombinantes en *E. coli* a 37 [°C] induce a la formación de cuerpos de inclusión, mientras que a bajas temperaturas se genera un incremento en el plegamiento correcto de las proteínas producidas y la ubicación en los compartimentos deseados (Novagen, 2006). Sin embargo, un decrecimiento pronunciado de la temperatura genera múltiples cambios celulares en respuesta, lo cual se conoce como “cold-shock adaptation” que provoca ineficiencias en el plegamiento de las proteínas (Gordon et al., 2008).

El manejo adecuado de la temperatura puede llevar a optimizaciones en el proceso productivo sobre todo cuando se apunta a la producción de proteína recombinante en forma soluble. Kim y Jung (2002) en su estudio realizado en *E. coli* para la producción de interferón humano soluble resolvieron que cuando la fermentación fue realizada a 37 [°C], cerca del 40% del interferon total fue expresado como cuerpos de inclusión en las células recombinantes. En cambio, en la fermentación a 30 [°C] se encontró menos del 10% del interferon en formas de cuerpos de inclusión, encontrándose la mayor proporción de interferon de forma soluble. EL- Baky et al., (2015) mejoraron el rendimiento de consensus IFN- $\alpha$  soluble reduciendo la temperatura de inducción a 25 [°C] o 30 [°C]. En este estudio, el IFN soluble representaba el 70% del IFN total, el resto fue encontrado en forma de CI.

#### b) Velocidad específica de crecimiento

Cabe destacar que por medio del control de la velocidad específica de crecimiento se pueden resolver otros inconvenientes que se presentan en los cultivos a altas densidades celulares como, formación de ácido acético o generación de calor.

La producción de acetato bajo condiciones aerobias se atribuye a un desbalance entre los flujos de carbono proveniente de glucosa (la cual es transportada a través del sistema de fosfotransferasa, PTS) en la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos lo que conduce a una acumulación de acetil coenzima A, la cual se transforma a acetato que se transporta hacia afuera de la célula (De Anda et al., 2006). Este fenómeno de producción de acetato es conocido como sobreflujo metabólico. Una manera de evitar el sobreflujo metabólico es restringir la velocidad de consumo de glucosa mediante la adición controlada de una solución concentrada al biorreactor. Esto puede hacerse mediante esquemas de alimentación constante, alimentación con incremento lineal, con incremento exponencial, o empleando algoritmos de control más sofisticados para controlar el consumo mediante efectos indirectos del metabolismo, como la variación de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) o el pH.

La velocidad con que una población celular consume un nutriente cualquiera, viene dada por la Ecuación 1.1.

$$velocidad\ de\ consumo = \frac{\mu \cdot X \cdot V}{Y_{x/s}}$$

Ecuación 1.1

La ecuación Ecuación 1.1 muestra que para un sustrato y nivel de masa celular dada, la demanda depende directamente de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). De esta manera, controlando la concentración del nutriente limitante en el caldo de fermentación, se influirá sobre la velocidad específica de crecimiento de la población y la predominancia de un determinado estado fisiológico (Acevedo et al., 2002). De acuerdo a la ecuación de Monod (Ecuación 1.2) se puede apreciar cómo se controla  $\mu$ , controlando la concentración del nutriente en el cultivo.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{S + K_S}$$

Ecuación 1.2

En pos de evitar el sobreflujo metabólico, se debe mantener una velocidad de consumo de glucosa menor al valor umbral que dispara el sobreflujo metabólico (Eiteman y Altman, 2006); éste valor dependerá de la cepa, el medio de cultivo y la temperatura del mismo, pero es común que corresponda a valores de velocidad

específica de crecimiento igual o menor a  $0,15 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ . Además la generación de calor, que es un problema en estos cultivos especialmente en fermentaciones a gran escala, se puede resolver parcialmente con crecimiento celular a  $\mu$  reducidas.

### **Mejoras y optimizaciones para la producción de rBoIFN- $\alpha$ en *Pichia pastoris***

#### a) Medio de cultivo

Debido a la secreción de proteasas al medio la degradación proteolítica es un problema significativo en muchos cultivos celulares de alta densidad. Shi et al., (2003) informaron de varios tipos de proteasas durante el crecimiento de *P. pastoris* en metanol; identificaron, cisteína y serina, proteasas de tipo aspártico y mostraron que la adición de EDTA inhibe las metaloproteasas y proteasas de cisteína.

La adición casaminoácidos al 0,1% cada 24 horas al medio de cultivo durante la fase de inducción contribuyó en gran medida a aumentar el nivel de producción de huIFN- $\alpha 2b$  y evitó la acción de proteasas. El enriquecimiento del medio de cultivo con suplementos ricos de aminoácidos es un procedimiento usado a menudo para reducir la degradación del producto durante los procesos biotecnológicos. Estos suplementos pueden actuar como alternativa compitiendo como sustrato para proteasas y reprimiendo la inducción de proteasa causada por la limitación de nitrógeno (Jahic et al., 2006).

Una formulación común de medio definido para cultivar *P. pastoris* es el Basalt Salt Medium. Boze et al., (2001) en su trabajo encontraron que la suplementación de un medio basal con siete vitaminas y dos elementos traza aumentaron la producción de una hormona foliculo estimulante porcina recombinante desde 93 [mg/L] (BSM) a 187 [mg/L] (complementado), mostrando que los requerimientos de vitaminas y elementos traza tienen un efecto importante en el crecimiento celular y la producción de proteína recombinante en *P. pastoris*.

#### b) Temperatura

Debido a la secreción de proteasas al medio, y posiblemente también debido a la liberación por lisis, la degradación proteolítica es un problema significativo en muchos cultivos celulares de alta densidad. La temperatura de inducción es un parámetro importante. Se han examinado distintas temperaturas de incubación a 30, 25, 20 y 15 [°C] en intentos de minimizar la proteólisis extracelular. Bajas temperaturas reducen los niveles de proteasas y permiten aumentar la producción de proteína biológicamente activa en *P. pastoris* (Shi et al., 2003; Li et al., 2001).

Jin et al., (2010) reportaron que la disminución de la temperatura de 30 a 20 [°C] durante la fase de inducción con metanol disminuyó el periodo de adaptación celular a éste nuevo sustrato, por lo que la producción de pIFN- $\alpha$  comenzó antes en comparación con la estrategia estándar de inducción (a 30 [°C]).



## 1.7 OBJETIVOS

### 1.7.1 Objetivo general

Evaluar la factibilidad técnico-económica de una planta de producción de interferón alfa bovino recombinante (rBoIFN- $\alpha$ ).

### 1.7.2 Objetivos específicos

- Establecer volumen de producción de rBoIFN- $\alpha$
- Establacer una ubicación para la planta.
- Seleccionar el proceso de producción, utilizando dos microorganismos : *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*.
- Diseñar ambas plantas de producción.
- Disponer de balances de materia y energía para cada uno de los procesos.
- Evaluar la rentabilidad del proyecto comparando producción por *Escherichia coli* y por *Pichia pastoris*.

## 1.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 1

Akesson, M., Hagander, P., & Axelsson, J. (2001). Avoiding acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures using feedback control of glucose feeding. *Biotechnology Bioengineering*. 73: 20-223.

Aroca, G., & Zúñiga, M.E. (2002). Bioseparaciones. En F. Acevedo, J. C. Gentina, & A. Illanes. *Fundamentos de Ingeniería Bioquímica*, pp.293-347. Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso.

Arvin, A., Yeager, A., & Merigan, T. C. (1976). Effect of leukocyte interferon on urinary excretion of cytomegalovirus by infants. *J. Infect. Dis.* 133: 205-210.

Asenjo, J.A., & Merchuk, J. C. (1995). *Bioreactor System Design*, 1st. Edition. Marcel Dekker, pp.479-509. New York, Basel, Hong Kong.

Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. (2001). Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*. 19: 2666-2672

Babaiepour, V., Shojaosadati, S. A., Robotjazi, S. M., Khalilzadeh, R., & Maghsoudi, N. (2007). Over-production of human interferon- $\gamma$  by HCDC of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry* 42: 112-117.

Babiuk, L. A., & Acres, S. D. (1984). Models for bovine respiratory disease. In *Bovine respiratory disease*. Texas A&M University Press, College Station. P. 287-385. In R. W. Loan.

Babu, K.R., Swaminathan, S., Marten, S., Khanna, N., & Rinas, U. (2000). Production of interferon- $\alpha$  in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli* and its single step purification from refolded inclusion body proteins, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 655-660.

Becker, S., Theile, S., Heppler, N., Michalczyk, A., Wentzel, A., Wilhelm, S., Jaeger, K. E., & Kolmar, H. (2005). A generic system for the *Escherichia coli* cell surface display of lipolytic enzymes. *Federation of European Biochemical Societies*. 579(5): 1177-1182.

Bielefeldt, H. M.J.P. Lawman, and L.A. Babiuk. 1987. Bovine interferon: its biology and application in veterinary medicine. *Antiviral Research*. 7: 187-210.

Bomford R. Aluminium salts: perspectives in their use as adjuvants. *Immunological Adjuvants and Vaccines*, 1989, New York: Plenum. In: Gregoriadis G, Allison AC, Poste G (eds). P 35-41.

Boze, H., Celine, L., Patrick, C. H., Fabien, R., Christine, V., Yves, C., & Guy, M. (2001). High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*. 36: 907-913.

Carlsson, U., Alenius, S., & Sundquist, B. (1991). Protective effect of an ISCOM bovine virus diarrhoea virus (BVDV) vaccine against an experimental BVDV infection in vaccinated and non-vaccinated pregnant ewes. *Vaccine*. 9: 577-580.

Carrió, M. M., Cubarsi, R., & Villaverde, A. (2000). Fine architecture of bacterial inclusion bodies, *FEBS Lett*. 471: 7–11.

Castan, A., & Enfors, S. O. (2002). Characteristics of a DO controlled fed-batch culture of *Escherichia coli*. *Bioproc. Eng*. 22: 15- 509.

Chen, C.C., Wu, P. H., Huang, C. T., & Cheng, K. (2004). A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase. *Enz Microb Biotechnol*. 35: 315–20.

Chen, W.Y., Zhao, H. J., Wang, X. J., Huang, K. H., & Bu, Z. G. (2007). Expression of recombinant bovine interferon- $\beta$  by baculovirus system and evaluation of its bioactivity. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 47 (6), pp.992-996. China.

Chiruvolu, V., Cregg, J. M., & Meagher, M. M. (1997). Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme Microb. Tehcnol*.21: 277-283.

Choi, J. H., & Lee, S. Y. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 625–635.

Choi, J.H., Keum, K. C., & Lee, S. Y. (2006). Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science* 61: 876-885.

Cohen, S., Velan, B., Bino, T., Rosenberg, H., & Shafferman, A. (1986). Methods in enzymology. (21): 119.

Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. L., & Valero, F. (2006). Operational Strategies, Monitoring and Control of Heterologous Protein Production in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris* under Different Promoters: A review. *Microbial Cell Factories*, 5: 17.

Cregg, J.M., Vedvick, T. S., & Raschke, W. C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 11(8): 10-905. New York.

Cummins, J. M., and B. D. Rosenquist. 1980. Protection of calves against rhinovirus infection by nasal secretions interferón induced by infectious bovine rhinotracheitis. *Am. J. Vet. Res.* 41:161-165.

Cummins, J. M., Rosenquist, B. D. (1980). Protection of calves against rhinovirus infection by nasal secretions interferón induced by infectious bovine rhinotracheitis. *Am. J. Vet. Res.* 41: 161-165.

D'Anjou, M.C. & Daugulis, A. J. (1997). A model-based feeding strategy for feed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology Techniques*, 11(12) :865-868.

De Mare, L., Velut, S., Ledung, E., Cimander, C., Norrman, B., Holst, O., & Hagander, P. A. (2005). Cultivation technique for *E. coli* fedbatch cultivations operating close to the maximum oxygen transfer capacity of the reactor. *Biotechnology Letters*. 25: 90-983.

Demain, A.L. y Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*. 27: 297–306.

Donovan, R.S., Robinson, C. W., & Glick, B. R. (1996). Optimizing inducer and cultura conditions for expression of foreing proteins under control of lac promoter. *Journal os Industrial Microbiology*.16:145-154.

Drago, M.E. & Sainz, T. Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. En: *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* (en línea). Enero de 2006 (referido el 4 de julio de 2016). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57937106>

Dziewanowska, Z. E., & Pestka, S. (1982). The human interferons. *Med. Res. Rev.* 2:325-353.

Eiteman, M.A. & Altman, E. (2006). Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends in Biotechnology*. 24: 530-536.

El-Baky, N., Linjawi, M. H., & Redwan, E. M. (2015). Auto-induction expression of human consensus interferon- $\alpha$  in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*.15:14.

Ellis, S.B., Burst, P.F., Koutz, P.J., Waters, A. F., Harpold, M. M., & Gingears, T. R. (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*. 5:1111–21.

Ferrer–Miralles, N., Domingo–Espín, J., Corchero, J.L., Vázquez, A. y Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories* 8: 17.

Files, D.A., Ogawa, M., Scaman, C. H., & Baldwin, S. A. (2001). *Pichia pastoris* fermentation process for producing high-levels of recombinant human cystatin-C. *Enzyme and Microbiological Technology*. 26: 335-340.

Finland, M., Peterson, O. L., & Strauss, E. (1942). Staphylococcal pneumonia occurring during an epidemic of influenza. *Arch. Intern. Med*. 70: 183-205.

Fulton R.W., Downing M.M., & Cummins J.M. (1984). Antiviral effects of bovine interferons on bovine respiratory tract viruses. *J Clin Microbiol*. 4: 492–497.

Galindo, J., Solano, F. & Iborra, J. (1983). Interferón: Mecanismos bioquímicos de formación y acción. *Anales de Biología*. 5:3-15.

Gordon, E., Horsefield, R., Swars, H., De Pont, J., Neutze, R., & Snijder, A. (2008). Effective high-throughput overproduction of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 62: 1-8.

Gregoriadis, G, Yvonne P. (2014). Liposomes. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Doi: 10.1002/9780470015902.a0002656.pub2.

Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T. *An Introduction to Genetic Analysis*. 7th edition. New York: W. H. Freeman; (2000). Making recombinant DNA. (referido el 4 de julio de 2016) Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21881/>

Grossman, T., Kawasaki, E. S., Punreddy, S. R., & Osburne, M. S. (1998). Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*. 209: 95-103.

Gupta, R.K. & Siber G.R. (1995). Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine*. 13: 1263–1276.

Hansen, L.H., Knudsen, S., & Sorensen, S. J. (1998), The effect of the *lacY* gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Current Microbiology*. 36(6): 341-347.

Hengel, H., Koszinowski, U. H., & Conzelmann, K. K. (2005). Viruses know it all: new insights into IFN networks. *Trends Immunol* 26: 396-401.

Hockney, R.C., (1994). Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* 12: 456–463.

Huang, L., Cao, R.B., Wang, N., Liu, K., Wei, J. C., Isahg, H., Song, L. J., Zuo, W. Y., Zhou, B., Wang, W. W., Mao, X., & Chen, P. Y. (2012). The design and recombinant protein expression of a consensus porcine interferon: CoPoIFN- $\alpha$  Cytokine. 57(1):37-45.

Jahic, M., Veide, A., Charoenrat, T., Teeri, T., & Enfors, S.O. (2006). Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog*. 22: 1465–73.

Jakab, G. J. (1982). Immune impairment of alveolar macrophage phagocytosis during influenza virus pneumonia. *Am. Rev. Respir. Dis*. 126: 776-782.

Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P. A., & Stahl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 35: 91-105.

Katze, M. G., Y. He & M. Gale, jr. 2002. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol*. 2: 675-687.

Kim, D.C. & Jung, j. (2002). A protocol for batch fermentation for production of soluble interferon by recombinant *Escherichia coli*. School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, *Agric. Chem. Biotechnol*. 45(4): 180-182. Korea.

Kleman, G.L., & Strohl. (1994). Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 180-186.

Lara, Álvaro R. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. En *Rev. Mex. Ing. Quím* (en línea). 2011, vol.10, n.2 (referido el 5 de Julio de 2016), pp.209-223. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-27382011000200006&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382011000200006&lng=es&nrm=iso)

Lee, S.Y. (1996). High cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* 14: 98-105.

Leserman, L. (2004). Liposomes as Protein Carriers in Immunology. *Journal of Liposome Research.* 14: 175-189.

Li, S. Z., Xiong, F., & Lin, Q. (2001). Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*, *Protein Express Purif.* 21: 438–445.

Li, Y., Chen, J., Mao, Y., Lun, S., & Koo, Y. (1998). Effect of additives and fed-batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem*, 33:14-709.

Manderson, D., R. Dempster, & Y. Chisti. (2006). Recombinant vaccine against hydatidosis: production of the antigen in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microb. Biotechnol*, 33: 173-182.

Merigan, T. C., Rand, K., Pollard, R., Abdallah, A. S., Jordan, G. W., & Fried, R. P. (1978). Human leukocyte interferon for the treatment of herpes zoster in patients with cancer. *N. Engl. J. Med.* 298: 981-987.

Merigan, T. C., Reed, S., Hall, T., & Tyrrell, D. A. J. (1973). Inhibition of respiratory virus infection by topically applied interferon. *Lancet* 563-567.

Morris, H., Martínez, C., Abdala, R., & Campos, D. (1999). Adyuvantes Inmunológicos. *Rev Cubana Invest Biomed.* 18(2): 130-7.

Moser, C., Metcalfe, I.C., & Viret, J.F. (2003). Virosomal adjuvanted antigen delivery systems. *Expert Rev Vaccines.* 2: 189-196.

Nagata, S., Taira, H., Hall, A., Johnsrud, L., Streuli, M., Ecsodi, J., Bell, W., Cantell, K., & Weissman, C. (1980). *Nature*, pp.284-316. London.

Novagen. pET System Manual. 10<sup>a</sup> Edición. U.S.-Canadá- Alemania-Reino Unido. 2006.

Platanias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5: 375-386.

Puri, N. K., Crivelli, E., Cardamone, M., Fiddes, R., Bertolini, J., Ninham, B., & Brandon, R. (1992). Solubilization of growth hormone and other recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies by using a cationic surfactant, *Biochem. J.* 285: 871–879.

Rodríguez, M. 2006. Interferones y vacunas como control de enfermedades prevalentes.

Roitt, I.M. 1991. *Essential immunology*. 7 ed. Oxford: Blackwell Scientific. 326.

Shao, J., Cao, C., Bao, J., Gao, M., & Wang, J. (2014). Characterization of the biological activities and physicochemical characteristics of recombinant bovine interferon- $\alpha$  14. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, pp.163–169.

Shi, X., Karkut, T., Chamankhah, M., Alting-Mees, M., Hemmingsen, S. M., & Hegedus, D. (2003). Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Prot Exp Purif.* 28: 321–30.

Shimotohno, K. (2000). Hepatitis C virus and its pathogenesis. *Semin Cancer Biol* 10: 233-240.

Shojaosadati, S.A., Varedi Kolaei, S. M., Babaeipour, V., & Farnoud, A. M. (2008). Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. *Iranian J. Biotechnol.* 6: 63-84.

Sjölander, A., J.C. Cox, I.G. Barr. 1998. ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. *J. Leukoc. Biol.* 64(6): 713-723.

Sotoca, J. M. (1999). Cuarenta años de interferones. *Farm Hosp.* 23 (4): 205-213.



Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H & Schreiber, R. D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67: 227-264.

Tan, J., Ramanan, R., Azaman, S., Ling, T., Shuhaimi, M. And Ariff, A. (2011). Enhanced Interferon- $\alpha$ 2b Production in Periplasmic Space of *Escherichia coli* through Medium Optimization using Response Surface Method. *The Open Biotechnology Journal*, (3), pp.117-124.

Taniguchi, T., Sakai, M., Fuji-Kuriyama, Y., Muramatsu, M., Kobayashi, S., & Sudo, T. (1979). *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* 55: 464.

Trinchieri, G., & Perussia, B. Immune interferon. (1985). A pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol Today*. 6: 131-6.

Trudel, M., Boulay, G., Seguin C., Nadon, F., Lussier, G. (1998). Control of infectious bovine rhinotracheitis in calves with a BHV-1 subunit-ISCOM vaccine. *Vaccine*. 6: 525-529.

Tu, Y., Wang, G., Wang, Y., Chen, W., Zhang, L., Liu, Y., Jiang, C., Wang, S., Bu, Z. & Cai, X. (2016). Extracellular expression and antiviral activity of a bovine interferon-alpha through codon optimization in *Pichia pastoris*. *Microbiological Research*, 191: 12-18.

Velan, B., Cohen, S., Grosfeld, A., Leitner, M., & Shafferman, A. (1984). Bovine Interferon- $\alpha$  Genes, structure and expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 260(9): 5498-5504. U.S.A.

Viader, J.M., M. Guerrero. 2011. Biotecnología de proteínas recombinantes con *Pichia pastoris*. 19 a 24 de Junio de 2011, Querétaro, México.

Wilschut J. 2009. Influenza vaccines: The virosome concept. *Immunology Letters*. 122(2):118-121.

Wong, H.H., Kim, Y. C., Lee, S. Y., & Chang, H. N. (1998). Effect of postinducing nutrient feeding strategies on the production of bioadhesive protein in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 60: 271–276.

## CAPÍTULO 2

# ESTUDIO DE MERCADO, CAPACIDAD Y UBICACIÓN DE LA PLANTA

### 2.1 DEFINICIÓN DEL PRODUCTO Y ADYUVANTES

Para entender el escenario sobre el cual se desarrollará el producto del presente proyecto se hace necesario comprender el alcance de la palabra “adyuvante”. Es importante saber qué es un adyuvante, cuáles son sus usos, y cuáles son los más relevantes hoy en día.

La primera definición de adyuvante, proveniente de la RAE, dice “*en medicina: sustancia que, añadida a otra, potencia su efecto principal*”. Profundizando en lo que son los adyuvantes, es posible encontrar de parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que dice: “*en muchas vacunas se añaden adyuvantes para aumentar su inmunogenicidad y eficacia*”. Los adyuvantes entonces se utilizan para la formulación de vacunas, y combinados con los antígenos que son los agentes encargados de desencadenar una respuesta inmune de manera específica, pueden lograr aumentar la inmunogenicidad de ésta e inducir mecanismos inmunitarios asociados a la protección del individuo, aumentando los niveles de anticuerpos específicos (Roitt, 1991). Además ayudan a la reducción de la cantidad de antígeno a utilizar en la elaboración, así como también el número de vacunaciones requeridas (Morris et al 1999).

Es sabido que muchas vacunas no logran despertar en el individuo una respuesta inmune efectiva y es por ello que la adición de adyuvantes se hace necesaria para poder mejorar la efectividad de ésta.

En definitiva adyuvante es un “ingrediente” más en la formulación de una vacuna que puede mejorar su mecanismo de acción, y que puede además reducir los costos de producción de la misma, disminuyendo la cantidad de antígeno necesario en su formulación.

Es importante mencionar que existe una amplia variedad de adyuvantes (ver sección 1.5) y que su uso queda restringido al individuo que recibirá la vacuna. Esto porque algunos adyuvantes pueden generar reacciones adversas en el receptor, es el caso del adyuvante completo de Freund (FCA), el cual ha sido ampliamente utilizado a lo largo del tiempo en animales de laboratorio cuando la disponibilidad de antígeno es

limitada o cuando la vacuna presenta una baja inmunogenicidad, pero que su uso no se ha podido extender más allá debido a su toxicidad (Morris et al. 1999).

Los adyuvantes más utilizados hoy en día en medicina veterinaria son las emulsiones de aceite mineral (agua en aceite o aceite en agua) y los adsorbentes (hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio). En medicina veterinaria se pueden tolerar hasta cierto punto algunos efectos colaterales si mejorar la eficacia es lo que se busca, sin embargo, las emulsiones pudieran no ser adecuadas debido a su bajo nivel de biodegradabilidad y biocompatibilidad (Straw et al. 1985). Las sales de aluminio por su parte no son capaces de inducir una respuesta inmune celular efectiva, y resultan poco eficientes a la hora de proteger contra infecciones de tipo viral (Siel et al. 2014).

Lowenthal et al. (2004) plantean en uno de sus trabajos, usando interferón gamma como adyuvante en vacunas de uso avícola, que resulta probable que los interferones como adyuvantes reemplacen en el futuro a las emulsiones de aceite, ya que estos últimos han reportado ciertas reacciones adversas. No obstante, en su trabajo se menciona que el uso de interferones recombinantes como agregados directos en vacunas pudiera no ser muy práctico, al menos en el área avícola. Esto porque una rápida degradación de las citoquinas *in vivo* requeriría de múltiples dosis de la vacuna.

Una patente encontrada que declara usar interferón alfa como adyuvante, y en bajas concentraciones en diferentes especies de animales, entre ellos bovinos, data del año 1985 y pertenece a Joseph M. Cummins (Estados Unidos, patente N° 4.820.514). Esta patente fue probada para el tratamiento de varios tipos de virus, entre ellos el virus que causa la rinotraqueítis infecciosa bovina, la enfermedad respiratoria bovina o *shipping fever* en inglés, y la diarrea viral bovina. Sin embargo, el interferón usado es interferón alfa humano, y es administrado por vía oral al momento de la vacunación y no agregado directamente a la vacuna, y por lo demás, la patente se encuentra hoy en día caducada. Por otro lado, la información contenida en dicha patente ha sido de gran utilidad para determinar el modo de administración que se pretende presentar en este proyecto. El propietario declara que 1 UI de interferón por libra de peso de animal serían suficientes para provocar un efecto benéfico, sin embargo, 5 UI por libra de peso no generarían efectos adversos.

Otra patente relevante, pero que no es utilizada para tratamientos en bovinos, pertenece al inventor F. Belardeli (WO 2002083170 A1). En ella se menciona la importancia de los IFN de tipo I, capaces de inducir una respuesta Th1 al ser utilizados como adyuvantes en vacunas. Esta respuesta es la que genera una inmunidad celular capaz de proteger contra futuras infecciones, y este es el tipo de respuesta en el que

la mayoría de las vacunas tienden a fallar a la hora de estimular el sistema inmune. El inventor asegura que una actividad de IFN por sobre los 100.000 UI por dosis de vacuna serían necesarios para estimular adecuadamente este tipo de respuestas. En humanos el rango de actividad varía entre  $1 \cdot 10^6$  y  $6 \cdot 10^6$  UI por dosis, sin resultar esta cantidad tóxica.

Es importante entonces mencionar, antes de entrar a analizar la oferta y la demanda, que no existen competidores directos de ningún tipo en el mundo para el interferón alfa bovino recombinante como adyuvante para vacunas veterinarias.

## **2.2 ANÁLISIS DE LA OFERTA**

En el análisis de la oferta se estudiará el contexto nacional e internacional del interferón bovino recombinante, que si bien no se produce con los fines presentados en este proyecto, sí existen productores del mismo con fines analíticos.

### **2.2.1 Contexto nacional**

De acuerdo al Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) un producto farmacéutico de uso exclusivamente veterinario, o medicamento de uso veterinario, es cualquier sustancia natural o sintética, o mezcla de ellas, que se administre a los animales con el fin de prevenir, tratar o curar las enfermedades o sus síntomas, además de: restablecer, corregir o modificar las funciones fisiológicas, estimular la inmunidad activa, otorgar inmunidad pasiva, diagnosticar enfermedades.

El SAG es la única autoridad encargada en el territorio nacional de la inspección, fiscalización y registro de los medicamentos de uso veterinario, a través de la verificación de su seguridad, calidad y eficacia, con el fin de proteger la salud de los animales, la salud pública, el ambiente y promover el bienestar animal. En este contexto las funciones del SAG se centran en:

- Registro de medicamentos veterinarios, renovación y modificaciones posteriores.
- Evaluación de solicitudes especiales de uso de medicamentos veterinarios.
- Evaluación de solicitudes de elaboración de autovacunas.
- Control de serie de los productos biológicos.

- Disposición y uso de medicamentos importados.
- Autorización de laboratorios farmacéuticos.
- Autorización de establecimientos importadores y de locales de expendio.
- Emisión de certificados de libre venta de medicamentos.

Actualmente en los registros de medicamentos del SAG no se encuentran medicamentos que contengan interferones.

La información relativa a los productos que se encuentran en proceso de evaluación y aquella que es presentada por las empresas para obtener una autorización, es confidencial.

En cuanto a la producción de vacunas de uso veterinario, el Servicio Nacional de Aduanas provee de informes de comercio exterior en los cuales presenta secciones de exportaciones e importaciones. Se encuentra el monto FOB (en miles de dólares) de las exportaciones chilenas y el monto CIF (en miles de dólares) de las importaciones chilenas.

Las exportaciones en dólares registradas por el Servicio de Aduanas de vacunas de uso veterinario durante el periodo 2012 -2015 se muestran en la Figura 2.1.

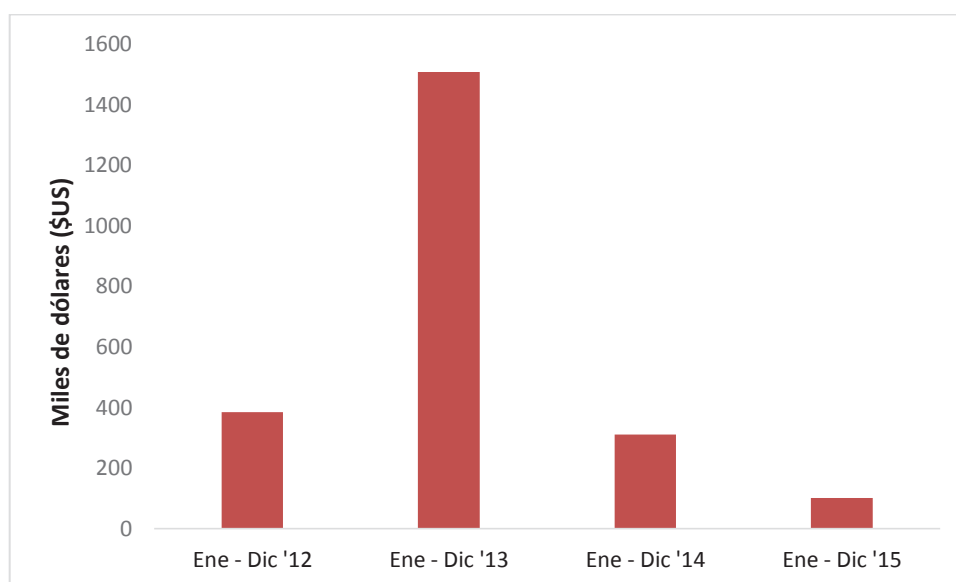


Figura 2.1: Monto de las exportaciones chilenas de vacunas de uso veterinario para el período 2012-2015. (Información extraída del Servicio de Aduanas)

No obstante, y según los registros de la Organización Mundial para la Salud Animal (OIE), Chile no es un país productor de vacunas para uso en bovinos, más bien, su fuerte es la producción de vacunas para salmones. Es por eso que se puede observar en 2013 un aumento significativo en las exportaciones de vacunas veterinarias (figura 2.1) debido al virus SRS, que sólo en aquel año, ocasionó pérdidas por US\$ 100 millones en el país. Este aumento tan drástico en las exportaciones de vacunas permite inferir que en el país existe una capacidad de producción que no está siendo aprovechada cada año, lo que podría ser un factor determinante a la hora de justificar la ubicación de una planta productora de interferón.

El Centro de Comercio Internacional (ITC) ha desarrollado un conjunto de herramientas en línea para que el comercio mundial sea más transparente facilitando así el acceso a los mercados. Las herramientas son las siguientes: Mapa de Comercio, Mapa de Acceso a los Mercados, Mapa de Inversiones, Comercio Competitividad Mapa, Mapa de Normas y Mapa de Adquisiciones.

Los datos están disponibles para todos los países con el fin de ponerlos al tanto de los análisis de mercado, para que usuarios de los países desarrollados, países en vías del desarrollo, y los países menos desarrollados sean capaces de acceder a todos los datos de forma gratuita, gracias al apoyo del Banco Mundial, la Comisión Europea y Donadores de Fondo Fiduciario del ITC.

El Mapa de Comercio (Trade Map) proporciona, en forma de tablas, gráficos y mapas, indicadores de desempeño exportador, de demanda internacional, de mercados alternativos y de mercados competitivos, así como un directorio de empresas importadoras y exportadoras.

A partir de esta fuente se pueden conocer en detalle los países a los cuales Chile exporta sus productos, y desde los cuales los importa. En la Tabla 2.1 se muestran los países que importan vacunas veterinarias desde Chile y el volumen de importación en miles de dólares.

Tabla 2.1: Principales países importadores de vacunas veterinarias producidas en Chile (Centro de Comercio Internacional).

Importadores	Valor importado en 2011	Valor importado en 2012	Valor importado en 2013	Valor importado en 2014	Valor importado en 2015
<b>Mundo</b>	896	383	1.541	310	100
<b>México</b>	0	0	0	0	55
<b>Países Bajos</b>	10	29	0	0	26
<b>Honduras</b>	0	0	0	115	20
<b>Argentina</b>	835	0	0	0	0
<b>Bolivia</b>	44	30	0	0	0
<b>Noruega</b>	0	0	1.06	0	0
<b>Paraguay</b>	0	7	0	0	0
<b>Perú</b>	0	285	466	195	0
<b>España</b>	7	0	0	0	0
<b>Estados Unidos de América</b>	0	15	16	0	0
<b>Uruguay</b>	0	17	0	0	0

\*Valores entregados en miles de dólares.

Al realizar una comparación entre la Tabla 2.1 con la Figura 2.1 en el año 2013, se puede apreciar que el principal país importador ese año fue Noruega, que coincide con ser el primer país productor de salmones en el mundo (Aqua, 2014).

En cuanto a las importaciones (en dólares) registradas por el Servicio de Aduanas de vacunas de uso veterinario durante el periodo 2012 -2015, que se pueden apreciar en la Figura 2.2, queda en evidencia que Chile es un país mayormente importador de vacunas veterinarias, y no un productor de éstas.

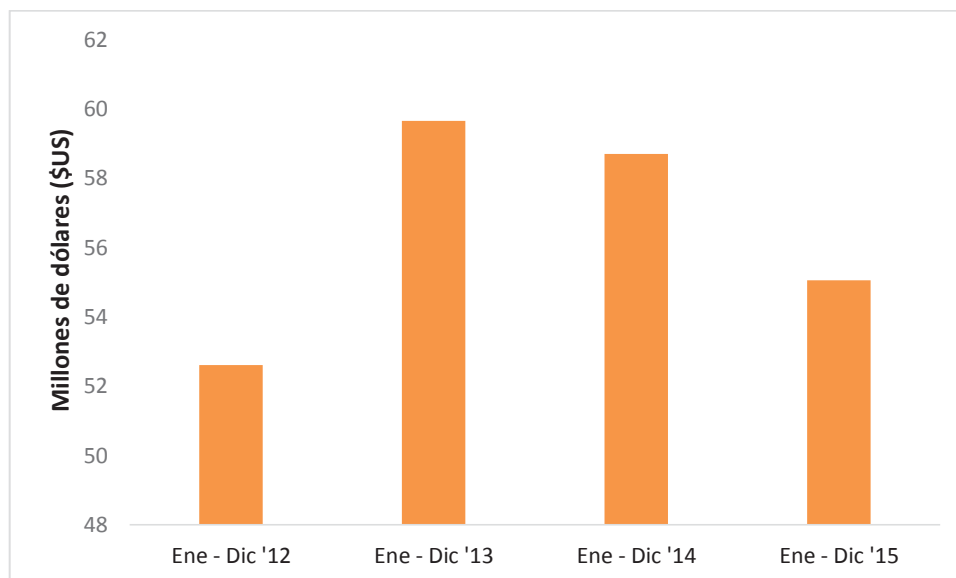


Figura 2.2: Importaciones chilenas de vacunas de uso veterinario período 2012-2015. (Servicio de Aduanas).

Lamentablemente, el Servicio Nacional de Aduanas no provee información específica sobre el tipo de vacunas que importa el país, pero se sabe, por conversaciones con expertos del área, que el rboIFN- $\alpha$  no se ocupa en el ganado chileno, por lo que no existe oferta del mismo en el mercado nacional.

### 2.2.2 Contexto internacional

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos está encargada de proteger la salud pública mediante la regulación de los medicamentos de uso humano y veterinario, vacunas y otros productos biológicos, dispositivos médicos, el abastecimiento de alimentos en el país, los cosméticos, los suplementos dietéticos y los productos que emiten radiaciones, entre otros. Cualquier medicamento que proyecte lanzarse al mercado debe ser evaluado por esta institución, la cual lleva un registro de todos los medicamentos para uso veterinario y humano en Estados Unidos.

En cuanto a los interferones, existe una amplia oferta de productos en el ámbito de la medicina humana, sin embargo, no existen registros de interferón para su aplicación en bovinos.

En la literatura sólo se han encontrado 3 marcas de medicamentos que han declarado contener interferón para su uso en bovinos. Estas marcas son: Agriferon, de Immuno Modulator Laboratories, Inc. SENTINEL, de CIBA-GEIGY Co., e INTERCEPTOR, de



Genentech, Inc. De los tres, sólo Agriferon es interferón humano y ha sido utilizado en tratamientos para bovinos, los otros dos se muestran sólo bajo el nombre de “interferón bovino” sin poder determinar de qué tipo es. No obstante, Genentech, Inc. ha desarrollado interferón alfa bovino recombinante, al menos para usos investigativos (Babiuk et al. 1987). Actualmente las tres marcas se encuentran descontinuadas, siendo la última, SENTINEL, en 1994. No existe información relativa al motivo del término en la producción de estos medicamentos, ni de si alguna vez llegaron a usarse en la industria.

Al ser consultado el Dr. Prof. Marco A. Muñoz de la Universidad de Concepción, experto en veterinaria productiva en bovinos, acerca del uso de rboIFN- $\alpha$  en la industria ganadera, éste declaró que no se produce actualmente en el mundo para ser usado como medicamento.

## **2.3 ANÁLISIS DE LA DEMANDA**

En esta sección se pretende estudiar la situación sanitaria actual del ganado bovino en Chile y en los principales países productores de vacunas bovinas en Latinoamérica. Además se identificarán las enfermedades más relevantes de tipo viral, y que despiertan un mayor interés para su control y/o erradicación en la industria bovina regional, con el objetivo de proyectar una demanda en la cantidad de vacunas en los próximos 10 años.

### **2.3.1 Situación sanitaria animal nacional**

El SAG como entidad garante de la sanidad animal del país, ha desarrollado diversos programas que, por una parte, apuntan al control y/o erradicación de enfermedades de importancia socio económicas, y por otra, mantienen una vigilancia epidemiológica que permite detectar la presencia de algún evento sanitario importante; ya sea la introducción de una enfermedad no presente o el cambio de patrón epidemiológico de alguna enfermedad ya presente en el país.

La información recolectada en dichos programas permite disponer de datos actualizados que respaldan el estatus sanitario del país referente a las principales enfermedades que afectan a los animales, en concordancia con las recomendaciones definidas por la Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE.

En la Tabla 2.2 se muestra la lista de enfermedades de denuncia obligatoria en Chile. Este listado se encuentra establecido en el Decreto Exento N° 389 del 14 de

noviembre del 2014, que establece las enfermedades de declaración obligatoria para la aplicación de las medidas sanitarias correspondientes. Tal como lo indica el RRA N° 16, Ley de Sanidad Animal, los dueños o tenedores de animales, los Médicos Veterinarios e Ingenieros Agrónomos del Ministerio de Agricultura, los Médicos Veterinarios que actúen en el ejercicio de su profesión, los Médicos Veterinarios, los Inspectores Municipales y de mataderos, los miembros del Ejército y Carabineros y, en general, todos los Jefes de Servicios Públicos en que se emplee ganado de cualquiera especie deben denunciar al SAG la sospecha de enfermedades contagiosas que conforman la lista de Enfermedades de Denuncia Obligatoria (EDO).

Tabla 2.2: Enfermedades de denuncia obligatoria para bovinos en Chile.

#### Bovinos

Enfermedad	Estado
Anaplasmosis bovina	Nunca
Babesiosis bovina	Nunca
Campilobacteriosis genital bovina / vibriosis	Presente
Carbunco sintomático	Presente
Dermatosis nodular contagiosa	Nunca
Diarrea viral bovina	Presente
Encefalopatía espongiiforme bovina	Nunca
Fiebre catarral maligna	Nunca
Hemoglobinuria infecciosa de los bovinos	Presente
Hipodermosis del ganado	Nunca
Leucosis bovina enzoótica	Presente
Mastitis enzoótica	Presente
Pleuroneumonía contagiosa bovina (o	Nunca
Pulmonía infecciosa de los terneros	Presente
Rinotraqueítis infecciosa bovina /	Presente
Septicemia hemorrágica	Presente
Teileriosis	Nunca
Tricomoniasis bovina	Presente
Tripanosomosis (transmitida por la mosca	Nunca
Tuberculosis bovina	Presente
Viruela de los bóvidos (cowpox)	Nunca

Fuente: Situación Sanitaria Nacional 2013. Servicio Agrícola y Ganadero.

Chile es uno de los países miembro de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Una de las misiones de la OIE es garantizar la transparencia y mejorar el conocimiento de la situación de la salud animal en el mundo. Entre las obligaciones formales de los países miembros de la OIE está la presentación de información sobre la situación de las enfermedades animales que corresponda – incluidas las zoonosis presentes en su territorio – de la manera más oportuna y transparente. Se ha establecido una lista única de enfermedades de los animales terrestres y acuáticos de declaración obligatoria para este fin, y para llevar a cabo su mandato, la OIE ha creado

y gestiona el Sistema Mundial de Información Zoonosaria (WAHIS), proporcionando información sobre 117 enfermedades en la lista de 2015.

Las enfermedades de la lista de la OIE, presentes en el país, y el número de casos, pueden observarse en la Tabla 2.3. Esta tabla muestra los casos de EDO reportados en el país durante el año 2014, así como también las muertes asociadas a ellas.

Tabla 2.3: Resumen de las enfermedades de la lista de la OIE presentes en Chile para 2014.

Enfermedades de la lista OIE	Unidades de medida	Susceptibles	Casos	Muertos	Destruídos	Sacrificados
<b>Carbunco bacteriano (dom)</b>	Animales	65	5	5	-	-
<b>Paratuberculosis (dom)</b>	Animales	1.92	2	2	-	-
<b>Brucelosis (dom)</b>	Animales	4.065	626	0	-	303
<b>Echinococcus granulosus (infección) (dom)</b>	Animales	866.356	172.683	0	0	172.686
<b>Tuberculosis bovina (dom)</b>	Animales	442.58	4.247	0	0	4.247
<b>Rinotraqueitis infecciosa bovina/ vulvovaginitis pustular infecciosa (dom)</b>	Animales	4.835	37	2	0	0
<b>Diarrea viral bovina (dom)</b>	Animales	9.071	55	2	0	0

Las enfermedades de tipo viral que aparecen en la lista serían la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), y la diarrea viral bovina (DVB). Como se puede apreciar en la tabla, los casos asociados a dichas enfermedades son pocos, 37 para la rinotraqueitis, y 55 para la DVB. Se hace necesario entonces explorar más allá de las fronteras del país para conocer la situación sanitaria en América Latina.

### 2.3.2 Situación sanitaria en América Latina

La Sede de la OIE, en base a las recomendaciones de las Comisiones Regionales y a una serie de resoluciones adoptadas en Mayo de 2004 por el Comité Internacional, elaboró una lista única de enfermedades de denuncia obligatoria para animales terrestres y acuáticos, de modo que pudieran ser sustituidas las antiguas listas que se disponían. Las EDO relativas al ganado bovino se muestran en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4: Enfermedades de denuncia obligatoria según la OIE para bovinos, 2016.

<b>Enfermedad</b>
Anaplasmosis bovina
Babesiosis bovina
Campilobacteriosis genital bovina
Dermatosis nodular contagiosa
Diarrea viral bovina
Encefalopatía espongiiforme bovina
Perineumonía contagiosa bovina
Leucosis bovina enzoótica
Rinotraqueítis infecciosa bovina
Teileriosis
Tricomonosis
Tripanosomosis
Tuberculosis bovina

El sitio web de la OIE gracias a su interfaz WAHIS, cuenta con un buscador que permite estudiar la situación sanitaria animal de cada país que se encuentra adscrito a ella. Con dicha herramienta es posible conocer para cada una de las enfermedades listadas por la organización, la cantidad de casos registrados cada año (desde el 2005 a la fecha), la cantidad de animales vacunados, los susceptibles, etc.

Al revisar la cantidad de casos de animales que contraen alguna enfermedad viral a lo largo de los años, es posible apreciar que el número de casos es ínfimo. Por ejemplo, uno de los eventos sanitarios más importantes de los últimos años fue el rebrote de fiebre aftosa que se produjo en Paraguay en Septiembre de 2011. El país había alcanzado la denominación de “país libre” de fiebre aftosa pocos meses antes, sin embargo, debido al brote que ocurrió ese año, donde sólo se registró un total de 28 casos según cifras de la OIE, Paraguay perdió el estatus de “país libre” lo que le ocasionó cuantiosas pérdidas (ABC Color, 2012). El impacto de la enfermedad se tradujo en la desaparición de 50.000 puestos de trabajo directamente relacionados con la industria, se dejaron de invertir alrededor de US\$ 1.000 millones, y las exportaciones cayeron cerca de un 30%.

Al analizar los casos de animales que contraen enfermedades de tipo viral y que forman parte de las EDO, es posible apreciar una tendencia similar a la que ocurre con el mercado chileno, los casos son bajos. Es por esto que en vez de enfocar el análisis de la demanda directamente con las cifras de los animales enfermos, es más adecuado analizar la cantidad de animales vacunados contra cada enfermedad,

debido a que el producto que se pretende comercializar es un agregado en una vacuna.

En la Figura 2.3 se puede apreciar la cantidad de vacunas producidas por algunos países latinoamericanos durante el año 2014.

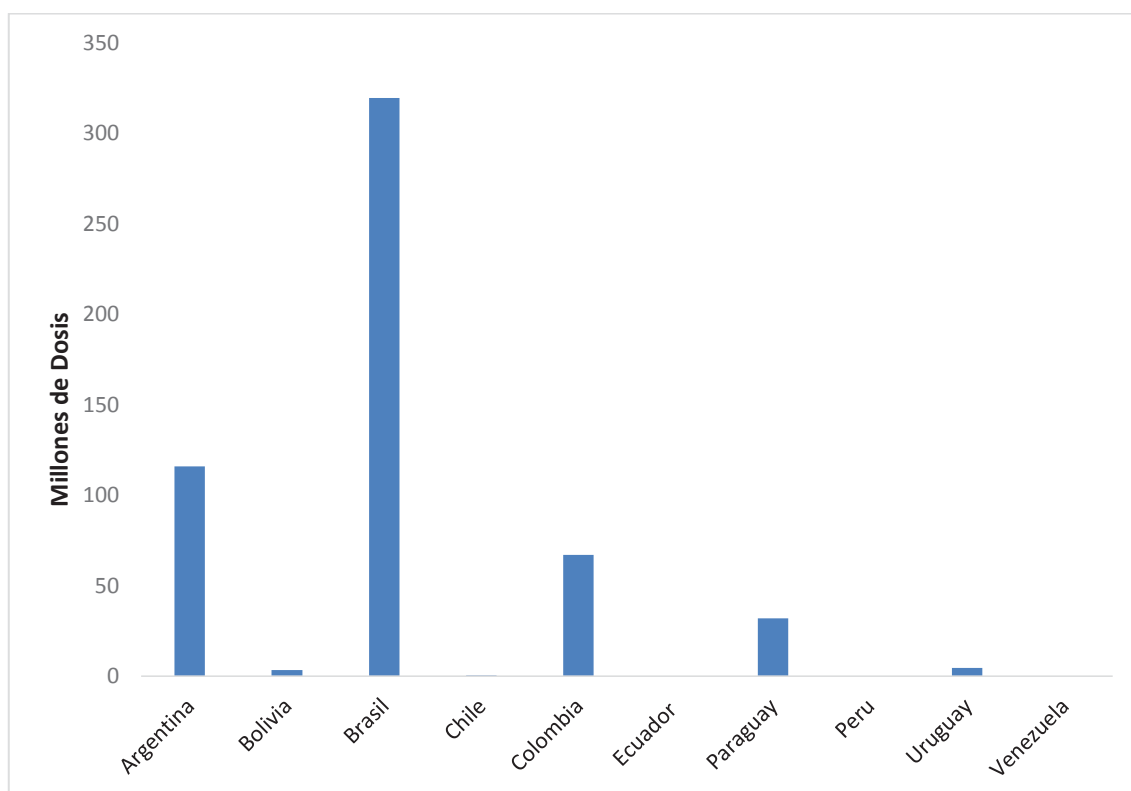


Figura 2.3: Dosis de vacunas bovinas producidas por países latinoamericanos período 2013-2014 (OIE).

Los cinco países con mayor producción de vacunas bovinas en latinoamérica son Argentina, Brasil, Colombia, Paraguay, y Uruguay. Se considerará entonces, para el estudio de los animales vacunados, a estos cinco países y también se incluirá en el análisis a Chile.

Antes de estudiar las enfermedades relevantes para este proyecto en cada país de interés, primero es necesario tener claridad sobre el inventario bovino en estos países.. De la interfaz WHAIS se pueden extraer las cabezas de ganado por país desde el año 2005 hasta 2014, y si consideramos los totales para cada año, se tiene un gráfico como el que se muestra en la Figura 2.4

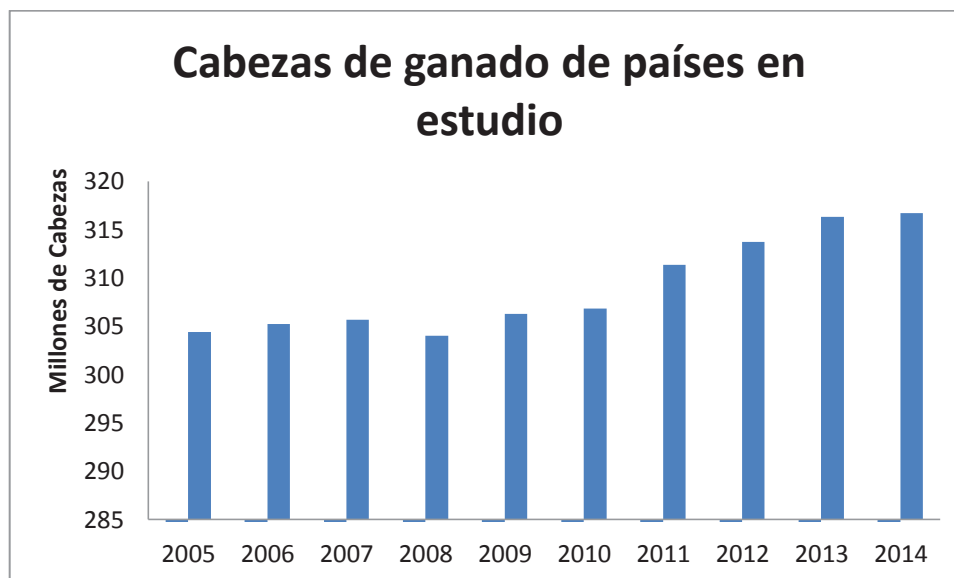


Figura 2.4: Inventario bovino total de los países en estudio (OIE).

La tendencia es claramente al alza, pudiéndose observar que de los 305 millones de cabezas que existían en 2005, casi una década después éstas experimentaron un aumento cercano al 4%, llegándose a las 217 millones de cabezas en 2014. Las proyecciones para el crecimiento de la población bovina se analizarán en detalle en la sección 2.4

Las cuatro enfermedades de tipo viral y que suscitan mayor interés en la región son: rabia, diarrea viral bovina, rinotraqueítis infecciosa bovina, y fiebre aftosa. Se analizará cada enfermedad por separado, y para cada país, con el fin de obtener un porcentaje de animales vacunados, lo que finalmente se traducirá en dosis de vacunas.

### **Rabia**

La rabia es una de las enfermedades listadas en la OIE de denuncia obligatoria. La Fedegan la define como una de las zoonosis más importantes y letales del mundo que puede ser transmitida al hombre por medio de animales silvestres o domésticos.

El tipo de rabia que afecta al ganado bovino es denominada Rabia Paralítica Bovina, y es transmitida principalmente por la mordedura de murciélagos hematofobos.

### *Colombia*

En Colombia existe un proyecto nacional de prevención y control de la rabia de origen silvestre que implica, entre otras medidas, la reducción de murciélagos hematófagos y

la vacunación masiva de bovinos en las zonas de riesgo. La cantidad de animales vacunados durante la última década en Colombia está en torno al 2.5% anual.

#### *Argentina*

En el caso de Argentina, la rabia parálitica es endémica de la zona norte del país. Según datos del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), entre los años 2002 y 2007 el promedio anual de animales infectados fue de 1940. Entre las medidas de control aplicadas en el país no se encuentra la vacunación masiva del ganado, debido a que los costos implicados en la vacunación podrían superar a las pérdidas ocasionadas por la propia enfermedad. El registro histórico de las vacunaciones a bovinos en la Argentina es mínimo.

#### *Paraguay*

Para el caso de Paraguay, el país cuenta con el Programa Nacional de Lucha contra la Rabia Bovina, que se encuentra normada bajo el Decreto N° 1396/1978 en el cual se especifican las medidas sanitarias para combatir la enfermedad, que entre otras, incluye la reducción del vampiro portador de la enfermedad, y la vacunación masiva de carácter obligatorio de bovinos en las áreas que el Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal (SENACSA) considere de riesgo, así como también la vacunación voluntaria de ganado en las áreas de bajo riesgo, previa aprobación del SENACSA. De acuerdo a los registros de vacunaciones que posee la OIE, la cantidad de bovinos vacunados contra la Rabia Bovina en Paraguay es alrededor del 6% anual para la última década.

#### *Brasil*

Brasil cuenta con un Programa Nacional de Control de Rabia para Hervíboros que entre las medidas de control figura la vacunación de los animales en las zonas donde la rabia es endémica. El Ministerio de Agricultura Pecuaria y Abastecimiento de Brasil reportó durante 2002 – 2012 cerca de 500 millones de cabezas de ganado vacunados (no sólo bovinos). Además, durante 2013 y 2014 se registraron cerca de 1500 casos de bovinos infectados (Fahl et al. 2015; Ministerio da Agricultura, 2012). El porcentaje de bovinos vacunados en el período 2005 – 2014, según los registros de la OIE, se encuentra alrededor del 27,3% anual.

### *Chile*

Chile ha desarrollado un efectivo plan de control de la rabia. Esto se ha traducido en que no han habido registros de casos en bovinos desde 1983. Tampoco se llevan a cabo vacunaciones del ganado en país.

### *Uruguay*

Con respecto a Uruguay la vacunación del ganado está bajo la supervisión del Ministerio de Ganadería y Agricultura, cuyo sitio web no cuenta con datos actualizados sobre los programas de vacunación. La cantidad de bovinos vacunados, según los registros de la OIE, en la última década es mínima y no supera el 0,2% anual.

### **Fiebre Aftosa**

Para el control y erradicación definitiva de la fiebre aftosa en América, se creó el Plan Hemisférico de Erradicación de la Fiebre Aftosa (PHEFA) en el año 1988 por parte de el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA) en conjunto con la Organización Mundial de la Salud (OMS), que propone medidas para la prevención, control y erradicación de la enfermedad. La ejecución del plan en la región de América del Sur se divide en tres grandes niveles: un plan regional, los proyectos subregionales y los programas nacionales de salud animal. Para facilitar aún más el conocimiento de las medidas que se llevan a cabo, el continente se dividió en tres grandes grupos:

- Cono sur que comprende a Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay y los estados de Brasil de Río Grande do Sul, Santa Catarina y Paraná.
- Área andina conformada por Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela, aunque algunos sectores de estos países están incluidos en el Área Amazónica.
- Área amazónica y Brasil.

La Organización Panamericana de la Salud (OPS), identifica las regiones de Sudamérica según si están libres, o no, del virus y si en dicha región se llevan a cabo, o no, estrategias de vacunación.

La PANAFTOSA desarrolla año a año un boletín informativo, disponible en su sitio web, con la situación actualizada de los planes de erradicación de la Fiebre Aftosa en la región. Se detalla la información para cada país, y la revisión de ésta se realizará para los países que están bajo estudio.



### *Chile*

Chile se encuentra libre sin vacunación desde 1981., según los registros del SAG, por lo que no se prevé vacunación para el ganado en las proyecciones para 2026.

### *Brasil*

Brasil en la actualidad, según los registros de la PANAFTOSA, mantiene un 77% de su territorio como zona libre de Fiebre Aftosa. Sólo una pequeña fracción de ese 77% se encuentra libre sin vacunación mientras que el 33% restante del país, que corresponde a la parte noreste del territorio, se encuentra con estatus no reconocido. El país cuenta hoy en día con tres programas distintos de vacunación, que según estimaciones en base a la información proporcionada por la PANAFTOSA, durante la última década se habrían vacunado sobre el 95% de las cabezas de ganado en el país cada año.

### *Argentina*

En cuanto a Argentina, el país se encuentra libre de fiebre aftosa, sin embargo, la zona norte califica como libre con vacunación, mientras que la zona sur se encuentra libre sin vacunación. El SENASA lleva un registro de los animales vacunados desde el 2002 en adelante para todo el país, y en la última década, el porcentaje de bovinos vacunados ha sido cercano al 84% anual.

### *Colombia*

Colombia en gran parte de su territorio se encuentra en la situación de libre con vacunación, esto gracias a su Programa de Erradicación de la Fiebre Aftosa, que de acuerdo a la Ley 395 de 1997 establece la vacunación obligatoria para la totalidad de los bovinos del país. La cual se constituye en dos ciclos anuales de vacunación. Según un informe de 2014 emitido por la OPS, históricamente en Colombia desde el año 2003 hasta el 2014, la cobertura del programa ha superado el 95% del inventario bovino nacional (PAHO, 2015).

### *Uruguay*

Uruguay mantiene su estatus de país libre con vacunación, otorgado por la OIE en 2003 y ratificado en 2014. El plan de vacunación que se lleva a cabo considera la vacunación obligatoria del 100% de los bovinos del país.

## Paraguay

Paraguay fue declarado como país libre de fiebre aftosa con vacunación por la OIE en 2005, denominación que conservó hasta 2011 cuando un brote del virus fue identificado en la región de San Pedro de Ycumandiyú, quitándole el estatus de país libre. Sin embargo, gracias a su programa nacional de erradicación de la fiebre aftosa, que obliga a vacunar al 100% de los bovinos en el país, recuperó en 2013 el estatus de libre con vacunación.

### **Diarrea Viral Bovina**

Esta enfermedad es causada por el virus de ARN *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae* (Rondón, 2005), y puede presentar diferentes manifestaciones clínicas, tales como complicaciones digestivas, respiratorias, reproductivas, entre otras (Odeón, 2016). El mayor problema es el que suscita la existencia de animales persistentemente infectados (PI). Estos animales generalmente contraen el virus antes de nacer debido a la transmisión trasplacentaria. El riesgo radica en que estos animales nacen sanos, y desarrollan un ciclo de vida casi normal aunque con un crecimiento un tanto limitado y baja eficiencia reproductiva. Los PI excretan grandes cantidades del virus contagiando a su entorno. Es por esto que el principal plan de control en los países que están bajo estudio, es la identificación temprana de los animales PI para su posterior remoción.

### **Rinotraqueítis Infecciosa Bovina**

Es una enfermedad causada por un virus denominado *Herpesvirus bovino tipo 1*. Se contagia por diversas vías como respiratoria, digestiva, ocular, venérea (monta). Esta enfermedad es endémica en América Latina y dentro de las medidas de control están la vacunación. Existen varios tipos de vacunas que se pueden separar en 2 grupos: las de virus vivo modificado, y las de virus inactivado. Las primeras, si bien son las que otorgan mejor inmunidad, no son muy seguras ni efectivas debido a la posibilidad de que el virus recupere la virulencia y enferme al animal. Las vacunas con virus muertos son seguras, sobretodo en la vacunación de vacas preñadas, pero generan una respuesta inmune débil por lo que se requiere siempre de revacunaciones. Son además administradas con algún tipo de adyuvante para portenciar la respuesta inmune, por lo que sería una interesante propuesta el añadir interferón en la elaboración de éstas.

En el caso de las enfermedades Diarrea Viral Bovina y Rinotraqueítis Infecciosa Bovina existen bastantes tipos de vacunas, siendo algunas más efectivas que otras. No existen registros exactos de los animales vacunados. Por ejemplo, el SAG

recomienda ciertas medidas para la inmunización por medio de vacunas, pero no existe información sobre la cantidad de animales vacunados, ya que esto depende en gran medida, del criterio del ganadero y de las decisiones que adopte el veterinario del corral.

En su página web, el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en Argentina, posee un documento del 2010 elaborado por un médico veterinario, el Dr. Carlos M. Campero. En él se muestran planes de vacunación tanto para IBR como para DVB. Los planes son diversos, ya que depende de si se van a administrar las vacunas para cada enfermedad por separado, o si se va a administrar una dosis que otorga protección para ambas enfermedades (Campero, 2010). Además, el plan de vacunación depende mucho del tipo de bovino del que se trate. Por lo general, la vacunación está recomendada para crías previo y post destete, y para vaquillonas previo al servicio.

Hacer un estudio acabado sobre el porcentaje de bovinos vacunados para estas dos enfermedades es difícil. Para no sobredimensionar la demanda, sólo se tomará en cuenta la vacuna que cubre DVB-IBR administrada a las vaquillonas, y se asumirá que se administra sólo una vez en la vida por animal.

Debido a que los países involucrados en el estudio no llevan registros anuales actualizados de las existencias bovinas, se pudo determinar en base a información disponible en el INTA, el SAG, FEDEGAN, y FNG un porcentaje de vaquillonas en Chile, Argentina, y Colombia. El porcentaje de vaquillonas entre estos tres países, es de un 17,4% con respecto al total del inventario bovino. Como no existe información para los demás países en estudio, se asumirá el mismo porcentaje.

En resumen, los porcentajes de animales vacunados para cada enfermedad en la última década se encuentran especificados en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5: Porcentajes de bovinos vacunados por enfermedad en la última década en América Latina.

<b>Enfermedad</b>	<b>Porcentaje Vacunado (%)</b>
Rabia	19,25
FA	94,11
DVB	17,4
IBR	17,4

## 2.4 CAPACIDAD Y UBICACIÓN DE LA PLANTA

Para determinar la capacidad de la planta en primer lugar se debe tener claro la cantidad de interferón que se venderá por unidad de vacuna. En la patente de J. Cummins que declara el uso de interferón en bovinos como adyuvante indirecto para vacunas se utilizaron hasta 5 UI por libra de peso de animal, es decir, que si se considera que un bovino pesa en promedio aproximadamente 1200 libras, se necesitarían 6.000 UI por animal. En base a esta evidencia, y considerando aproximadamente que un interferón bovino tiene una actividad específica que ronda los  $10^7$  UI/mg, se requerirían  $6 \cdot 10^{-4}$  mg ó 0,6 ug por animal. Es importante mencionar que este tipo de tratamiento es de “baja dosis”, por lo que analizaremos otra situación.

Babiuk et al. realizaron, a fines de la década de los 80, experimentos en bovinos para tratar el *herpesvirus bovino tipo 1* y una posterior infección con bacteria *P. haemolytica* utilizando interferón alfa bovino recombinante. Encontraron que la dosis adecuada de interferón era de 10 mg por animal. Sin embargo, esta dosis parece ser excesiva, ya que considerablemente menores se han obtenido resultados favorables.

En la patente de F. Belardelli (WO2002083170 A1) que declara el uso de interferones Tipo I como adyuvantes, para vacunas en humanos con el objetivo de potenciar la respuesta tipo Th-1, se habla de que en humanos este mecanismo resulta efectivo en dosis hasta los  $6 \cdot 10^6$  UI por vacunas. Para animales (no especifica qué tipo) se puede usar hasta  $2 \cdot 10^6$ .

Como no hay mayor evidencia al respecto, y entendiendo que se han probado dosis que van desde los 0,6 microgramos hasta más de 10 mg por animal, sin encontrar efectos adversos, consideraremos 0.4 mg de interferón por dosis como referencia. Este valor permitiría llegar a una producción de 25 kg anuales en base al proceso diseñado en los capítulos posteriores.

En segundo lugar se debe conocer el porcentaje de bovinos que se vacunarán para cada enfermedad (revisar porcentajes en la sección 2.3.2)

Y por último, se debe establecer una fracción del mercado a abastecer. En este proyecto se optó por abarcar un 10% del total de las vacunas administradas.

Por lo tanto, en base a la información anteriormente expuesta, el volumen de producción se proyectará para la siguiente década asumiendo dos escenarios posibles; uno optimista, y otro realista.

### 2.4.1 Proyección Optimista

En el escenario optimista se considerará el crecimiento del ganado bovino según las estimaciones hechas por la FAO para el período 1997/99-2030. La FAO estimó que para dicho período, en Latinoamérica y el Caribe, el crecimiento de la masa ganadera se desarrollaría entorno al 1% anual. Considerando el inventario bovino de la última década para los países estudiados, la proyección se vería reflejada tal como muestra la Figura 2.5. El comportamiento se adecuó a una recta cuya ecuación se encuentra en la misma figura, pero que es de la forma:

$$(n^{\circ} \text{ de cabezas}) = m * (\text{año}) + C$$

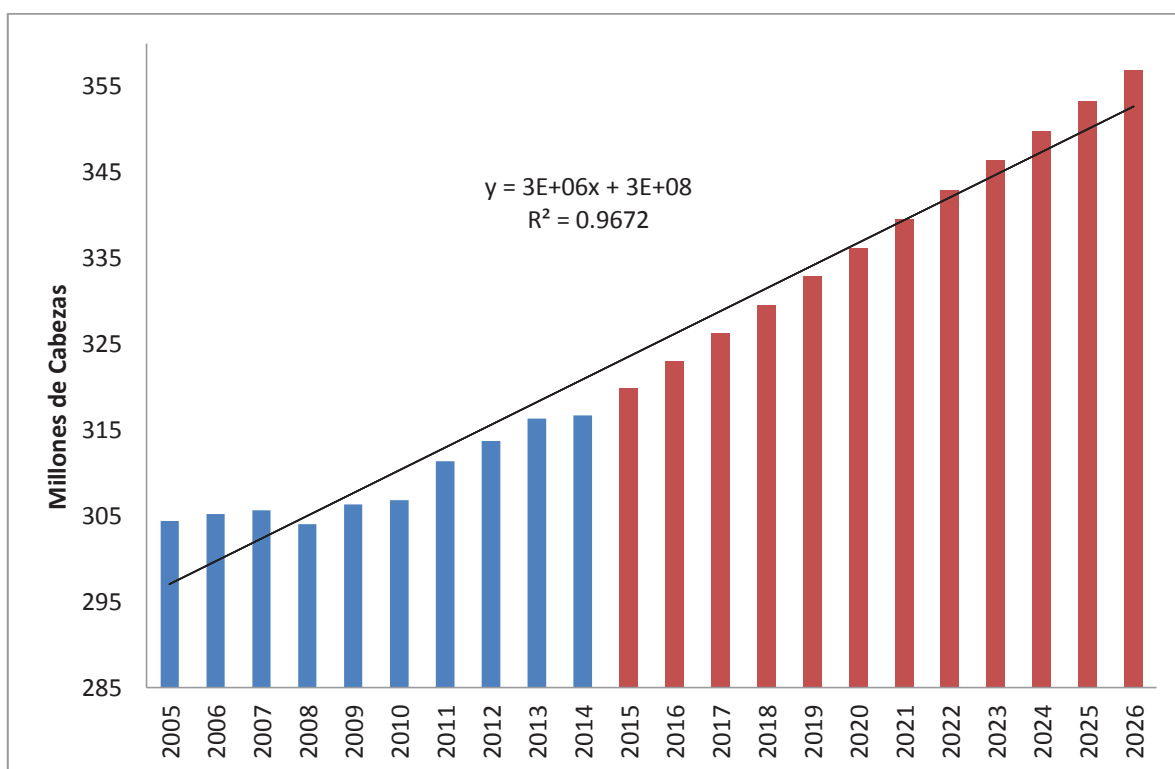


Figura 2.5: Escenario optimista del ganado bovino para 2026.

Considerando este crecimiento, para 2026 se tendría una masa ganadera de aproximadamente 357 millones de cabezas.

Tomando en cuenta los porcentajes de animales vacunados para cada enfermedad especificados en la Tabla 2.5, se tendrá una cantidad de animales vacunados para cada enfermedad. En la tabla 2.6 se muestra la cantidad de animales vacunados para cada enfermedad, y el total de animales vacunados por año.

Tabla 2.6: Animales vacunados para cada enfermedad y en total al año.

<b>Año</b>	<b>Rabia</b>	<b>DVB</b>	<b>IBR</b>	<b>FA</b>	<b>Animales Vacunados</b>
<b>2016</b>	62.185.863	112.419.119	112.419.119	304.016.186	591.040.287
<b>2017</b>	62.807.722	113.543.310	113.543.310	307.056.348	596.950.690
<b>2018</b>	63.435.799	114.678.743	114.678.743	310.126.912	602.920.197
<b>2019</b>	64.070.157	115.825.531	115.825.531	313.228.181	608.949.399
<b>2020</b>	64.710.859	116.983.786	116.983.786	316.360.462	615.038.893
<b>2021</b>	65.357.967	118.153.624	118.153.624	319.524.067	621.189.282
<b>2022</b>	66.011.547	119.335.160	119.335.160	322.719.308	627.401.175
<b>2023</b>	66.671.662	120.528.512	120.528.512	325.946.501	633.675.186
<b>2024</b>	67.338.379	121.733.797	121.733.797	329.205.966	640.011.938
<b>2025</b>	68.011.763	122.951.135	122.951.135	332.498.025	646.412.058
<b>2026</b>	68.691.880	124.180.646	124.180.646	335.823.006	652.876.178

De esos animales vacunados anualmente, sólo el 10% de ellos será el mercado a abarcar, esto se traducirá directamente en una cantidad de dosis. Sabiendo que cada dosis debiera llevar consigo 0.4 mg de interferón, entonces haciendo una multiplicación simple entre el número de dosis y los 0.4 mg se puede estimar una cantidad de interferón total para cada año, como se muestra en la tabla 2.7.

Tabla 2.7: Proyección a 10 años en la producción de interferón.

Año	Animales vacunados (10%)	IFN (kg)
2016	57.330.908	23
2017	57.904.217	23
2018	58.483.259	24
2019	59.068.092	24
2020	59.658.773	24
2021	60.255.360	24
2022	60.857.914	24
2023	61.466.493	25
2024	62.081.158	25
2025	62.701.970	25
2026	63.328.989	25

#### 2.4.2 Proyección Realista

En este escenario, lo que se hizo fue calcular el crecimiento del ganado en la última década, dando como resultado un porcentaje de crecimiento del 0.44% anual. Este porcentaje se encuentra considerablemente por debajo de las expectativas de la FAO, por lo que al proyectar en base a este crecimiento se obtendría un escenario realista. El crecimiento para 2026 en base a este porcentaje se muestra en la Figura 2.6.

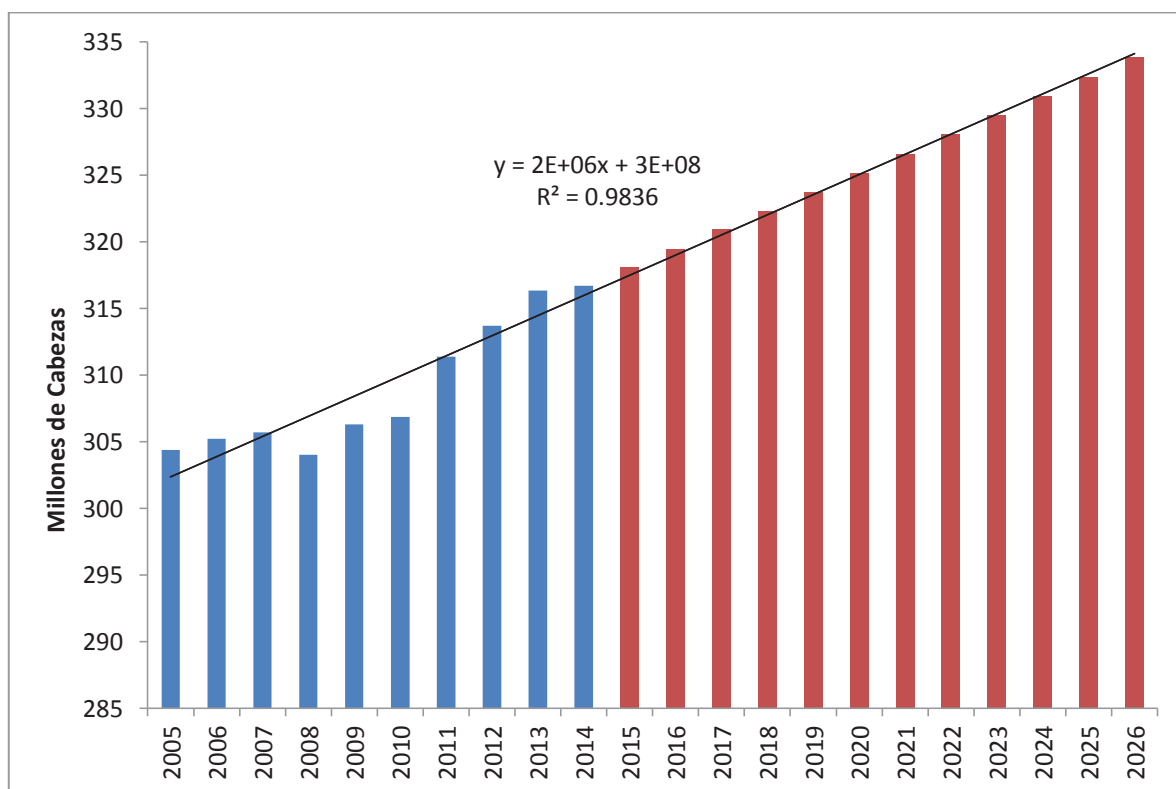


Figura 2.6: Escenario realista del ganado bovino para 2026.

Con este crecimiento se esperaría que para 2026 la masa ganadera en los países estudiados alcance valores cercanos a las 334 millones de cabezas.

Al igual que en el escenario optimista, la cantidad de animales vacunados por enfermedad se ve reflejada en la Tabla 2.8.

Tabla 2.8: Animales vacunados para cada enfermedad y en total al año.

<b>Año</b>	<b>Rabia</b>	<b>DVB</b>	<b>IBR</b>	<b>FA</b>	<b>Animales Vacunados</b>
<b>2016</b>	61.498.189	111.175.947	111.175.947	300.654.264	473.328.400
<b>2017</b>	61.768.781	111.665.121	111.665.121	301.977.142	587.076.166
<b>2018</b>	62.040.564	112.156.448	112.156.448	303.305.842	589.659.301
<b>2019</b>	62.313.542	112.649.936	112.649.936	304.640.388	592.253.802
<b>2020</b>	62.587.722	113.145.596	113.145.596	305.980.805	594.859.719
<b>2021</b>	62.863.108	113.643.436	113.643.436	307.327.121	597.477.101
<b>2022</b>	63.139.705	114.143.468	114.143.468	308.679.360	600.106.001
<b>2023</b>	63.417.520	114.645.699	114.645.699	310.037.549	602.746.467
<b>2024</b>	63.696.557	115.150.140	115.150.140	311.401.715	605.398.552
<b>2025</b>	63.976.822	115.656.801	115.656.801	312.771.882	608.062.305
<b>2026</b>	64.258.320	116.165.690	116.165.690	314.148.078	610.737.779

Realizando el mismo procedimiento de cálculo que en el escenario optimista, es posible obtener la cantidad de interferón a producir en la siguiente década, que se resume en la Tabla 2.9

Tabla 2.9: Proyección a 10 años en la producción de interferón.

<b>Año</b>	<b>Animales Vacunados (10%)</b>	<b>IFN (kg)</b>
2016	56.696.922	23
2017	56.946.388	23
2018	57.196.952	23
2019	57.448.619	23
2020	57.701.393	23
2021	57.955.279	23
2022	58.210.282	23
2023	58.466.407	24
2024	58.723.660	24
2025	58.982.044	24
2026	59.241.565	24



### 2.4.3 Ubicación de la planta

En este punto, se tiene como objetivo analizar y elegir la ubicación que permita mayores ganancias entre las alternativas que se consideran factibles. Estas últimas serán todas aquellas que cumplan con las restricciones impuestas por diferentes factores (técnicos, legales, tributarios, sociales e incluso ecológicos). Para su determinación se deben considerar los distintos factores de localización, aspectos que sirven de criterio para la búsqueda de sitios para la instalación de la planta (Schaffeld, 1984) y son los siguientes:

- Disponibilidad de materias primas
- Disponibilidad de energía
- Disponibilidad de agua en cantidad y calidad
- Disponibilidad de insumos
- Medios y costos de transporte
- Disponibilidad y costos de mano de obra
- Factores climáticos
- Aspectos ecológicos
- Cercanía de los mercados
- Disponibilidad y costos de los terrenos
- Topografías de los suelos
- Aspectos tributarios y legales
- Facilidades financieras
- Comunicaciones
- Posibilidad de desprenderse de los desechos
- Aspectos culturales

Se debe destacar que no siempre es necesario considerar cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, ya que para cada proceso habrá más factores importantes que otros y algunos no intervienen simplemente (Schaffeld, 1984).

De todos los factores mencionados uno de los más importantes a considerar es la cercanía a la materia prima y a los laboratorios farmacológicos. La materia prima más importante es la fuente de carbono e inductor, para el crecimiento de los microorganismos y la producción de la proteína recombinante por inducción. Por otro lado, tomando en cuenta la centralización como un factor importante, las regiones escogidas fueron la región de Valparaíso, la región Metropolitana y la región del libertador General Bernardo O'Higgins.

A continuación, se enumerarán varios factores a considerar a los cuales, a través de un análisis dimensional simple, que consiste en ponderar cada factor en función de su importancia relativa en el proyecto, siendo  $P_j = 1$  (menos relevante) a 3 (más relevante). Luego, cada zona se evalúa respecto de cada factor según los siguientes conceptos (C).

- +1 = Muy conveniente
- 0 = Normal
- -1 = Inconveniente

Después se multiplica la ponderación del factor por el concepto (+1, 0, -1) obteniéndose un puntaje para cada factor ( $P_j \cdot C$ ) y finalmente se suman todos los factores para un mismo lugar o región y se seleccionará aquel lugar que mayor puntaje.

En la Tabla 2.10, se presentan las regiones seleccionadas con los factores y su respectiva ponderación.

Según los resultados obtenidos el lugar más apropiado a priori para ubicar la planta es en la Quinta Región, donde se privilegia la disponibilidad de materia prima, disponibilidad de agua, costos de terreno y transporte, partiendo de la base que se preferiría tener una planta en la capital o en las cercanías de ésta.

Tabla 2.10: Determinación de la ubicación de la planta.

Factores de localización	Ponderación						
	P <sub>j</sub>	V	Región	Región	Metropolitana	VI	Región
		C	P <sub>j</sub> ·C	C	P <sub>j</sub> ·C	C	P <sub>j</sub> ·C
Disponibilidad de materias primas	3	1	3	1	3	1	3
Disponibilidad de energía	3	0	0	0	0	0	0
Disponibilidad de agua en calidad y cantidad	3	1	3	1	3	1	3
Disponibilidad de insumos	2	1	2	1	2	0	0
Medios y costos de transporte	3	0	0	-1	-3	0	0
Disponibilidad y costo de mano de obra	2	1	2	1	2	1	2
Factores climáticos	1	0	0	0	0	0	0
Disponibilidad y costos de terrenos	2	1	2	-1	-2	1	2
Posibilidad de desprenderse de los desechos	1	0	0	-1	-1	1	1
<b>TOTAL</b>			12		4		11

## 2.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 2

ABC Color. Aftosa en Paraguay elimina 50.000 empleos y frena inversión de US\$ 1.000M. En: América economía (en línea). 11 de Mayo de 2012 (referido el 27 de Junio de 2016). Disponible en: <http://www.americaeconomia.com/negocios-industrias/aftosa-en-paraguay-elimina-50000-empleos-y-frena-inversion-de-us1000m>

Aqua. 2014. Principales competidores de Chile: Crecen en acuicultura, bajan en pesca. En: Aqua (en línea) 2 de Junio de 2014 (referido el 5 de Agosto de 2016). Disponible en: <http://www.aqua.cl/reportajes/principales-competidores-de-chile-crecen-en-acuicultura-bajan-en-pesca-2/>

Babiuk, L., H. Bielefeldt, J. Gilchrist. 1984. Effect of recombinant DNA-produced bovine interferon alpha (BoIFN- $\alpha_1$ ) on the interaction between bovine alveolar macrophages and bovine herpesvirus type 1. Department of Veterinary Microbiology, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Canada.

Babiuk, L.A., M.J. Lawman, G.A. Gifford. 1987. Use of recombinant bovine alpha 1 interferon in reducing respiratory disease induced by bovine herpes virus type 1. Antimicrob Agents Chemother. 35(5): 752-757.

Berríos, P. Antecedentes en Chile de enfermedades virales de los animales domésticos. En: Patología Veterinaria (en línea). (referido el 4 de Agosto de 2016). Disponible en: [http://www.patologiaveterinaria.cl/enf\\_vir\\_cl.pdf](http://www.patologiaveterinaria.cl/enf_vir_cl.pdf)

Campero, C. M. Vacunación en bovinos (Parte 1 y 2). En: INTA (en línea). 2010 (referido el 27 de Junio de 2016). Disponible en: [http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-vacunas\\_y\\_vacunacin\\_2010\\_visin\\_rural.pdf](http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-vacunas_y_vacunacin_2010_visin_rural.pdf)

Cummins, J. (2016). US 4.820.514

Deregt, D. Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Diarrea Viral Bovina: Repercusiones en la salud animal y el comercio internacional. En: OIE (en línea) (referido el 27 de Junio de 2016). Disponible en: <http://www.oie.int/doc/ged/D5646.PDF>

Días, L.E. y E. Vitale. Consideraciones generales sobre la rabia parálitica en Uruguay. Bienestar y salud animal: pp. 40-43.

Fahl, W.O., A.I.E. Garcia, S.M. Achkar, E. Mori, K.M. Asano, K. Iamamoto, K.C. Scheffer. 2015. Rabia transmitida por murciélagos en Brasil. Acta biol. Colomb. 20(3):21-35.

FAO. Rabia bovina. En: Food and Agriculture Organization (en línea) (referido el 4 de Agosto de 2016) Disponible en: <http://www.fao.org/in-action/prevencion-rpb/resumen/es/>

FAO. World Agriculture: towards 2015/2030. En: FAO (en línea). (referido el 25 de Julio de 2016). Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/y4252e/y4252e07.htm#TopOfPage>

FEDEGAN – FNG. Análisis del Inventario Ganadero Colombiano. En Huila (en línea). Octubre de 2013 (referido el 7 de Julio de 2016). Disponible en: [http://www.huila.gov.co/documentos/agricultura/CADENAS%20PRODUCTIVAS/Inventario\\_Ganadero\\_Nacional\\_FEDEGAN\\_2013.pdf](http://www.huila.gov.co/documentos/agricultura/CADENAS%20PRODUCTIVAS/Inventario_Ganadero_Nacional_FEDEGAN_2013.pdf)

FEDEGAN. 2014. Rabia bovina. En: Fedegan (en línea) (referido el 4 de Agosto de 2016) Disponible en: <http://www.fedegan.org.co/programas/rabia-bovina>

Gogorza, L., P. Morán, J. Larghi, M. Iglesias, A. Pérez. Vacunación contra la Diarrea Viral Bovina; Fortalezas y limitaciones. En: Producción Bovina (en línea). 2001 (referido el 27 de Junio de 2016). Disponible en: [http://www.produccionbovina.com/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/enfermedades\\_reproduccion/10-diarrea\\_viral\\_bovina\\_vacunacion.pdf](http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/10-diarrea_viral_bovina_vacunacion.pdf)

ICA. Rabia Silvestre. En: Instituto Agropecuario Colombiano (en línea) (referido el 4 de Agosto de 2016). Disponible en: [http://www.ica.gov.co/getdoc/c4c86212-5967-4588-a733-9e7aa53ac2ab/Rabia-Silvestre-\(1\).aspx](http://www.ica.gov.co/getdoc/c4c86212-5967-4588-a733-9e7aa53ac2ab/Rabia-Silvestre-(1).aspx)

INTA. Control y prevención de enfermedades del ganado bovino de pequeños productores del oeste de las provincias de Neuquén y Río Negro. En: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (en línea). Marzo de 2005 (referido el 27 de Junio de 2016). Disponible en: [http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-control\\_y\\_prevenccion\\_de\\_enfermedades\\_del\\_ganado\\_.pdf](http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-control_y_prevenccion_de_enfermedades_del_ganado_.pdf)

Lowenthal, J.W., M. Asif, K.A. Jenkins, L.S. Hilton, W.G. Kimpton, A.G.D. Bean. 2004. Cytokines as adjuvants for avian vaccines. *Immunology & Cell Biology*. 82: 638-643.

Ministerio da Agricultura. Ações de controle da raiva dos herbívoros no Brasil. En: Ministerio da Agricultura (en línea). 2012 (referido el 24 de Junio de 2016). Disponible en:  
[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20dos%20herbivoros/Dados%20controle%20raiva%20herb%C3%Advoros%20Brasil%20ate%202012.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20dos%20herbivoros/Dados%20controle%20raiva%20herb%C3%Advoros%20Brasil%20ate%202012.pdf)

Morris, H.J., C. Martínez, R.T. Abdala, D. Campos. 1999. Adyuvantes inmunológicos. *Rev Cubana Invest Biomed* 18(2): 130-137.

Odeón, A. Diarrea Viral Bovina (DVB). En: *Producción Animal* (en línea). 2006 (referido el 27 de Junio de 2016). Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/enfermedades\\_reproduccion/41-dvb.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/41-dvb.pdf)

OIE. Resoluciones. En: OIE (en línea). Mayo de 2004 (referido el 20 de Junio de 2016). Disponible en: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/E\\_RESO\\_2004\\_WP.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/E_RESO_2004_WP.pdf)

Roitt, .IM. 1991. *Essential immunology*. Blackwell Scientific. 7ed. P.26. Oxford.

SAG. Informe de sanidad animal Chile año 2014. En *Servicio Agrícola y Ganadero* (en línea). 2014 (referido el 20 de Abril de 2016). Disponible en: <http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/sanidad-animal>

SENASA – DNSA. Existencias Bovinas 2015. En: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (en línea). 2015 (referido el 7 de Julio de 2016). Disponible en: <http://www.minagri.gob.ar/site/ganaderia/bovinos/02-Informacion%20sectorial/02=Informes/ existencias bovinas/000001-Existencias%20Bovinas%20-%20SENASA%20-%202015.pdf>

SENASA. Rabia parálítica. En: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (en línea). (referido el 4 de Agosto de 2016). Disponible en: <https://viejaweb.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1790-rabia-paralitica.pdf>

Siel, D., S. Vidal, L. Sáenz. 2014. Principales sistemas de entrega de antígenos en medicina veterinaria y humana. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 29(1): 50-69

Straw, B.E., N.J. Maclachlan, W.T. Cobertt, P.B. Carter, H.M. Schey. 1985. Comparison of tissue reactions produced by *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccines made with six different adjuvants in swine. *Can J Comp Med* 49(2):149-51.

Virbac. Virus de IBR situación en la ganadería colombiana. En: Virbac (en línea). (referido el 27 de Junio de 2016). Disponible en: <https://www.virbac.co/files/live/sites/co-public/files/contributed/PDF/VIRUS%20IBR.pdf>

## CAPÍTULO 3

### SÍNTESIS Y SELECCIÓN DE PROCESOS

La producción a gran escala de interferones se puede realizar tanto por métodos tradicionales como mediante el uso de tecnología de DNA recombinante. Para el caso de interferones humanos, estos se encuentran disponibles desde ambas fuentes en un amplio suministro para la investigación y para ensayos clínicos. Esto no ocurre con la mayoría de los interferones veterinarios.

Se han desarrollado técnicas para la producción de interferones recombinantes de alfa bovino, beta, y gamma. Sin embargo, interferones recombinantes de la especie bovina han tenido una disponibilidad limitada para su uso en investigación veterinaria, y ninguno ha sido aprobado para uso clínico en la actualidad.

El siguiente capítulo presenta las diferentes etapas y operaciones a realizar para la obtención de la proteína rBoIFN- $\alpha$  a partir de la bacteria *Escherichia coli* y la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. La revisión de cada proceso se realizará por separado, sin embargo, ambos procesos de producción constan de cuatro etapas fundamentales que consisten en las etapas de propagación, producción, recuperación y purificación.

#### 3.1 ETAPAS PREVIAS A LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

Se analizarán los diferentes procesos previos a la fermentación dentro de los cuales destacan: preparación y propagación del inóculo, preparación del medio de cultivo, y la adición al biorreactor del medio de cultivo y de inóculo para posterior fermentación.

Es imprescindible y obligatorio tener en todas las etapas cultivos libres de contaminantes, desde el cultivo preliminar hasta el fermentador de producción. Se debe esterilizar el biorreactor, todo el equipamiento, el medio de cultivo y los aditivos.

##### 3.1.1 Preparación y propagación del inóculo

###### Conservación de cepas

*Bancos celulares / Sistema de lotes de semilla*

Los bancos de células son elementos fundamentales en el desarrollo y producción de productos biotecnológicos, ya que constituyen los seres vivos que transforman los sustratos y en condiciones predeterminadas llevan a cabo la síntesis del producto de interés (OMS, 1992). Una de las ventajas en la producción de biotecnológicos/biológicos es la aplicación de un sistema de lote semilla, donde se utilizan subcultivos de células seriadas, las cuales tienen una fuente de partida caracterizada y común para cada lote de producción. Este sistema se utiliza para prevenir los cambios posibles de las propiedades bioquímicas y genéticas que se producen con subcultivos repetidos o de generaciones múltiples. Los fabricantes pueden preparar sus propios bancos u obtenerlos de fuentes externas. Ellos son responsables de asegurar la calidad de su preparación y de la ejecución de los ensayos de control.

#### *Bancos de células primarias (BCP) / Bancos de reserva*

El banco de células primarias es una suspensión homogénea de células iniciales ya transformadas por el vector de expresión, almacenadas en envases individuales y en condiciones que garanticen su estabilidad genética. Para llevar a cabo la preparación de un BCP se realizan los pasos siguientes: selección del clon de mayor expresión; tomar el cultivo en la fase logarítmica de crecimiento; lavar las células, resuspender en el medio de cultivo y adicionar crioprotectores (glicerol, dimetil-sulfóxido); distribuir en viales estériles y herméticos; almacenar las alícuotas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y mantenerlas bajo custodia y control continuo de la temperatura. Además, se debe trabajar en ambientes controlados, bajo gabinetes de seguridad biológica y evidenciar los estudios de estabilidad y de recobrado de semillas y bancos, los cuales deben estar documentados.

#### *Banco de células de trabajo*

El Banco de células de trabajo (BCT) se prepara a partir del (BCP) bajo condiciones definidas de cultivo. Estas células se utilizan directamente en el proceso productivo (ICH, 1997). La cantidad de viales va a depender del uso, tiempo de vida y condiciones de almacenamiento. Cada vez que se utilice un vial, éste debe ser desechado, ya que los cambios de temperatura pueden afectar la estabilidad genética del banco, así como aumentar los riesgos de contaminación.

### **Preparación y Propagación inóculo de *Escherichia coli***

Para empezar la fermentación en el biorreactor se requiere el inóculo. Este se prepara de la siguiente forma. Se saca un vial del banco de trabajo y se deja descongelar a



temperatura ambiente. Posteriormente se siembra en placa Petri en medio LB suplementado con ampicilina (100 mg/L) y se deja crecer durante 24 horas a 37 [°C].

Se selecciona una única colonia y se transfiere a un Erlenmeyer de 500 [ml] con 300 [ml] LB de medio fresco suplementado con ampicilina y un 10% de glicerol, a un pH de 7. El medio se prepara en el momento de uso y se esteriliza en autoclave antes de introducir las células; cuando el medio se enfría se añade el antibiótico. Se incuba toda la noche a 37 [°C] y 200 [rpm] en una incubadora con agitación rotativa (Babaeipour et al., 2010, Khalilzadeh et al., 2008).

Con la finalidad de obtener suficiente inóculo para el biorreactor de producción, deben realizarse precultivos en matraces y fermentadores más pequeños. Si el fermentador se inicia con inóculo insuficiente el crecimiento se retrasa y la velocidad de formación del producto puede llegar a ser insatisfactoria. La concentración óptima del inóculo para el biorreactor de producción determina el número de etapas del precultivo de fermentación que son necesarias realizar previamente.

El tamaño del inóculo es generalmente del orden del 1 – 10% del volumen total del medio. Si es inferior a esta proporción puede existir un periodo de latencia excesivamente prolongado, lo que prolongará el periodo de fermentación. Previo al proceso de fermentación de *E. coli* se debe propagar y preservar el inóculo. Debe preservarse no solo la supervivencia de las cepas sino también la capacidad de formar el producto de interés a lo largo de un periodo de tiempo largo. El objetivo de la preservación es mantener las cepas tanto tiempo como sea posible sin división celular.

### **Preparación y propagación del Inóculo de *Pichia pastoris***

El inóculo inicial, el 5 – 10% del volumen de cultivo inicial, se prepara típicamente en matraces agitados con deflectores que contienen medio “*minimal glycerol*” (MGY) o “*buffered minimal glycerol*” (BMGY). El medio MGY contiene principalmente un medio con extracto de levadura como fuente de nitrógeno (YNB), típicamente 1% de glicerol y pequeñas cantidades de biotina. El medio BMGY contiene peptona y extracto de levadura, lo que puede ayudar a estabilizar las proteínas secretadas. El cultivo se inicia con células de *P. pastoris* derivadas de un vial congelado recuperado del banco de células (definidos en el punto 3.1.1) y se incuba en un agitador orbital a 30 [°C], 250 a 300 rpm, durante 16 – 24 horas hasta alcanzar DO<sub>600</sub> de 2-6 (Ilgen et al., 2004). Este cultivo proporciona inóculo para inóculos sucesivos, por lo que cada fermentador a su vez inocula el siguiente reactor más grande, proporcionando un total de 5 – 10% del volumen de fermentación en cada paso.

El medio de crecimiento en fermentación preferido consiste en un medio de sales basales (BSM) que contiene 4% de glicerol complementado con una solución de elementos traza (Ilgen et al., 2004). La solución de elementos traza se esteriliza por filtración antes de su uso, mientras que el medio BSM es esterilizado con calor en el fermentador. La habilidad de *P. pastoris* para crecer en medios simples, de bajo costo, químicamente caracterizado sin factores de crecimiento derivados de origen animal u otros componentes problemáticos de los medios (por ejemplo, suero) alivia algunas de las preocupaciones de regulación de hoy en día y hace que sea considerablemente más rentable que medios de cultivos complejos definidos químicamente (CD) de células de mamíferos.

Con la finalidad de obtener suficiente inóculo para el fermentador de producción, deben realizarse pre – cultivos en matraces y fermentadores más pequeños. Como se mencionó en el proceso de *E. coli*, se debe procurar iniciar con suficiente inóculo para que el crecimiento en el biorreactor no se retrase. De acuerdo a “la guía del proceso de fermentación de *Pichia pastoris*” se recomienda que el tamaño del inóculo sea del orden del 5 – 10% del volumen total del medio en el fermentador, de ser inferior a esta proporción puede existir un periodo de latencia excesivamente prolongado, lo que prolongaría el periodo de fermentación.

### **3.1.2 Preparación medio de cultivo**

#### **Preparación medio de cultivo para *Escherichia coli***

Al realizar una fermentación lo ideal es saber en forma precisa todo lo que contiene el medio para poder realizar balances de masa apropiados. Para esto es necesario utilizar medios de cultivo de composición definida, proporcionando las condiciones adecuadas para el crecimiento del microorganismo y su multiplicación. La composición del medio de crecimiento de las células debe ser cuidadosamente formulada y supervisada, ya que puede tener efectos metabólicos significativos tanto en las células como en la producción de proteínas. Por ejemplo, la traducción de mRNAs es afectada por la temperatura, así como por los cambios en el medio de cultivo. Los medios químicamente definidos son generalmente conocidos por producir niveles de proteínas más bajos que con medios complejos. No obstante, el uso de medios químicamente definidos en la producción de proteínas recombinantes es una práctica común, porque estos medios alcanzan niveles más consistentes, permiten un control más fácil del proceso, además de simplificar la recuperación en las etapas *downstream* de la proteína recombinante.

En general, la mayoría de los medios utilizados para el crecimiento de *E. coli* tienen como fuente de carbono glucosa; principales sales como fosfato, sodio, potasio, magnesio, amoníaco y sulfatos, hierro; elementos traza de menor importancia y compuestos nitrogenados complejos. Idealmente, los componentes deben ser añadidos al fermentador a la misma velocidad a la que estos se consumen, para evitar la acumulación de nutrientes en niveles tóxicos, mientras que se promueve un buen crecimiento.

Es importante tomar en cuenta que a elevadas concentraciones algunos sustratos se convierten en inhibidores de crecimiento de las células. Concentraciones bien establecidas (Riesenberget al., 1991) para nutrientes tales como, la glucosa a una concentración de 50 [g/L], amonio a 13 [g/L], hierro a 1,15 [g/L], magnesio a 8,7 [g/L], fósforo a 10 [g/L] y zinc en 0,038 [g/l] que inhiben el crecimiento de *E. coli*. Esto explica por qué el sólo aumento de las concentraciones de nutrientes en el medio de cultivo por lotes no produce una alta densidad celular.

Otro factor que necesita atención durante la formulación del medio es la solubilidad de los componentes, en particular al hacer la solución concentrada que se añade en la alimentación por lotes, además es deseable hacer la solución de alimentación tan simple como sea posible mediante la inclusión de suficientes nutrientes en el medio de partida. La alta concentración de glicerol, glucosa, extracto de levadura, y elementos traza necesitan composición de cuidado para evitar la precipitación.

Los medios de cultivo recomendados por los proveedores de sistemas de expresión se pueden mejorar para incrementar la productividad y rendimiento del proceso productivo. Incluso, los proveedores destacan la necesidad de variar las condiciones de crecimiento e inducción, puesto que cambiar uno de estos factores puede influenciar dramáticamente los niveles de expresión y la solubilidad de la proteína de interés, mejorando su producción (Salazar et al., 2001; Novagen, 2006).

El medio de cultivo a utilizar será el mismo que utilizaron Gombert & Kilikian (1997) para producir troponina de pollo recombinante, utilizando *E. coli* BL21(D3) inducida por lactosa bajo control del promotor *lac* UV5. La razón por la cual se optó por este medio, es porque se busca reproducir la cinética de crecimiento e inducción de su trabajo, que se adapta a lo esperado en el presente proyecto. La composición del medio de cultivo se detalla en el Capítulo 4.

## **Preparación del medio de Cultivo para *Pichia pastoris***

Antes de preparar un medio de cultivo para cualquier microorganismo, es necesario entender sus necesidades básicas. Cualquier medio de cultivo debe contener los siguientes factores: agua, carbono, energía, nitrógeno, minerales, controlador de pH y factores de crecimiento.

Los medios sintéticos se preparan utilizando una composición exacta conocida, generalmente a base de compuestos altamente purificados. En la actualidad el trabajo requerido en la preparación de medios se ha simplificado mediante la utilización de medios deshidratados que se obtienen comercialmente, en las variedades deseadas. Sólo se requiere disolver una cantidad conocida en un volumen medido de agua y esterilizar.

Casi todos los medios definidos se acompañan de una fórmula de sales traza que contienen Fe, Cu, Zn, Mn, Co, biotina, etc. Sin embargo, el requisito de la cantidad real de sales traza para el crecimiento celular y la producción de proteínas no está bien estudiada. En la literatura, la concentración de sales traza aplicada varía mucho entre diferentes fórmulas. El medio BSM se acompaña de una solución de sales traza PTM<sub>1</sub>.

Hay varios medios comercialmente disponible para la producción de biomasa a alta densidad celulares de *Pichia pastoris*. Para la síntesis de proteínas recombinantes en fermentadores, el *Basal Salt Medium* (BSM) junto con una solución de sales traza (PTS<sub>1</sub>) son los más utilizados como medio para el crecimiento e inducción.

## **3.2 PRODUCCION DE PROTEÍNA RECOMBINANTE rBoIFN- $\alpha$**

### **3.2.1 Producción de Proteína Recombinante rBoIFN- $\alpha$ en *Escherichia coli***

Debido a la escasa disponibilidad de información acerca de la producción de IFN recombinante mediante el sistema de inducción seleccionado y su producción en biorreactores, el diseño de la etapa de fermentación se basará en lo expuesto en dos ensayos: Primero, el de EL-Baky et al. (2015) sobre producción de rhuIFN- $\alpha$ 2a consensus utilizando autoinducción por lactosa bajo el control del promotor T7. Y segundo, en el trabajo de Gombert & Kilikian (1997) sobre la producción de troponina de pollo en un fermentador a escala piloto usando el mismo sistema de inducción en modalidad CLA.

Se utilizará el medio de cultivo y las condiciones de operación según los resultados de Gombert & Kilikian (1997) y se estimará tener la productividad específica del IFN del trabajo de EL-Baky et al. (2015). En la fase de CLA (inducción) se optará por utilizar glicerol en la corriente de alimentación y no glucosa, dado que este último es un fuerte represor del promotor T7.

#### **a) Modalidad de cultivo**

Para el cultivo utilizando glucosa como fuente de carbono existe el riesgo de que se produzca represión catabólica o que haya acumulación de acetato, que es inhibitorio para el crecimiento celular (Panda, 2003), por lo que durante el CLA que es la etapa de inducción por lactosa, utilizando el promotor T7, se ha optado reemplazar la fuente de carbono de glucosa por glicerol para evitar la represión del sistema de inducción por lactosa. Además se prevé que la acumulación de acetato durante el régimen de CLA serán despreciables gracias al glicerol (Lim et al., 2004).

El proceso de producción se divide en dos fases: Primero, se realiza una fase de crecimiento celular mediante un cultivo por lote para acumular biomasa a una velocidad de crecimiento máxima hasta los 20 [g/L], y segundo, una vez alcanzada la biomasa deseada, se inicia el CLA por medio de la alimentación exponencial de una solución concentrada de glicerol (de 150 [g/L]); la velocidad de adición de glicerol se incrementa exponencialmente para mantener una  $\mu$  constante (y con ello condiciones fisiológicas bien definidas). Además para evitar el sobreflujo metabólico, debe mantenerse una tasa de consumo de glicerol menor al valor umbral que dispara el sobreflujo metabólico (Eiteman & Altman, 2006). Este valor dependerá de la cepa, el medio de cultivo y la temperatura del mismo, pero es común que corresponda a valores de velocidad específica de crecimiento menores a 0.15 [ $h^{-1}$ ] como se mencionó en el Capítulo 1.

No hay un consenso sobre la mejor forma de inducir con lactosa, por lo que este proyecto se atenderá al método más estudiado en bibliografía: inducción por pulsos. La lactosa como fuente de carbono e inductor es beneficiosa para la expresión de proteínas solubles (Tian et al., 2011).

El tiempo de inducción corresponde a todo el tiempo que dure el CLA. Como se mencionó anteriormente, se intentará reproducir la misma cinética que Gombert & Kilikian (2004) por lo que el tiempo de inducción será de 8 horas.

## b) Condiciones de Operación

### *Temperatura*

La temperatura óptima de crecimiento de *E. coli* es 37 [°C], la cual coincide con la temperatura de máxima actividad de la T7 RNA polimerasa, pero no es necesariamente la temperatura óptima de producción de proteínas recombinantes (Donovan et al., 1996). Se ha demostrado que la sobreproducción de proteínas recombinantes en *E. coli* a 37 [°C] induce la formación de cuerpos de inclusión, mientras que a bajas temperaturas se genera un incremento en el plegamiento correcto de las proteínas producidas (Chen et al., 2003; Novagen, 2006). Sin embargo otra forma de evitar que se formen cuerpos de inclusión y de mejorar la solubilidad de la proteína diana es mantener controlada la velocidad de crecimiento específica ( $\mu$ ) lo cual permite que metabolismo de la bacteria se desacelere y la inducción no genere una sobrecarga tanto en la maquinaria transcripcional y traduccional como en la maquinaria secretora (Donovan et al., 1996).

Como este proyecto ya considera una velocidad específica de crecimiento baja (0,15 [h<sup>-1</sup>]) en la fase de producción, para la síntesis de rBoIFN- $\alpha$  se sugiere utilizar una temperatura de 37 [°C] tanto para la fase de crecimiento como para la fase de producción.

### *pH*

Hoffman y colaboradores (1995) en la producción de metaloproteína recombinante en modalidad CLA controlaron el pH mediante la adición de NH<sub>4</sub>OH. El pH puede controlarse con hidróxido de amonio al 25-30%, que además de servir como base es una fuente de amonio fácilmente asimilable, reduciendo con ello la acumulación de iones amonio.

El pH adecuado en una fermentación varía según el tipo de producto que se desee obtener. Aunque normalmente en la producción de interferón recombinante por *E. coli* el pH se mantiene cercano a 7,2.

Por lo tanto, para la producción de rBoIFN- $\alpha$  se sugiere utilizar un pH cercano a 7,2.

### *Oxígeno disuelto*

El oxígeno es parte fundamental en fermentaciones con microorganismos aerobios. El microorganismo requiere cierta cantidad de oxígeno para llevar a cabo su metabolismo, y así poder crecer a una velocidad óptima. Dada la importancia del

oxígeno en las fermentaciones aerobias, es fundamental que la concentración de este elemento en el medio esté, cuando menos, por sobre el valor crítico (medido en % TOD), para que así el crecimiento del microorganismo no esté limitado por la concentración de oxígeno (Doran, 2013). La concentración de oxígeno disuelto se debe mantener más alta que la cantidad mínima que se informó durante alimentaciones por lotes, esto es, más del 6% (Lee et al., 1997).

La tensión de oxígeno disuelto (TOD) común en la producción de interferones recombinantes se mantiene sobre 20 – 30 % de oxígeno disuelto.

#### *Requerimientos de agitación*

La agitación permite mantener un mezclado relativamente homogéneo del medio de cultivo, proporcionando así, una disponibilidad efectiva de los nutrientes en todo el equipo de fermentación para su correcto aprovechamiento. También juega un papel importante en la transferencia de calor desde o hacia el medio de cultivo (Doran, 2013). Pero, una de las funciones más importantes de la agitación en fermentaciones aerobias es proporcionar una transferencia de oxígeno eficiente.

La agitación está fuertemente relacionada con la transferencia de oxígeno, de modo que esta se modifica a medida que cambia la TOD. La velocidad de agitación está limitada por el modelo de reactor que se escoja.

### **3.2.2 Producción de Proteína Recombinante rBoIFN- $\alpha$ en *Pichia pastoris***

Recientemente Tu et al., optimizaron y sintetizaron el gen BoIFN- $\alpha$  en *P. pastoris*. El interferón BoIFN- $\alpha$  optimizado (opti-BoIFN- $\alpha$ ) se expresó con éxito en *P. pastoris* y fue directamente secretado en el sobrenadante del cultivo.

Para lograr la expresión y producción de un alto nivel de bovino recombinante IFN- $\alpha$  (rBoIFN- $\alpha$ ) en *Pichia pastoris* a gran escala es importante desarrollar un protocolo de producción optimizado y reproducible.

#### **a) Modalidad de Cultivo**

La fermentación a altas densidades celulares (sobre 150 [g/L]) es una de las estrategias más empleadas para incrementar los niveles de producción de proteínas recombinantes. Por lo cual, clon *P. pastoris* recombinante productor de rBoIFN- $\alpha$  se cultivará a altas densidades celulares en el biorreactor. En general la estrategia de producción de interferones recombinantes en biorreactores considera dos fases, una de crecimiento de biomasa y otra de producción de la proteína recombinante.

La fase de crecimiento se llevará a cabo en dos etapas: Primero se realizará un cultivo por lote en un medio definido con glicerol como fuente de carbono y energía hasta lograr una densidad establecida previamente, en esta etapa interesa alcanzar rápidamente una alta concentración celular. La segunda etapa es de transición y adaptación en modalidad de cultivo por lote alimentado (CLA), donde se alimentará glicerol de forma exponencial para aumentar más aún la concentración de biomasa y para preparar (desreprimir) las células para la inducción.

Una vez alcanzada la densidad celular establecida previamente se iniciará la segunda fase o fase de producción por inducción. El evento de inducción es crítico, ya que si la inducción se hace en un momento inapropiado (antes de agotarse la fuente primaria de carbono o mucho después), o si el suministro de metanol es excesivo o muy limitado, la respuesta puede ser muy lenta, lo que afecta el desarrollo del cultivo y la expresión de la proteína foránea (Rodríguez et al., 1997). Esta fase se realizará en modalidad CLA, alimentando metanol para inducir completamente el promotor AOX1, la alimentación puede llevarse a cabo en flujo continuo o en forma exponencial; es importante introducir metanol lentamente para adaptar el cultivo al crecimiento con esta fuente, aclimatando el cultivo al metanol e iniciando la síntesis de la proteína foránea. Si el metanol se adiciona muy rápido puede provocar muerte celular, además, el crecimiento en metanol genera mucho calor por lo que el control de la temperatura en esta etapa es muy importante.

Es importante determinar una estrategia de alimentación de metanol óptima para las necesidades de cada proceso de producción de proteínas. Siendo crucial mantener la concentración de metanol por debajo del nivel inhibitorio, debido a que las cepas de *P. pastoris* son sensibles a la alta concentración de metanol y un aumento repentino de metanol puede resultar en una pérdida de la actividad del promotor AOX e incluso la muerte celular (Jahic et al., 2006).

Wu et al., (2011) reportaron una alta eficiencia en la producción de interferón consenso humano recombinante (rcIFN) en cultivos a altas densidades celulares de *P. pastoris*. La fermentación se llevó a cabo en la modalidad de dos etapas descrita anteriormente, controlando la velocidad de alimentación para mantener la concentración de metanol residual bajo niveles inhibitorios. El desarrollo y los resultados de este proceso se describe con mayor detalle en el capítulo 1.

Se sugiere como estrategia de alimentación la técnica desarrollada por éstos autores. La inducción se lleva a cabo una por alimentación con 100% metanol, manteniendo



una concentración residual de metanol en el cultivo de 0,75 %p/v a una velocidad específica de crecimiento igual a 0,026 [h<sup>-1</sup>].

### **b) Medio de cultivo**

El medio más común para la fermentación de alta densidad celular de levadura *P. pastoris* es el Basal Salt Medium (Invitrogen, Co). Sin embargo, según lo informado por otros investigadores, podría no ser el medio óptimo y generar algunos problemas durante su preparación y esterilización debido a desequilibrios de los componentes.

Uno de los aspectos más importantes en la formulación del medio es la fuente de nitrógeno. En el caso de un cultivo con medio BSM, este elemento se incorpora principalmente adicionando hidróxido de amonio, que a su vez permite controlar el pH (Cos *et al.*, 2006).

### **c) Condiciones de operación**

#### *Temperatura*

Una de las variables operacionales más importantes en el cultivo de esta levadura es la temperatura, ya que influye considerablemente en la producción de proteínas recombinantes. El modo de operación estándar para la producción consiste en diseñar estrategias de alimentación adecuadas para la fase de crecimiento e inducción, manteniendo la temperatura a 30 [°C] a lo largo de toda la fermentación (Potvin *et al.*, 2012).

Algunos investigadores han reportado que reducir la temperatura de inducción desde 30 [°C] a 20 [°C] o a una temperatura aún menor favorece la producción de proteínas recombinantes (Li *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2012). Sin embargo, también debe tomarse en cuenta que el proceso de producción de proteína recombinante utilizando *P. pastoris* es altamente demandante de oxígeno (Jahic *et al.*, 2002), por lo tanto, si se disminuye la temperatura (por ejemplo, 20 [°C]), la fase de inducción requeriría de un mayor suplemento de oxígeno para satisfacer el aumento de la velocidad de consumo que tendría el proceso (Minjie & Shi, 2013).

Otros autores como, Gao *et al.*, (2012) en la expresión de interferón porcino (pINF- $\alpha$ ), Tu *et al.*, 2016 en la expresión de rBoIFN- $\alpha$  en *P. pastoris*, mantuvieron la temperatura a 30 [°C] durante todo el proceso de producción sin presentar problemas, ni bajos rendimientos.

Ya que el proceso de producción en este estudio se basará en la experiencia realizada por Wu et al., (2011), la temperatura durante la fase de crecimiento celular se llevará a cabo a una temperatura de 30 [°C] y la etapa de producción (inducción con metanol) se realizará a 26 [°C].

### *pH*

*P. pastoris* crece bien sobre un amplio rango de pH, desde 3 hasta 7, con un mínimo efecto sobre la velocidad de crecimiento. Sin embargo, se ha demostrado un efecto significativo sobre las proteínas recombinantes secretadas, debido a la actividad de las proteasas en el caldo de fermentación (Cregg et al., 1993; Inan et al., 1999; Files et al., 2001).

Como se mencionó anteriormente el uso del medio BSM genera algunos problemas, siendo el principal la precipitación que se produce de algunos de sus componentes cuando el pH está por sobre el valor de 5,5 (Zhang et al., 2006), lo que hace incierta la concentración real de las sales disueltas y la medición de la densidad óptica incorrecta.

En un proceso optimizado de producción de interferón porcino recombinante (rpIFN- $\alpha$ ) desarrollado por Gao y colaboradores (2012) la fase de crecimiento se llevó a cabo manteniendo constante el pH a 6,0 y en la fase de producción el pH se disminuyó a 5,5. Se sugiere mantener estos mismos valores durante el proceso de producción de rBoIFN- $\alpha$ .

El pH se ajustará mediante la adición de hidróxido de amonio al 28%, el cual también es útil como fuente de nitrógeno.

### *Oxígeno disuelto*

Al trabajar a altas densidades celulares, el cultivo se debe mantener no limitado por oxígeno, ya que *P. pastoris* bajo esta condición puede acumular etanol o acetato en el medio de cultivo, metabolitos que resultan ser fuertes represores del promotor AOX (Chiruvolu et al., 1997; Inan et al., 2001; Zhang et al. 2000).

La demanda de oxígeno se incrementa con la densidad celular y conlleva exigencias en la transferencia de oxígeno desde el gas burbujeado al caldo de fermentación. La transferencia se puede mejorar, en un fermentador ya diseñado, incrementando el flujo de aire y la agitación, lo cual produce mayor espuma y la necesaria incorporación de antiespumantes aprobados por la FDA o normas similares, para tal efecto (Jahic et al., 2002). En lo que refiere a la demanda de oxígeno del cultivo, en la literatura los

valores han sido muy variables, ya que el oxígeno disuelto es crítico para la eficacia de la expresión en el sistema *P. pastoris*, se han empleado distintos valores de OD en la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, sin embargo, estos valores siempre han sido mayores al 10%.

Se recomienda mantener la concentración de oxígeno disuelto (DO) en un nivel determinado, valores mayores o igual a 20% de aire saturado para asegurar el crecimiento de la levadura metilotrófica en metanol.

#### *Requerimientos de Agitación*

La velocidad de agitación es un factor esencial en un cultivo microbiano. La variación de la velocidad de agitación no sólo incide en la cantidad de oxígeno disponible, sino también en la disponibilidad de otros nutrientes en el medio, especialmente en la transferencia de éstos desde el medio hacia la célula. Dependiendo de la velocidad de agitación, se conseguirán distintas VTO debido al efecto que ejerce el movimiento del líquido al disminuir el espesor de las películas estáticas que oponen resistencia a la transferencia de masa (Acevedo, 2002).

El parámetro de agitación para maximizar la concentración de oxígeno en el medio varía entre los valores 500 – 1500 [rpm]. Este parámetro es muy importante para solventar las altas demandas de oxígeno en cultivos a altas densidades celulares. Durante la etapa de alimentación con glicerol o metanol al cultivo, si el oxígeno disuelto cae debajo del 20% se pueden hacer ajustes en la agitación o la aireación para mantener el nivel de oxígeno disuelto.

### **3.3 RECUPERACIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE rBoIFN- $\alpha$**

#### **3.3.1 Recuperación de Proteína Recombinante en *Escherichia coli***

##### **a) Recuperación de Biomasa**

La proteína rBoIFN- $\alpha$  se produce en *E. coli* como producto intracelular, por lo que el primer paso para la obtención de la proteína es separar la biomasa celular y los compuestos insolubles del caldo de fermentación, removiendo el líquido extracelular.

La centrifugación y la filtración por membrana son alternativas válidas para la separación de células del medio. Estas técnicas son las más usadas para la recuperación de células a gran escala.

En base a antecedentes bibliográficos, en el proceso de recuperación de *E. coli* productora de interferones, la opción más utilizada es la centrifugación. Por lo tanto la recuperación de biomasa se llevará a cabo por centrifugación.

### **b) Ruptura Celular**

En el caso de proteínas solubles expresadas intracelularmente es necesaria la ruptura de las células que la contienen. Esta etapa consiste en romper la pared y la membrana celular del microorganismo. Existen varios métodos para lograr esto, como son: ciclos de congelación/descongelación repetidos, sonicación, homogenización a alta presión o permeabilización con solventes orgánicos.

Tradicionalmente, la recuperación de proteína recombinante se consigue utilizando técnicas de ruptura mecánica. El rompimiento de bacterias puede ser realizado por cizalla líquida (homogeneizadores a alta presión) o por cizalla sólida (molino de bolas); ambos métodos han demostrado su eficacia en el procesamiento a gran escala (Chisti & Moo-Young, 1986). Además de acuerdo a Bashir et al., (2015) la ruptura de células *E. coli* por homogeneización es una estrategia ideal para la producción a escala comercial de proteínas terapéuticas recombinantes.

Luego las células se rompen por el paso de un disruptor de flujo continuo a 1200 bar de presión. En la bibliografía se muestra que a esta presión la liberación de la proteína de similar peso molecular que el IFN- $\alpha$  es superior al 99 %, con 2 pasos por el homogenizador (Khalilzadeh et al., 2008; Ramya et al., 2012).

Una vez que la célula se rompe y el producto es liberado, los desechos son eliminados por medio de una o varias operaciones como: centrifugación, microfiltración o filtración por presión. Cuando el producto es soluble, como es el caso del rBoIFN- $\alpha$  a producido por inducción con lactosa, éste es recuperado desde la fase ligera de una centrifugación (sobrenadante) o en el filtrado de un filtro.

Las centrifugas son eficientes para la separación de partículas grandes como los restos celulares, de tal manera que cuando se usen para este efecto, deben ser acompañadas de una operación de filtrado para eliminar las partículas más pequeñas; debido a que éstas pueden ocasionar problemas en etapas de bioseparación posteriores, principalmente en las de cromatografías (Tejeda et al., 1995). La remoción de restos celulares una vez homogenizado el medio se llevará a cabo por una centrifugación, posteriormente el clarificado será concentrado a través de una etapa de ultrafiltración.

### **3.3.2 Recuperación de Proteína Recombinante en *Pichia pastoris***

#### **a) Recuperación de Células**

La proteína rBoIFN- $\alpha$  es secretada al medio extracelular por *P. pastoris*. Por lo tanto, la eliminación de biomasa es el primer paso a realizar en un proceso de separación cuando el producto es extracelular.

Para esta operación los equipos más empleados son: la centrífuga de discos, los filtros prensas y los filtros con membranas. Cada uno de ellos tiene ventajas y desventajas según el tipo de producto y tipo de célula, haciendo de la selección un problema difícil. No hay una alternativa única para todos los productos (Tejeda et al., 1995).

Por lo general el cultivo es clarificado por centrifugación a altas velocidades.

### **3.4 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE rBIFN- $\alpha$**

Las operaciones para la purificación final dependen fuertemente de la pureza requerida del producto, distinguiéndose los productos farmacéuticos por su alta pureza en comparación a la de los productos industriales. Para productos de alta pureza, las operaciones de purificación finales son normalmente la cromatografía y la ultrafiltración.

#### **3.4.1 Concentración por Ultrafiltración**

La ultrafiltración es una operación ampliamente utilizada para la concentración de proteínas, que consiste en un sistema de filtración por membranas. La presión de operación típica varía entre 0,2 y 0,5 [Mpa] y el flujo promedio varía entre 20 y 50 [L/m<sup>2</sup>·h] (Tejeda et al., 1995).

Considerando el tamaño de la proteína de interés, se pretende utilizar un sistema de ultrafiltración con una membrana de 10 [kDa]

#### **3.4.2 Separación por Cromatografía**

A continuación se describen brevemente las distintas técnicas para la purificación de rBoIFN- $\alpha$  producida en *P. pastoris* y *E. coli*. Para ambos procesos de producción el protocolo de purificación que se llevará a cabo será el mismo.

### **Cromatografía de intercambio iónico (IEC)**

Esta separación se basa en la diferencia de la carga de las biomoléculas. Puesto que la carga depende del pH y la fuerza iónica, cualquier anión o catión en un soporte puede ser usado para realizar la separación. En la práctica sin embargo, la selección normalmente está determinada por el pH al cual es estable el producto que se desea purificar (Tejeda et al., 1995).

En el caso de rBoIFN- $\omega$  y rhulFN- $\alpha$ 2b se ha reportado el uso de cromatografía de intercambio iónico con soporte Q-Sepharose, para ambos casos el rendimiento de esta etapa tuvo un porcentaje de recuperación cercano al 90% (Tu et al., 2016; Shi et al., 2007).

Siguiendo el proceso de purificación, se realizará una cromatografía de intercambio iónico como primera etapa de purificación. Para el caso del proceso de *E. coli* la corriente de salida desde la ultrafiltración será cargada en la columna cromatográfica, y para el caso de *P. pastoris* la corriente proveniente del clarificado de la centrifuga será cargada a la columna EI de intercambio aniónico Q Sepharose fast flow. En la Tabla 3.1 se muestran las características de la cromatografía seleccionada.

Tabla 3.1: Características del medio Q-Sepharose fast flow.

<b>Propiedad</b>	<b>Descripción</b>
<b>Tipo de intercambio iónico</b>	Ion fuerte
<b>Capacidad iónica total</b>	0,18 – 0,25 [mmol/ml medio]
<b>Límite de exclusión</b>	4x10 <sup>6</sup> (proteína globular)
<b>Matriz</b>	Agarosa reticulada, 6%
<b>Forma de perla</b>	Esférica, 45 – 165 [µm]
<b>Velocidad de flujo</b>	400 – 700 [cm/h]*
<b>Temperatura de trabajo</b>	4 – 40 [°C]
<b>Presión/Especificaciones de flujo</b>	100 kPa, XK 50/30, Altura de la cama 15cm
<b>pH de trabajo</b>	
<b>Estabilidad del pH</b>	1 – 4 (a corto plazo, CIP) 2 – 12 (a largo plazo)
<b>Condiciones de almacenamiento</b>	4 a 30 [°C], 20% Etanol
<b>Estabilidad química</b>	Todos comúnmente usados Buffer acuoso 1 M NaOH 8 M urea 6 M Clorhidrato de guanadina 70% Etanol

### **Cromatografía de exclusión molecular (SEC)**

Este tipo de cromatografía separa moléculas en base a su tamaño molecular; tiene dos aplicaciones principales: remoción de pequeñas moléculas de las proteínas y remoción de proteínas contaminantes de la proteína del producto, la filtración por gel es lenta comparada con otras técnicas cromatográficas (Tejeda et al., 1995).

Se ha reportado el uso de cromatografías de filtración en gel en la purificación de rhIFN- $\alpha$ 2b en una columna Superdex 75 (Shi et al., 2007) y en la purificación de rBoIFN- $\omega$ 1 en una columna de Sephadex G25 (Boué et al., 2000). Para el caso de la purificación rhIFN- $\alpha$ 2b en resina Superdex<sup>TM</sup> 75 el rendimiento de esta etapa tuvo un porcentaje de recuperación de 80%.

### 3.5 RENDIMIENTOS DE PROCESO DE PURIFICACIÓN.

Debido al alto grado de purificación exigido que deben tener las proteína terapéuticas, se han desarrollado varias técnicas para purificar interferón humano, técnicas que muchas veces presentan más de un paso de cromatográficos (Shi et al., 2007; Boué et al., 2000). Sin embargo en la producción de rIFN- $\alpha$  para uso veterinario, las técnicas de purificación son más simples, se presume que es debido a que se presentan menos exigencias en cuanto a la pureza del producto final, pero al ser suministradas a mamíferos aun así deben tener un alto grado de pureza (>95%). Recientemente Tu et al., (2016) expresaron con éxito interferón bovino en cepas de *P. pastoris*, con un alto rendimiento de rBoIFN- $\alpha$  purificado en un paso simple de cromatografía, obteniendo altos rendimientos (200  $\mu$ g/ml) y productos con alta actividad biológica ensayada. Sin embargo, el proceso de purificación no es descrito a cabalidad y se desconocen los rendimientos de cada etapa, por lo que no se cuenta con los datos suficientes para sugerir esta técnica.

En general la información disponible en fuentes bibliográficas sobre la purificación de rBoIFN- $\alpha$  o de otros interferones de uso veterinario, es escasa. Por lo que se optó por utilizar el proceso descrito por Shi et al., en el año 2007, quienes obtuvieron rhuIFN- $\alpha$  altamente purificado con un porcentaje de recuperación global cercano al 64%, uno de los mayores obtenidos en la purificación de rhuIFN- $\alpha$ , además de presentar un producto con una pureza mayor al 95%. En la Tabla 3.2 se presenta el proceso de purificación de interferón, con los respectivos rendimientos de cada etapa del proceso.

Tabla 3.2: Proceso de purificación de rhuIFN- $\alpha$ 2b desde *P. pastoris*.

Pasos de purificación	Rendimiento por etapa (%) de rhuIFN- $\alpha$ 2b	Recuperación (%) de rhuIFN- $\alpha$ 2b
Sobrenadante	100	100
Cromatografía de intercambio iónico	89	90
Ultrafiltración	92	86
Cromatografía de exclusión molecular	80	64

### 3.6 FORMULACION FINAL DE PROTEÍNA RECOMBINANTE rBoIFN- $\alpha$

Conservar íntegramente cualquier proteína es esencial. Más si se trata de una que posee actividad biológica. Las proteínas son susceptibles de alteración. Conservarlas bajo condiciones inadecuadas puede conllevar a pérdidas de actividad y dejar a la



proteína incapacitada para realizar su función. Estas alteraciones pueden ser a nivel de su estructura terciaria, como desplegamiento, y/o en su estructura primaria, como oxidaciones, proteolisis, entre otras (Lipiäinen et al., 2014). Es por eso que una correcta formulación de la proteína asegurará que ésta mantenga sus propiedades en el tiempo, reduciendo los riesgos que implican el almacenamiento, transporte, manipulación, etc.

Para determinar una formulación óptima es necesario llevar a cabo estudios de estabilidad, lo cual implicaría un alza en los costos y en los tiempos de producción. Normalmente se escogen formulaciones ya establecidas.

### **Excipientes**

El primer paso para llevar a cabo la formulación es la elección de un buffer adecuado. Existen diferentes opciones, los más típicos son histidina, citrato, acetato, Tris-aminometano, fosfato, entre otros. Cada uno con diferentes pKa.

El interferón alfa pierde actividad bajo pH 4, y se ha determinado que la estabilidad óptima es a pH 7 ( Li et al., 2012). Los interferones comerciales normalmente son formulados con buffer de fosfato.

Como normalmente se escogen los excipientes en base a formulaciones ya probadas, en este proyecto se optará por tomar la formulación de un interferón alfa 2b humano comercializado bajo el nombre de Intron A por la compañía Merck. La elección de esta formulación se debe a que es sencilla, segura para la mayoría de las vías de administración de una vacuna, y finalmente es una de las formulaciones que mayores tiempos de conservación permite (hasta 3 años).

La formulación está detallada en la Tabla 3.3, y es en referencia al producto Interferón Humano Alfa 2b.

Tabla 3.3: Formulación de Interferón humano alfa 2b.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
<b>IFN-<math>\alpha</math>2b</b>	38-192 $\mu$ g
<b>Glicina</b>	20 mg
<b>Fosfato de sodio dibásico</b>	2.3 mg
<b>Fosfato de sodio monobásico</b>	0.55 mg
<b>Albúmina humana</b>	1.0 mg
<b>Solvente (agua para inyecciones)</b>	1.0 mL

### **Esterilización**

El producto se esterilizará por medio de filtros de 0,22  $\mu$ m debido a que éstos han probado ser efectivos en la producción de interferón alfa. Además, son capaces de retener todo tipo de microorganismos patógenos.

### **Envasado**

El envasado de este tipo de productos generalmente se realiza mediante equipos dosificadores altamente automatizados. Lo común en productos como interferones es que se envasen en ampollas de vidrio correctamente esterilizadas.

### **Liofilización**

Cuando se busca una estabilidad de larga duración, la liofilización puede resultar adecuada para la formulación. El mantener el producto en un estado sólido retrasa las reacciones de degradación de las proteínas, debido a la disminución en el contenido de agua. No obstante, el someter a la proteína a procesos de liofilización puede desnaturalizarla, por ende, se necesita de excipientes encargados de otorgar una mayor estabilidad.

### **Etiquetado y Almacenamiento**

El etiquetado del producto final ha de ser bajo las normativas que se encuentren vigentes en cada país en el cual va a ser comercializado.

Con respecto al almacenamiento, ocupando las mismas recomendaciones del medicamento Intron A, debe conservarse entre 2 °C y 8° C de modo que se conserve su actividad biológica.

### 3.7 ESQUEMA DE PRODUCCIÓN DE rBoIFN- $\alpha$

#### 3.7.1 Esquema de Producción de rBoIFN- $\alpha$ en *Escherichia Coli*

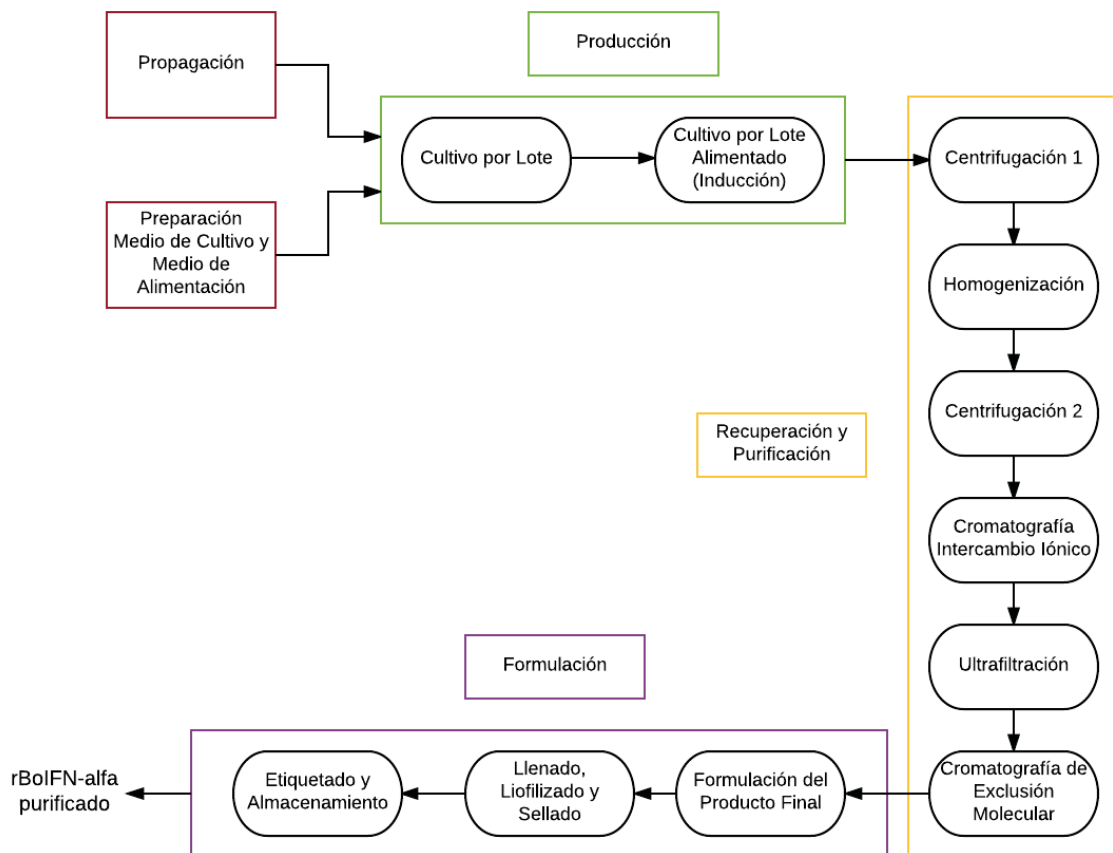


Figura 3.1: Esquema de producción de rBoIFN-a en *Escherichia coli*

### 3.7.2 Esquema de Producción de rBoIFN- $\alpha$ en *Pichia pastoris*

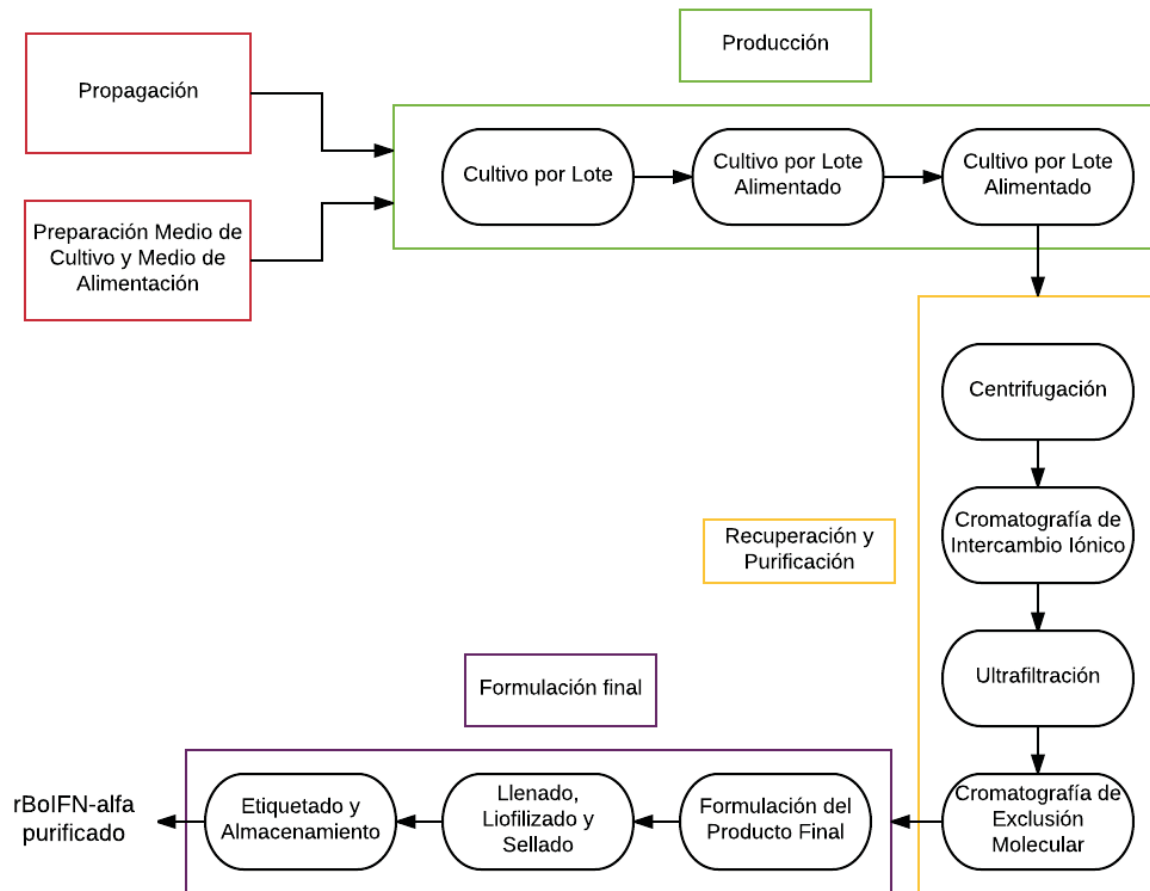


Figura 3. 2: Esquema de producción de rBoIFN- $\alpha$  en *Pichia pastoris*.

### 3.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 3

Akesson, M., Hagander, P., & Axelsson, J. (2001). Avoiding acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures using feedback control of glucose feeding. *Biotechnology Bioengineering*. 73: 223-30.

Babaiepour, V., Shojaosadati, S. A., Robotjazi, S. M., Khalilzadeh, R., & Maghsoudi, N. (2007). Over-production of human interferon- $\gamma$  by HCDC of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*. 42: 112-117.

Babaeipour, V., Abbas, M., Sahebazar, Z. and Alizadeh, R. (2010). Enhancement of human granulocyte-colony stimulating factor production in recombinant E. coli using batch cultivation. *Bioprocess and biosystems engineering*, (33), pp.591-598.

Babu, K.R., Swaminathan, S., Marten, S., Khanna, N., & Rinas, U. (2000). Production of interferon- $\alpha$  in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli* and its single step purification from refolded inclusion body proteins, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 655–660.

Boué, O., García, J., Villar, M., Alazo, K., Pérez, A., Ramos, E., Morales, C., Morera, O., Redondo, M., Montero, C. and Rodríguez, M. (2000). Antiviral and Antiluteolytic Activity of Recombinant Bovine IFN- $\omega$ 1 Obtained from *Pichia pastoris*. *Journal of interferon and cytokine research*, (20), pp.677–683.

Brierley, R. A., Siegel, R. S., Bussineau, C. M. Craig, W. S., Holtz, G. C., Davis, G. R., Buckholz, R. G., Thill, G. P., Wondrack, L. M., Digan, M. E., Harpold, M. M., Lair, S. V., Ellis, S. B., and William, M. E. (1989) Mixed Feed Recombinant Yeast Fermentation. International Patent (PCT) Application. Publication No. WO 90/03431.

Chen, Y., Song, J., Sui Wang, S., DnaK, D., & Dna, J. (2003). facilitated the folding process and reduced inclusion body formation of magnesium transporter CorS overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein expression and Purification*. 32(2): 221-231.

Chiruvolu, V., Cregg, J. M., & Meagher, M. M. (1997). Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme Microb. Tehcnol.* 21: 277-283.

Chisti, Y. & Moo-Young, M. (1986). Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme Microb. Technol.*, 8, pp.194-204.

Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. L., & Valero, F. (2006). Operational Strategies, Monitoring and Control of Heterologous Protein Production in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris* under Different Promoters: A review. *Microbial Cell Factories*, pp. 5-17.

Cregg, J.M., Vedvick, T. S., & Raschke, W. C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*. 11: 905-910.

De Mey, M., De Maeseneire, S., Soetaert, W., & Vandamme, E. (2007). Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 689-700.

Donovan, R.S., Robinson, C. W., & Glick, B. R. (1996). Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under control of lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology*. 16: 145-154.

Doran, P.M. (2013). *Bioprocess engineering principles*. Waltham, MA: Academic Press.

Eiteman, M.A. & Altman, E. (2006). Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends in Biotechnology*. 24: 530-6.

EL-Baky, N.A., Linjawi, M. H., & Redwan, E. M. (2015). Auto-induction expression of human consensus interferon- $\alpha$  in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*, pp. 15:14.

Files, D.A., Ogawa, M., Scaman, C. H., & Baldwin, S. A. (2001). *Pichia pastoris* fermentation process for producing high-levels of recombinant human cystatin-C. *Enzyme and Microbiological Technology*, 26: 335-340.

Gao, M., Zheng, Z., Wu, J., Dong, S., Li, Z., Jin, H., Zhan, X. and Lin, C. (2012). Improvement of specific growth rate of *Pichia pastoris* for effective porcine interferon- $\alpha$  production with an on-line model-based glycerol feeding strategy. *Appl Microbiol Biotechnol*, (93), pp.1437-1445.

Gombert, A.K., Kilikian, B.V. (1997). Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. *Journal of Biotechnology*, 60: 47-54.

Hoffman, B.J., Broadwater, J. A., Johnson, P., Harper, J., Fox, B.G., & Kenealy, W. R. (1995). Lactose fed-batch overexpression of recombinant metalloproteins in *Escherichia coli* BL21 (DE3): process control yielding high levels of metal-incorporated, soluble protein. *Protein Expr Purif.* 6: 646–654.

ICH. Quality of Biotechnological Products: Analysis of the expression construct in cells used for production of rDNA derived products (Q5B) 1997. Disponible en: <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>.

Ilgen, C., Cereghino, J. L., Cregg, J. M. (2004). *Production of Recombinant Proteins: Microbial and Eukaryotic Expression Systems* (Chapter 7). Gellissen G. (ed). Wiley VCH Verlag 2: 143–162.

Inan, M., & Meagher, M. M. (2001). The effect of ethanol and acetate on protein expression in *Pichia pastoris*. *J. of Bioscience and Bioeng.* 92(4): 337-341

Inan, M., Chiruvolu, V., Eskridge, K. M., Vlasuk, G. P., Dickerson, K., Brown, S., & Meagher, M.M. (1999). Optimisation of temperature-glycerol-pH conditions for fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. *Papers in Biochemical Engineering*.

Jahic, M., Veide, A., Charoenrat, T., Teeri, T., & Enfors, S. O. (2006). Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog.* 22: 1465–73.

Jahic, M., Knoblechner, J., Charoenrat, T., Enfors, S. O., Veide, A. (2006). Interfacing *Pichia pastoris* cultivation with expanded bed adsorption. *Biotechnol Bioeng.* 93: 1041–9.

Jahic, M., Rotticci-Mulder, J. C., Martinelle, K., Hult, K., & Enfors, S. O. (2002). Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 24: 385-393.

Khalilzadeh, R., Mohammadian-Mosaabadi, J., Bahrami, A., Nazak-Tabbar, A., Nasiri-Khalili, M. A., Amouheidari, A. (2008). Process development for production of human granulocyte-colony stimulating factor by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. 35: 1643-1650.

Kim, D.C. & Jung, J. (2002). A protocol for batch fermentation for production of soluble interferon by recombinant *Escherichia coli*. School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Agric. Chem. Biotechnol. 45(4): 180-182. Korea.

Lee, J., Lee, S. Y., & Park, S. (1997). Fed-batch culture of *Escherichia coli* W by exponential feeding of sucrose as a carbon source. *Biotechnol. Tech.* 11: 59–62.

Li, S. Xiong, Z. F., & Lin, Q. (2001). Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*, *Protein Express Purif.* 21: 438–445.

Lin Cereghino, J., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 45-66.

Lipiäinen, T., Peltoniemi, M., Sarkhel, S., Yrjönen, T., Vuorela, H., Urtti, A. and Juppo, A. (2016). Formulation and Stability of Cytokine Therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104, pp.307-326.

Liu, P.T., Ta, T.V., & Villarete, L. H. (2001). High-yield expression and purification of human interferon alpha-1 in *Pichia pastoris*, *Protein Expr. Purif.* 22: 381–387.

Minjie, G. & Shi, Z. (2013). Process Control and Optimization for Heterologous Protein Production by Methylotrophic *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 21: 216-226.

Novagen. pET System Manual. 10<sup>a</sup> Edición. U.S.-Canadá- Alemania-Reino Unido. 2006.

Organización Mundial de la Salud. Serie de Informes Técnicos. Anexo 1 “Prácticas adecuadas para la fabricación de productos biológicos”. Ginebra: OMS: 1992.

Panda, A.K. (2003). Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 85: 43-93.



Phue, J.N., Noronha, S. B., Hattacharyya, R., Wolfe, A. J., & Shiloach, J. (2005). Glucose metabolism at high density growth of *E. coli B* and *E. coli K*: Differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in *E. coli B* as determined by microarrays and Northern blot analyses. *Biotechnology and Bioengineering*. 90: 805-820.

Potvin, G., Ahmad, A., & Zhang, Z. (2012). Bioprocess Engineering Aspects of Heterologous Protein Production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochemical Engineering Journal*. 64: 91-105.

recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotech. And Bioeng.* 70(1): 1-8.

Ramya, M., Selvarajan, E. (2012). Purification of human recombinant granulocyte colony

Riesenberg, D., Schulz, V., Knorre, W. A., Pohl, H. D., Korz, D., Sanders, E. A., Ross, A., & Deckwer, W. D. (1991). High Cell Density Cultivation of *Escherichia coli* at Controlled Specific Growth Rate. *Journal of Biotechnology*. 20: 17-27.

Rodríguez, M., Martínez, V., Alazo, K., Suárez, M., Redondo, M., Montero, C., Besada, V., & De la Fuente, J. (1998). The bovine IFN- $\omega$ 1 is biologically active and secreted at high levels in the yeast *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 60: 3–14.

Salazar, O., Molitor, J., Lienqueo, M. E., & Asenjo, J. A. (2001). Overproduction, Purification, and Characterization of b-1,3-Glucanase Type II in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 23: 219-225.

Shi, L., Wang, D., Chan, W. and Cheng, L. (2007). Efficient expression and purification of human interferon alpha2b in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, (54), pp.220-226.

Solá, A., Jouhten, P., Maaheimo, H., Sánchez-Ferrando, F., Szyperski, T., & Ferrer, P. (2007). Metabolic Flux Profiling of *Pichia pastoris* Grown on Glycerol/Methanol Mixtures in Chemostat Cultures at Low and High Dilution Rates. *Microbiology*. 153: 281-290.

Sreekrishna, K., Nelles, L., Potenz, R., Cruse, J., Mazzaferro, P., Fish, W., Fuke, M., Holden, K., Phelps, D., Wood, P. and Parker, K. (1989) High Level Expression,

Purification, and Characterization of Recombinant Human Tumor Necrosis Factor Synthesized in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* 28(9): 4117-4125.

stimulating factor from *Escherichia coli*. *African journal of biotechnology*. 11(50): 11104-11109.

Studier, F.W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking culture. *Protein Expr Purif.* 41: 207–34.

Swaminathan, S. & Khanna, N. (1999). Affinity purification of recombinant interferon- $\alpha$  on a mimetic ligand adsorbent, *Protein Expr. Purif.* 15: 236–242.

Tejeda, A., Montesinos, R. M., & Guzmán, R. (1995). *Bioseparaciones*. Mexico: Editorial Unison. Efficient expression and purification of human interferon alpha2b in the methylophilic yeast, *Pichia pastoris*.

Tian, H., Tang, L., Wang, Y., Wang, X., Guan, L., Zhang, J., Wu, X., & Li, X. (2011). *Int. J. Pept. Res. Ther.* 17: 123–129.

Tomatsu, S. (2002). Comunicación personal. Instituto Gifú. Tokio, Japón.

Trinh, L.B., Phue, J. N., & Shiloach, J. (2003). Effect of Methanol Feeding Strategies on Production and Yield of Recombinant Mouse Endostatin from *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*. 82: 438-444.

Tu, Y., Wang, G., Wang, Y., Chen, W., Zhang, L., Liu, Y., Jiang, C., Wang, S., Bu, Z. & Cai, X. (2016). Extracellular expression and antiviral activity of a bovine interferon-alpha through codon optimization in *Pichia pastoris*. *Microbiological Research*, 191: 12-18.

Turner, C., Gregory, M. E., & Turner, M. K. (1994). A study of the effect of specific growth-rate and acetate on recombinant protein production of *Escherichia coli* JM107. *Biotechnology Letters*. 16: 891-96.

Zhang, W., Bevins, M. A., Plantz, B. A., Smith, L. A., & Meagher, M. M. (2000). Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimising the production of a

recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotech. And Bioeng.* 70(1): 1-8.

Zhang, W., Sinha, J., Meagher, M.M. (2006). Glycerophosphate as a phosphorus source in a defined medium for *Pichia pastoris* fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 72 (1): 139-144.



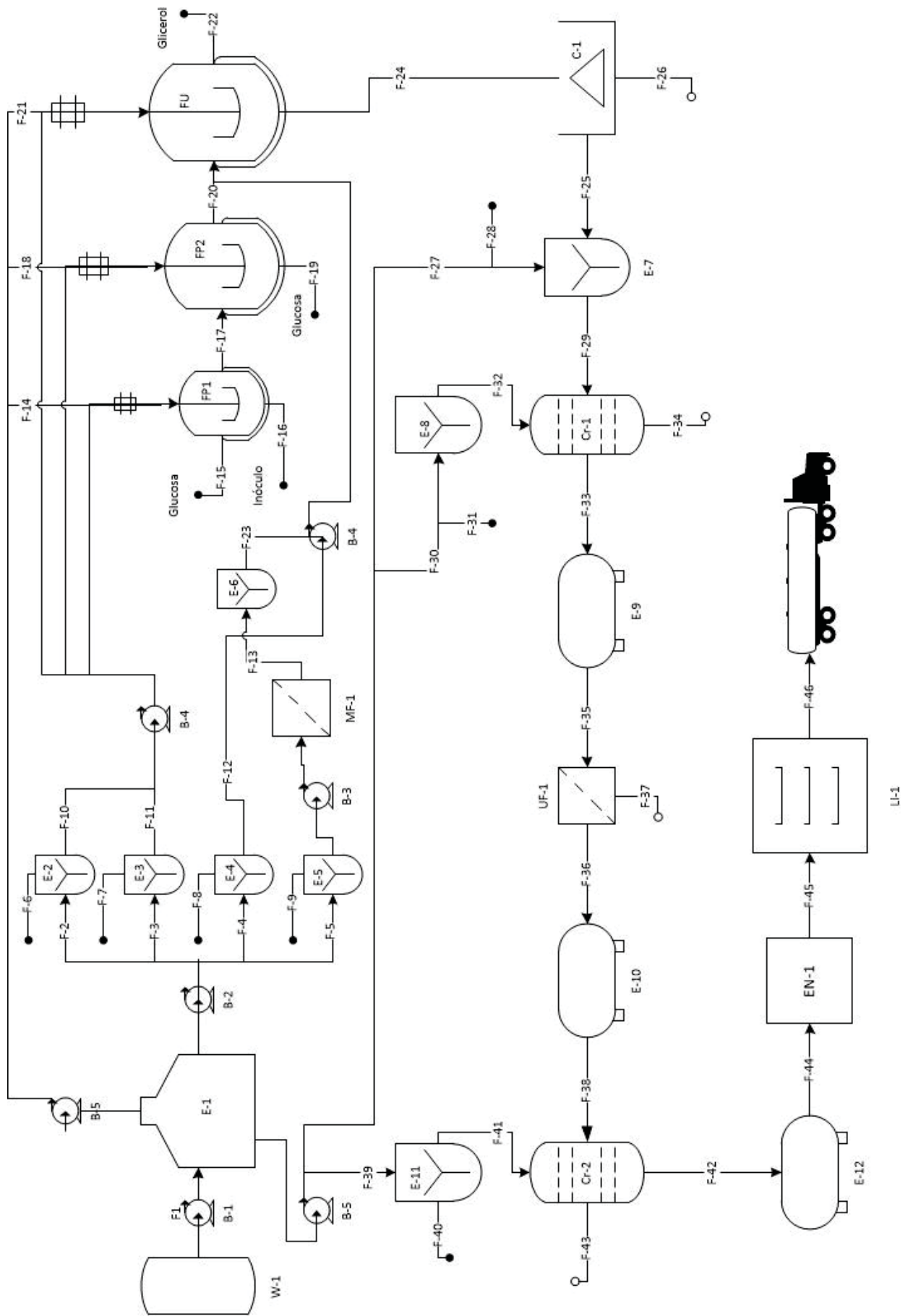


Figura 4.1: Diagrama de flujo del proceso de *P. pastoris*.

#### 4.1.2 Etapa de Pretatamiento

##### a) Composición del Medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizará tanto en las etapas de propagación, como en la fermentación de producción es un medio definido de sales llamado “Basal Salt Medium” (BSM) acompañado de una soluciones de sales trazas (PTM<sub>1</sub>).

Para determinar la cantidad de cada nutriente, se debe conocer el rendimiento de éste en la célula, de acuerdo a la Ecuación 4.1.

$$Y_{x/s} = \frac{\% \text{ elemento en nutriente}}{\% \text{ elemento en biomasa}} \cdot f$$

Ecuación 4.1

Los porcentajes del elemento en biomasa se determinan de la Tabla 4.1, mientras que los porcentajes del elemento en cada nutriente se obtienen de la Ecuación 4.2.

$$\% \text{ elemento en el compuesto} = \frac{N_A \cdot P_A}{P_M} * 100$$

Ecuación 4.2

Donde,

N<sub>A</sub>: Número de átomos del elemento presente en el compuesto

PA: peso atómico del elemento, [g]

PM: peso molecular del compuesto, [g/gmol]

Tabla 4.1: Composición química de levaduras (Acevedo, Gentina, &amp; Illanes, 2002).

Elemento	% en peso, base seca
Carbono	46 – 51
Hidrogeno	6 – 8
Oxígeno	28 – 35
Nitrógeno	6 – 10
Magnesio	0,1 - 0,5
Fósforo	0,8 - 2,6
Azufre	0,01 - 0,24
Calcio	0,01 - 1,1
Potasio	1,0 - 4,5
Hierro	0,02 - 0,2

Por ejemplo, la fuente de fósforo en *P. pastoris* es el ácido fosfórico, cuya fórmula es  $H_3PO_4$ , por ende, el porcentaje de fósforo en el compuesto se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ de } P \text{ en } \acute{a}c. \text{ fosf\acute{o}rico} = \frac{1 \cdot 30,9 \text{ [g]}}{98 \left[ \frac{\text{g}}{\text{gmol}} \right]} \cdot 100 = 31,6\%$$

Luego, considerando que el fósforo representa en promedio un 1,7% de la biomasa, utilizando la Ecuación 4.1 se despeja su rendimiento, el cual es 18,6 [g/g]. El procedimiento es similar para los demas elementos.

Para determinar la concentración de cada nutriente se utiliza la Ecuación 4.3.

$$S_0 = \frac{S_f + (X_f - X_0)}{Y_{x/s}}$$

Ecuación 4.3

Dónde,

$S_0$ : concentración inicial de cada compuesto [g/L].

$S_f$ : concentración final de cada compuesto. Se asume 0 [g/L].

$X_f$ : concentración final de biomasa [g/L].

$X_0$ : concentración inicial de biomasa.

$Y_{X/S}$ : rendimiento del nutriente en biomasa [g/g].

Antes de mostrar ejemplos de cálculo para determinar la concentración de los nutrientes, en la Tabla 4.2. se muestra la concentración de biomasa que se espera alcanzar en cada fermentación y el volumen de la misma.

Tabla 4. 2: Concentración de biomasa esperada y volumen de las etapas de fermentación en *P. pastoris*.

Parámetro	FP1	FP2	FULOTE	FUCLA1	FUCLA2
Volumen [L]	10,9	109	1.090	1.176	2.728
$X_f$ [g/L]	6	6	30	51	153

Se mostrará el cálculo para determinar la concentración inicial de ácido fosfórico, el procedimiento para los demás nutrientes es el mismo. Se debe mencionar que para los nutrientes que no son la fuente de carbono se consideran con un porcentaje de exceso equivalente al 20%, esto implica multiplicar el término que resulte del cálculo de  $S_0$  por un factor de 1,2.

$$S_0 = \frac{0 \left[ \frac{g}{L} \right] + (6 - 0,6) \left[ \frac{g}{L} \right]}{19,6} \cdot 1,2$$

$$S_0 = 0,33 \left[ \frac{g}{L} \right]$$

En la Tabla 4.3 se detallan las concentraciones de cada nutriente del medio de cultivo BSM para cada etapa de fermentación. La nomenclatura se debe leer de la siguiente manera, FPi: fermentación de propagación i, FU: Fermentador de producción, donde ocurre crecimiento celular y posteriormente la inducción de la proteína recombinante.



Tabla 4.3: Composición del medio de cultivo BSM para *P. pastoris*.

Compuesto	Fórmula	Yx/s	Concentración [g/L]		
			FP1	FP2	FU
Acido fosforico	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	18,59	0,12	0,12	9,84
Sulfato de calcio	CaSO <sub>4</sub>	136,32	0,02	0,02	1,34
Sulfato de potasio	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	147,21	0,01	0,01	1,24
Sulfato magnesio	KOH	32,88	0,07	0,07	5,56
Hidroxido de potasio	MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	27,7	0,08	0,08	6,56

La fuente de carbono no va incluida en el medio BSM porque en las etapas FP1 y FP2 se utilizará glucosa, mientras que en la etapa de cultivo por lotes de FU se utilizará glicerol. Las concentraciones de la fuente de carbono para cada etapa del proceso se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4: Composición de las fuentes de carbono para las fermentaciones de *P. pastoris*.

Compuesto	Fórmula	Yx/s	Concentración [g/L]		
			FP1	FP2	FU
Glucosa	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	0,45	11,9	11,9	-
Glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0,61	-	-	48,2

En cuanto al medio de sales, como no se dispone información para determinar los rendimientos, se utilizará una composición conocida de un medio de sales para *Pichia pastoris* el cual se muestra en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5: Composición del medio de sales traza PTM1 para *P. pastoris*.

Compuesto	Fórmula	Concentración [g/L]
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	6,00
Yoduro de sodio	$\text{NaI}$	0,08
Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,00
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,20
Acido borico	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,02
Cloruro de cobalto	$\text{CoCl}_2$	0,50
Cloruro de zinc	$\text{ZnCl}_2$	20,00
Sulfato ferroso heptah	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	65,00
Biotina	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	0,20
Acido sulfurico	$\text{H}_2\text{SO}_4$	5 mL/L

Los medios de alimentación para la etapa CLA tienen concentraciones definidas y explicadas en el Capítulo 3. En la Tabla 4.6 se muestra su composición.

Tabla 4.6: Composición de los medios de alimentación al CLA para *P. pastoris*.

Compuesto	Fórmula	Concentración [g/L]	
		$F_{U \text{ CLA } 1}$	$F_{U \text{ CLA } 2}$
Glicerol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	700	0
Metanol	$\text{CH}_3\text{OH}$	0	855

La masa de cada compuesto por etapa en el proceso de fermentación se resume en la Tabla 4.7. Las fuentes de carbono (glicerol y glucosa) aparecen como parte del medio BSM, pero se prepararán a parte.

Tabla 4.7: Masa de compuestos por cada etapa de fermentación en *P.pastoris*.

Medio	Compuesto	Etapa					Masa Total [g]
		FP1 Masa [g]	FP2 Masa [g]	FU lote* Masa [g]	FU cla 1 Masa [g]	FU cla 2 Masa [g]	
BSM	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	3,80	37,99	26.772,76	-	-	26.814,55
	CaSO <sub>4</sub>	0,52	5,18	3.651,35	-	-	3.657,05
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,48	4,80	3.381,32	-	-	3.386,60
	KOH	2,15	21,48	15.136,26	-	-	15.159,88
	MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	2,53	25,34	17.856,67	-	-	17.884,54
	Glucosa	129,76	1.297,60	-	-	-	1.427,36
	Glicerol**	-	-	52.534,43	60.446,81	-	112.981,24
Alimentación	Metanol	-	-	-	-	-	1.326.659,54
	CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	65,40	654,00	16.368,00	-	-	17.087,40
	NaI	0,87	8,72	218,24	-	-	227,83
	MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	32,70	327,00	8.184,00	-	-	8.543,70
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	2,18	21,80	545,60	-	-	569,58
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,22	2,18	54,56	-	-	56,96
	CoCl <sub>2</sub>	5,45	54,50	1.364,00	-	-	1.423,95
	ZnCl <sub>2</sub>	218,00	2.180,00	54.560,00	-	-	56.958,00
	FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	708,50	7.085,00	177.320,00	-	-	185.113,50
	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	2,18	21,80	545,60	-	-	569,58
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	98,10	981,00	24.552,00	-	-	25.631,10	

\*La masa de estos medios alcanza hasta el fin del CLA, pero no se especificó en la tabla.

\*\*La masa de glicerol en FU cla1 representa al medio de alimentación al CLA.

## b) Preparación del Medio de Cultivo

Para la preparación del medio de cultivo, primero se necesita saber en cuánto volumen de agua se va a disolver cada compuesto, según su solubilidad. Además, la masa de nutrientes ocupa un volumen determinado, por lo que es necesario conocerlo para especificar el volumen final que debe tener el estanque en el cual se va a preparar el medio. La masa de agua necesaria para la disolución total se obtiene de la Ecuación 4.4.

$$\text{Solubilidad en agua} \left[ \frac{g}{L} \right] = \frac{\text{Masa} [g]}{\text{Volumen de agua} [L]}$$

Ecuación 4.4

### Preparación medio BSM

En la Tabla 4.8 se muestran las solubilidades de cada compuesto a 25 [°C], la cantidad de agua necesaria para disolver dicho compuesto, la densidad, que se utiliza para determinar el volumen que ocupa su masa.

Tabla 4.8: Propiedades y volumen de agua utilizado para preparar el medio BSM de *P. pastoris*.

Compuesto	Masa Total [g]	Solubilidad [g/L]	Agua [L]	Densidad [kg/L]	Volumen [L]
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	26.814,55	Total	0,00	1,88	14,26
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.657,05	754,00	4,85	2,32	1,58
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.386,60	111,00	30,51	2,66	1,27
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15.159,88	355,00	42,70	2,66	5,70
KOH	17.884,54	1190,00	15,03	2,12	8,44
<b>Total [L]</b>	<b>66.902,62 [g]</b>		<b>93,09</b>		<b>31,25</b>

En la Figura 4.2 se muestra un diagrama de bloques con las corrientes involucradas en el estanque de preparación de medio (E-2).

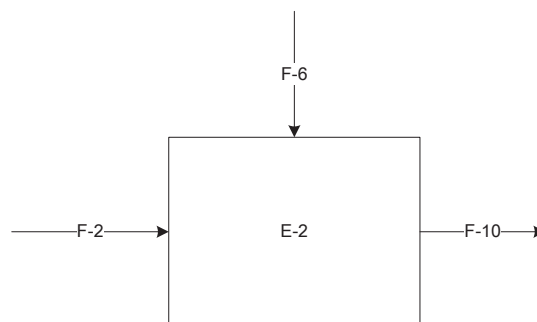


Figura 4.2: Corrientes involucradas en estanque (E-2) de medio BSM *P. pastoris*.

La composición de cada corriente se resume en la Tabla 4.9. Según el balance de masa expresado en la Ecuación 4.5.

$$F_{F-2} + F_{F-3} = M_{E-2}$$

Ecuación 4.5

Dónde  $F_{F-2}$  representa el volumen de agua requerido para preparar el medio concentrado BSM,  $F_{F-6}$  la masa de medio BSM, y  $M_{E-2}$  la masa que resulta de medio concentrado en el estanque E-2.

Tabla 4.9: Balance de masa al estanque (E-2) de medio BSM de *P. pastoris*.

Corriente	Compuesto	Masa [kg]	Volumen [L]
F-2	Agua	93,09	93,09
F-6	BSM	66,90	31,25
$M_{E-2}$	Medio BSM	159,99	124,34

### Preparación medio PTM1

En la Tabla 4.10 se muestran las solubilidades de cada compuesto, la cantidad de agua necesaria para disolver dicho compuesto, la densidad, que se utiliza para determinar el volumen que ocupa su masa.

Tabla 4.10: Propiedades y volumen de agua utilizado para preparar el medio PTM1 de *P. pastoris*.

Compuesto	Masa Total [g]	Solubilidad [g/L]	Agua [L]	Densidad [kg/L]	Volumen [L]
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	17.087,40	203,00	84,17	3,60	4,75
NaI	227,83	1.780,00	0,13	3,67	0,06
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	8.543,70	629,00	13,58	2,95	2,90
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	569,58	653,00	0,87	0,70	0,81
$\text{H}_3\text{BO}_3$	57,00	47,20	1,21	1,44	0,04
$\text{CoCl}_2$	1.424,00	529,00	2,69	3,36	0,42
$\text{ZnCl}_2$	56.958,00	395,00	144,20	2,91	19,57
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	185.113,50	400,00	462,78	1,90	97,43
$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	569,60	220,00	2,59	1,30	0,44
$\text{H}_2\text{SO}_4$	25.631,10	Total	0,00	1,84	13,93
<b>Total [L]</b>	<b>296.181,71 [g]</b>		<b>712,22</b>		<b>140,35</b>

En la Figura 4.3 se muestra un diagrama de bloques con las corrientes involucradas en el estanque de preparación de medio (E-3).

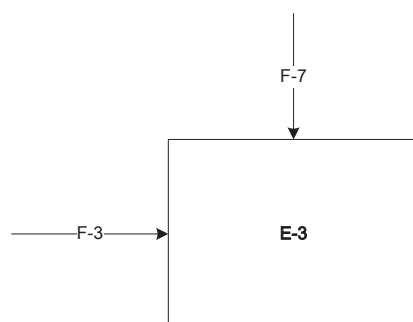


Figura 4.3: Corrientes involucradas en estanque (E-3) de medio BSM *P. pastoris*.

El balance de masa es equivalente a E-2 y la composición de cada corriente se resume en la Tabla 4.10.

Tabla 4.11: Balance de masa al estanque (E-3) de medio PTM1 de *P. pastoris*.

Corriente	Compuesto	Masa [kg]	Volumen [L]
F-3	Agua	712,22	712,22
F-7	PTM1	296,18	140,35
$M_{E-3}$	Medio PTM1	1.008,40	852,57

### Preparación medios de alimentación

En la Tabla 4.12 se muestran las solubilidades de cada compuesto, la cantidad de agua necesaria para disolver dicho compuesto, la densidad, que se utiliza para determinar el volumen que ocupa su masa.

Tabla 4.12: Propiedades y volumen de agua utilizado para preparar medios de alimentación al CLA de *P. pastoris*.

Compuesto	Masa total* [g]	Agua [L]	Densidad [kg/L]	Volumen [L]	V total [L]
Glicerol	60.446,81	86,35	1,26	47,97	134,33
Metanol	1.086.153,19	1.551,65	0,80	1.357,69	2.909,34

\*Los compuestos se encuentran puros y en estado líquido.

La composición de cada corriente se resume en la Tabla 4.13 y en la Tabla 4.14, mientras que los diagramas de las corrientes involucradas se muestran en las Figura 4.4 para el estanque E-4 de glicerol y la Figura 4.5 para el estanque E-5 de metanol.

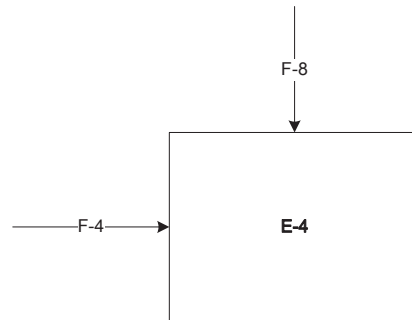


Figura 4.4: Corrientes involucradas en estanque (E-4) de glicerol en *P. pastoris*.

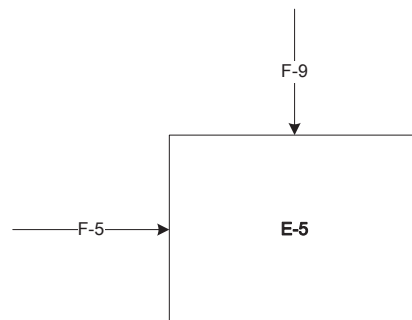


Figura 4.5: Corrientes involucradas en estanque (E-5) de metanol en *P. pastoris*.

Tabla 4.13: Balance de masa al estanque (E-4) de medio de alimentación con glicerol de *P. pastoris*.

Corriente	Compuesto	Masa [kg]	Volumen [L]
F-4	Agua	86,35	86,35
F-8	Glicerol	60,45	47,97
$M_{E-4}$	Medio Glicerol	146,79	134,33

Tabla 4.14: Balance de masa al estanque (E-5) de medio de alimentación con metanol de *P. pastoris*.

Corriente	Compuesto	Masa [kg]	Volumen [L]
F-5	Agua	1.551,65	1.551,65
F-9	Metanol	1.086,15	1.357,69
$M_{E-5}$	Medio Metanol	2.637,80	2.909,34

### c) Esterilización de Fermentadores y Medio de Cultivo

Debido a que el metanol tiene un punto de inflamación a 12 [°C], resulta ser un compuesto propenso a inflamarse si se le adiciona una fuente de calor considerable, por ello se descarta la opción de esterilizarlo por medio de calor. Para solucionar esta problemática se optó por esterilizar la solución de metanol por medio de un sistema de

microfiltración (MF-1) con un diámetro de poro de 0,1  $\mu\text{m}$  de modo que se asegure la condición de esterilidad. El diseño del microfiltro, el tiempo de esterilización, y los requerimientos energéticos, se encuentran en el Capítulo 5 (ver sección 5.10).

Los fermentadores se esterilizarán con el medio de cultivo dentro por medio de sistemas *Sterilization In Place* (SIP), lo cual implica inyectar vapor de caldera a alta temperatura. Lo relevante de esta sección es conocer la cantidad de vapor requerida en el proceso con el objetivo de especificar los requerimientos de la caldera (ver capítulo 5, sección 5.8.2).

Para realizar los cálculos se ha hecho la siguiente suposición: el tiempo de calentamiento de la pared del reactor es despreciable atribuido a lo delgado de la pared y a un alto coeficiente de transferencia de calor.

El tiempo de esterilización viene dado por la Ecuación 4.6 (Bailey & Ollis, 1986).

$$\ln \frac{N}{N_0} = -K \cdot t$$

Ecuación 4.6

Dónde,

N: número de microorganismos viables en una determinada cantidad de operaciones.

$N_0$ : número de microorganismos viables al inicio de una operación.

K: constante cinética de destrucción por calor, [ $\text{min}^{-1}$ ].

t: tiempo [min].

La constante cinética K puede tomarse del microorganismo *Bacillus stearothermophilus* que es la forma microbiana más resistente, y tiene un valor de 0.77 [ $\text{min}^{-1}$ ] a 121 [ $^{\circ}\text{C}$ ]. Podemos además suponer un criterio de esterilización que permita una célula viable por cada mil operaciones (N), y si asumimos una cantidad de  $10^9$  microorganismos por litro ( $N_0$ ), se pueden obtener los tiempos de esterilización para cada reactor, tal como se muestra en la Tabla 4.15.



Como ejemplo de cálculo se determinará el tiempo de esterilización para el fermentador FP1 en *P. pastoris*.

Tabla 4.15: Tiempos de esterilización de cada fermentador para *P. pastoris*.

Parámetro	Fermentador			Glicerol
	FP1	FP2	FU	
Volumen [L]	9,81	98,1	981	86,35
N/No	$6,8 \cdot 10^{-14}$	$6,9 \cdot 10^{-16}$	$5,7 \cdot 10^{-18}$	$1,3 \cdot 10^{-16}$
t est [min]	42	48	54	47

La cantidad de vapor a utilizar para calentar el área de las paredes de cada reactor y el seno del medio de cultivo se describe mediante la Ecuación 4.7.

$$M_{acero} \cdot C_{P_{acero}} \cdot (T_v - T_p) + M_{medio} \cdot C_{p_{medio}} \cdot (T_v - T_p) = \lambda \cdot M_{vapor}$$

Ecuación 4.7.

Dónde,

$M_{acero}$ : masa de acero estimada para un espesor de pared de 1 [pulg].

$C_{p_{acero}}$ : capacidad calorífica del acero a temperatura promedio (71,6 [°C]) = 445.94 [J/kg/°C]. (Kern, 2001).

$T_v$ : temperatura del vapor (121[°C]).

$T_p$ : temperatura de la pared o ambiente (22[°C]).

$\lambda$ : calor de vaporización del vapor saturado a 121[°C] = 2.199.400 [J/kg] (Smith, 1996).

$M_{vapor}$ : masa de vapor, [kg].

$M_{medio}$ : masa de medio de cultivo, [kg].

$C_{p_{medio}}$ : capacidad calorífica del medio de cultivo, se asume la del agua, 4186 [J·kg<sup>-1</sup>·°C<sup>-1</sup>].

Seguendo el ejemplo de cálculo del fermentador FP1 se tiene lo siguiente:

$$24,8[kg] \cdot 445,94 \left[ \frac{J}{kg \cdot ^\circ C} \right] \cdot (121 - 22)[^\circ C] + 9,81[kg] \cdot 4186 \left[ \frac{J}{kg \cdot ^\circ C} \right] \cdot (121 - 22)[^\circ C]$$

$$= 2.199.400 \left[ \frac{J}{kg} \right] \cdot M_{vapor}$$

$$M_{vapor} = 0,94 [kg]$$

La temperatura de la pared ha de mantenerse a la temperatura de esterilización durante el tiempo que demore el procedimiento, con lo cual el flujo de vapor necesario para mantener esa temperatura está dado por la Ecuación 4.8.

$$Q_P = \lambda \cdot F_V$$

Ecuación 4.8

$Q_P$  representa el término del calor, el cual puede ser calculado por medio de la Ecuación 4.9 (Acevedo, 2002).

$$Q_P = h \cdot \pi \cdot D_t \cdot H_L \cdot (T_f - T_a)$$

Ecuación 4.9

Dónde,

$Q_P$ : calor de las paredes, [J/h].

$F_V$ : flujo de vapor, [kg/h].

$\lambda$ : calor de vaporización = 2.199,4 [kJ/kg].

$h$ : coeficiente de transferencia de calor = 20 [kcal/(h\*m<sup>2</sup>\*°C)].

$D_t$ : diámetro del fermentador, [m].

$H_L$ : altura del fermentador, [m].

$T_f$ : temperatura de esterilización (121 [°C]).

$T_a$ : temperatura ambiente (22[°C]).

Para el fermentador FP1:

$$Q_P = 20 \left[ \frac{kcal}{h \cdot m^2 \cdot ^\circ C} \right] \cdot 3,14 \cdot 0,191[m] \cdot 0,381[m] \cdot (121 - 22)[^\circ C] \cdot 4184 \left[ \frac{J}{kcal} \right]$$

$$Q_P = 1.893.685 \left[ \frac{J}{h} \right]$$

$$F_V = \frac{1.893.685 \left[ \frac{J}{h} \right]}{2199400 \left[ \frac{J}{kg} \right]} = 0,86 \left[ \frac{kg}{h} \right]$$

Luego, se necesita un flujo de vapor de 0,86 [kg/h] para poder esterilizar el fermentador FP1. La cantidad de vapor total que se necesita para calentar las paredes del fermentador, y posteriormente mantener a 121[°C] durante el tiempo de esterilización se obtiene de la Ecuación 4.10.

$$M_{vapor\ total} = M_{vapor} + F_V \cdot t_{est}$$

Ecuación 4.10

Por lo tanto, la masa de vapor total para FP1 se calcula de la siguiente manera:

$$M_{vapor\ total} = 0,94 [kg] + 0,86 \left[ \frac{kg}{h} \right] \cdot 42[min] \cdot \left( \frac{1\ h}{60\ min} \right)$$

$$M_{vapor\ total} = 1,54[kg]$$

El volumen de condensado generado, que finalmente se traduce en la cantidad de agua necesaria en cada esterilización, se obtiene de la Ecuación 4.11.

$$V_{CO} = \frac{M_{vapor\ total}}{\rho_L}$$

Ecuación 4.11

Dónde,

$V_{CO}$ : volumen de condensado, [L].

$\rho_L$ : densidad del líquido saturado (943,04[kg/m<sup>3</sup>]).

Para el fermentador FP1 se tiene:

$$V_{co} = \frac{1,54[kg] \cdot \left(\frac{1000L}{1m^3}\right)}{943,04\left[\frac{kg}{m^3}\right]} = 1,63[L]$$

El mismo procedimiento se utiliza para los demás reactores, y los resultados se detallan en la Tabla 4.16.

Tabla 4.16: Requerimientos de vapor para esterilización de reactores en *P. pastoris*.

Parámetro	FP1	FP2	FU	Glicerol
M vapor pared [kg]	0,94	6,65	62,87	6,17
Qp[J/h]	1.893.685	8.789.709	75.206.099	9.059.636
Fv [kg/h]	0,86	4,00	34,19	4,12
M vapor total [kg]	1,54	9,83	93,51	9,42
V co [L]	1,63	10,42	99,16	10,00

#### 4.1.4 Etapa de Fermentación en *P. pastoris*

La etapa de fermentación cuenta con tres etapas realizadas en estanques diferentes, biorreactor 1 (FP1), biorreactor 2 (FP2) y biorreactor 3 (FU).

El biorreactor 3 operará en modalidad por lote hasta alcanzar una determinada concentración celular ( $FU_{\text{lote}}$ ), luego se alimentará medio con el fin de trabajar en modalidad de lote alimentado exponencial para mantener una determinada velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y una concentración de sustrato residual (metanol) constante en el biorreactor. Cabe recordar que tanto el cultivo por lote final como el cultivo por lote alimentado se realizarán en el mismo fermentador (FU), pero para efectos de cálculos se analizarán por separado.

El diseño de fermentación se basará en un estudio previo de producción de la proteína interferón alfa en *P. pastoris* recombinante (Wu et al., 2011) y la guía “*Pichia Fermentation Process Guidelines*” de Invitrogen.

##### a) Etapa de Propagación de Cultivos de *P. pastoris*

La propagación del inóculo se realiza a partir de un vial congelado de 1 [ml] de muestra de *P. pastoris* inoculando un matraz agitado de 1 [L] con 150 [mL] de medio YBN-glicerol (Yeast Nitrogen Base). El cultivo es incubado a 30 [°C], 240 [rpm], por 14 horas en un incubador agitado ambiental (New Brunswick Scientific). Luego, todo el volumen como inóculo se transfiere a un recipiente de fermentación de 3,3 [L] (Volumen total) que contiene 1,5 [L] de medio basal de sales (BSM) más 4,4 [mL/L] de solución de metales trazas. La temperatura se controla a 30 [°C]. El oxígeno disuelto se fija a 30% y el pH a 5.0. Se utiliza una solución de hidróxido de amonio (30%) como solución básica para ajustar el pH. Entonces este cultivo será el inóculo de FP1.

En los biorreactores FP1 y FP2 se realizan fermentaciones vía modalidad de lotes, con el fin de propagar el cultivo, los cuales se utilizarán como respectivos inóculos, esto es, el volumen de FP1 servirá como inóculo para FP2 y éste será el inóculo de FU.

Considerando que el 40% del volumen de trabajo del biorreactor 3 corresponde a su volumen inicial, del cual 10% es inóculo; esto se expresa por medio de las ecuaciones 4.12 y 4.13.

$$V_{FP2} = 0,1 \cdot 0,4 \cdot V_{FU}$$

Ecuación 4.12

$$V_{FP1} = 0,1 \cdot V_{FP2}$$

Ecuación 4.13

Dónde,

$V_{FU}$ : Volumen de trabajo del biorreactor 3 [L].

$V_{FP2}$ : Volumen de trabajo del biorreactor de propagación 2 [L].

$V_{FP1}$ : Volumen de trabajo del biorreactor de propagación 1 [L].

De la ecuación 4.12 resulta que el volumen del inóculo de FU es de 109,5 [L]. Por lo tanto, se realiza la propagación en dos etapas, donde la primera será en un fermentador de volumen útil de 10,95 [L] y la segunda propagación en un fermentador de un volumen de trabajo de 109,5 [L]. La figura 4.6 muestra el esquema de propagación para *P. pastoris*.

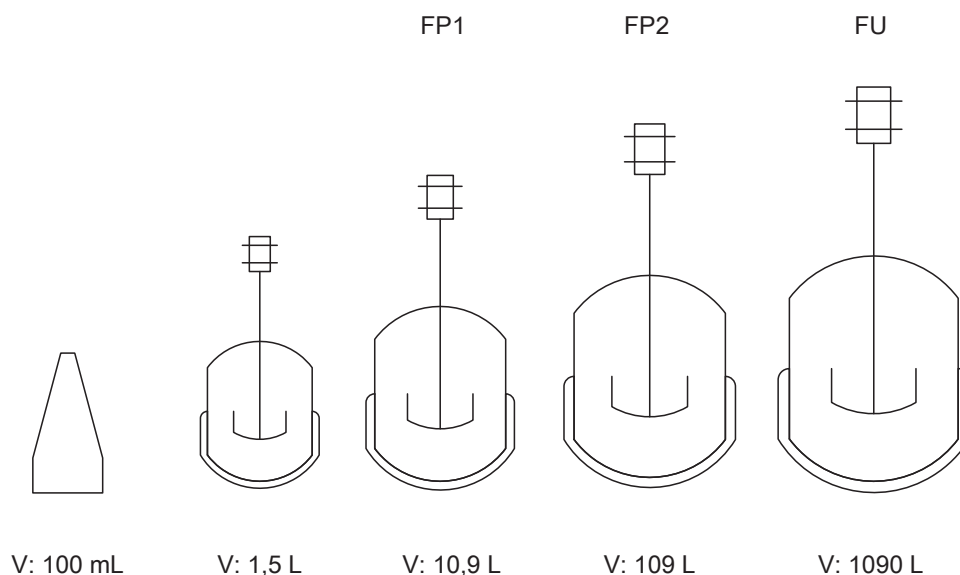


Figura 4.6: Esquema de propagación en *P. pastoris*.

Para la fermentación en FP1 y FP2 se utiliza el mismo medio de cultivo y se llevan a cabo en modalidad de lotes, por lo que la velocidad específica de crecimiento corresponde a la máxima ( $\mu_{\max}$ ), mencionada en la Tabla 4.17. Dicho esto, los tiempos de fermentación se calculan según la Ecuación 4.14.

$$X_f = X_0 \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t}$$

Ecuación 4.14

Tabla 4.17: Condiciones de fermentación de las etapas de propagación en FP1 y FP2 con *P. pastoris*.

Variable	FP1	FP2
$\mu_{\max}$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	0,6	0,6
T [ $^{\circ}\text{C}$ ]	30	30
V [L]	10,95	109,5
$X_0$ [g/L]	0,6	0,6
$X_f$ [g/L]	6	6
t [h]	3,8	3,8

En la Figura 4.7 y Figura 4.8 se muestra el diagrama de bloque con las corrientes involucradas en ambas fermentaciones de propagación, tanto para FP1 como para FP2.

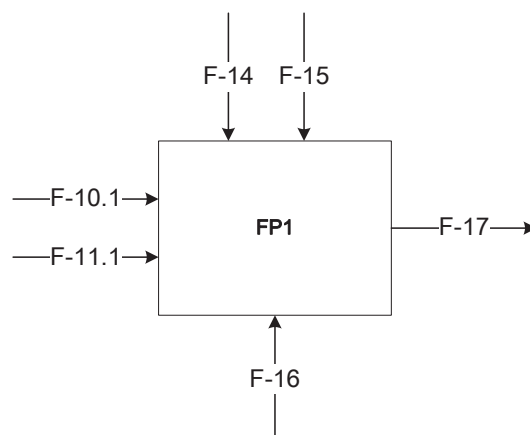


Figura 4.7: Corrientes involucradas en el biorreactor 1 (FP1) en *P. pastoris*.

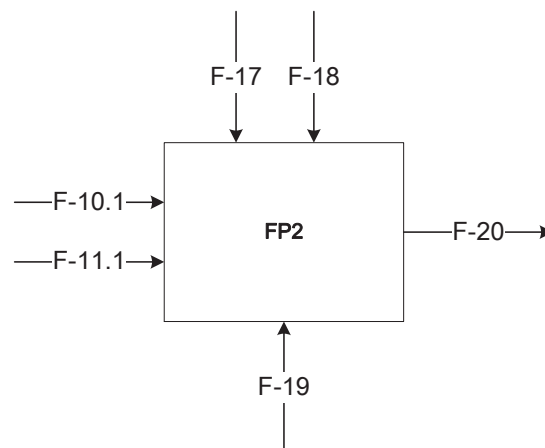


Figura 4.8: Corrientes involucradas en el biorreactor 2 (FP2) en *P. pastoris*.

Sabiendo que el inóculo es el 10% del volumen total de la fermentación en el caso de FP1 y FP2, las corrientes faltantes al fermentador se puede determinar por un balance de masa por medio de la Ecuación 4.15 a un determinado compuesto disuelto en cada medio concentrados.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Ecuación 4.15

Dónde,

$C_1$ : Concentración del compuesto en la corriente de alimentación, [g/L].

$V_1$ : Volumen de la corriente de alimentación, [L].

$C_2$ : Concentración del compuesto en el biorreactor, [g/L].

$V_2$ : Volumen útil del biorreactor, [L].

Calculando para el medio BSM, si el compuesto al cual se le realiza el balance de masa es al  $H_3PO_4$ , el balance para el fermentador FP1 queda de la siguiente manera:



$$288 \left[ \frac{g}{L} \right] \cdot V_1 = 0,35 \left[ \frac{g}{L} \right] \cdot 10,9[L]$$

$$V_1 = \frac{0,35 \cdot 10,9}{288} = 0,01[L]$$

Luego, se deben agregar 0,01 [L] de medio BSM provenientes del estanque E-2 al fermentador FP1. Para el medio PTM1 el compuesto al cual se le realiza el balance es al  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Se realiza el mismo procedimiento para calcular la glucosa en FP1 y FP2. La composición de las corrientes involucradas en FP1 y FP2 se resumen en la Tabla 4.18 para FP1 y Tabla 4.19 para FP2.

Tabla 4.18: Balance de masa a FP1 en *P. pastoris*.

Corriente	Compuesto	Masa [kg]	Volumen [L]
F-16	Inóculo	1.09	1.09
F-10.1	BSM	0.01	0.01
F-11.1	PTM1	1.13	2.73
F-15	Glucosa	0.13	0.14
F-14	Agua	6.93	6.93
F-17	Inóculo de FP2	10.9	10.9

Tabla 4.19: Balance de masa a FP2 en *P. pastoris*.

Corriente	Compuesto	Masa [g]	Volumen [L]
F-17	Inóculo	10.9	10.9
F-10.2	BSM	0.09	0.13
F-11.2	PTM1	11.34	27.26
F-19	Glucosa	12.98	1.44
F-18	Agua	69.27	69.27
F-20	Inóculo de FU	109	109

## b) Etapa de Producción en Cultivo con *P. pastoris*

Para el diseño y desarrollo de esta etapa es necesario diferenciar que, aunque los procesos se llevan a cabo en el mismo espacio físico (FU), se distinguen dos modalidades de operación distintas y tres etapas consecutivas que cumplen diferentes funciones dentro de la producción de rBoIFN- $\alpha$ : Cultivo por lote, cultivo por lote alimentado exponencialmente con glicerol, y cultivo por lote alimentado exponencialmente con metanol (inducción).

### Estimación del Volumen de Reactor

Considerando la masa de la proteína de interés que se debe producir anualmente determinada en el Capítulo 2, se procede en primer lugar a estimar un volumen de reactor suficiente para producir la cantidad estipulada de rBoIFN- $\alpha$  al año.

Tomando en cuenta que la planta de proceso se mantiene en operación durante 51 semanas al año, ésta deberá cumplir con la producción anual produciendo 496 gramos por semana, realizando una fermentación de producción por semana.

Con la Ecuación 4.16, donde “M” es la masa de rBoIFN- $\alpha$  que se debe producir anualmente según el mercado que se quiere abarcar, “N” el número de cultivos que se realiza anualmente, “X” la concentración celular necesaria capaz de producir la cantidad de proteína recombinante rBoIFN- $\alpha$ , “ $q_{IFN}$ ” la productividad específica de rBoIFN- $\alpha$ , “R” el rendimiento global de las etapas de recuperación y purificación y “t” el tiempo de cultivo total, se determina el volumen útil del reactor (V).

$$V = \frac{M}{q_{IFN} \cdot X \cdot R \cdot t \cdot N}$$

Ecuación 4.16

Esta ecuación utiliza información que aún no ha sido calculada como es la concentración celular alcanzada al final de la fermentación en el reactor, sin embargo se utiliza una concentración a la cual se considera necesaria llegar para inducir la producción de la proteína recombinante. Por lo que para resolver este problema (considerando que el volumen del reactor es aproximado y la disponibilidad de equipos en el mercado) es que se estima de forma gruesa asignando valores a cada parámetro según lo que se pretende alcanzar. Una vez estimado el volumen, se procede a realizar cada balance y a determinar las variables y el comportamiento del cultivo a lo largo del tiempo; así una vez obtenido estos valores es que se recalcula el volumen del reactor. En el caso de que la variación sea muy grande, se debe proceder a realizar nuevamente los cálculos desarrollados y volver a estimar un nuevo volumen. En caso de que la variación sea pequeña y mientras se ajuste al volumen seleccionado de reactor según la disponibilidad en el mercado, entonces se establece como volumen definitivo, resolviendo finalmente la determinación del volumen útil del reactor con un tanteo simple (Müller & Gerding, 2014).

Luego reemplazando por primera vez en la ecuación de volumen con las estimaciones realizadas se tiene:

$$V = \frac{M}{q_{IFN} \cdot X \cdot R \cdot t \cdot N} = \frac{25000 [gIFN]}{0,000035 \left[ \frac{gIFN}{gcel \cdot h} \right] \cdot 100 \left[ \frac{g cel}{L} \right] \cdot 0,7 \cdot 62 [h] \cdot 51} = 2668 [L]$$

$$V = 2668 [L]$$

Una vez realizado el primer tanteo, con el volumen estimado se realizan los cálculos para recalculer los valores de X, V y t. Luego de desarrollar una modelación de la fermentación se obtiene un volumen de trabajo aproximado de 2728 [L] por lote de producción, este volumen permite realizar los primeros balances de masa. De acuerdo a los equipos encontrados en el mercado se elige un fermentador de 3000 [L]. Fijado el volumen de reactor, para una fermentación por lote alimentado se considera que el volumen inicial de fermentación corresponde al 40% del volumen de trabajo, por lo tanto  $V_0=1090$  [L].

### **Desarrollo de modelos matemáticos y métodos numéricos**

El modelo matemático que describe el comportamiento de un cultivo por lote alimentado se basa en tres ecuaciones (ver Ecuación 5.20; 5.21; 5.22) que son descritas en esta misma sección, pero en la parte de Modalidad cultivo por lote alimentado. El sistema de 3 ecuaciones diferenciales, cuya variable independiente es el tiempo (t), fue resuelto utilizando el método numérico Runge Kutta de 4° orden en el programa Microsoft Excel®. Los resultados del método numérico permitieron determinar los volúmenes iniciales y finales de la fermentación de producción, así como también el perfil de flujo exponencial que satisface los requerimientos metabólicos para alcanzar determinada concentración de biomasa en un determinado tiempo. Los resultados se expresan en la sección Modalidad Cultivo por Lote Alimentado Exponencialmente con Glicerol y también con Metanol, para *P. pastoris*. Para *E. coli* se reprodujo el mismo método de solución.

### **Modalidad cultivo por Lote (FU<sub>lote</sub>)**

Ésta etapa corresponde a una modalidad de cultivo por lote con glicerol como fuente de carbono. Durante esta fase, la producción de proteína se encuentra reprimida, pero

la concentración de biomasa aumenta rápidamente ya que se trabaja a la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{\max}$ ) posible con glicerol como fuente de carbono.

Para simplificar la esquematización de la etapa de producción la Figura 4.9 muestra los flujos involucrados en todo el proceso, esto es:  $F_{U_{LOTE}}$ ,  $F_{U_{CLA1}}$ ,  $F_{U_{CLA2}}$ . Es importante antes mencionar, que las corrientes F-lote y F-cla1 (en línea punteada) no existen como tal, y solo se muestran con el objeto de hacer un balance de masa a los componentes que pasan a la siguiente etapa en el CLA.

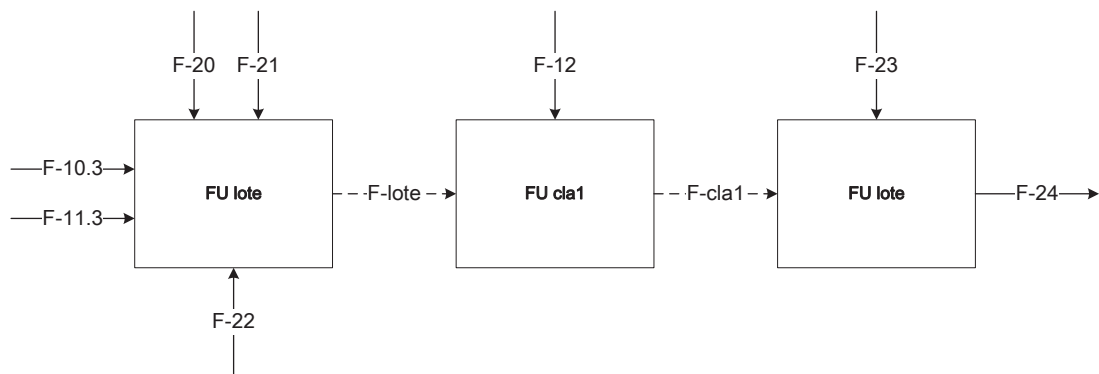


Figura 4. 9: Corrientes involucradas en el biorreactor 3 ( $F_{U_{lote}}$ ) en toda la etapa de producción en *P. pastoris*.

El volumen de esta etapa se ha fijado en un 40% del volumen final de fermentación. Mientras que la concentración final de biomasa del lote se fijó en 30 [g/L], momento adecuado para comenzar el cultivo por lote alimentado.

Para poder determinar la cantidad de medio BSM, PTM, y glicerol a agregar en esta etapa se utiliza la Ecuación 4.15 tomando en cuenta las concentraciones que deben tener los compuestos en el fermentador FU (ver Tabla 4.3; 4.4; 4.5). El resumen del balance de masa para la etapa por lotes se detalla en la Tabla 4.17.

Tabla 4.20: Balance de masa a FU<sub>lote</sub> en *P. pastoris*.

Corriente	Compuesto	Masa [kg]	Volumen [L]
F-10.3	BSM	66.80	92.94
F-11.3	PTM1	283.71	682.23
F-20	Inóculo	10.90	109
F-21	Agua	164.13	164.13
F-22	Glicerol	52.53	41.69
F-lote	Biomasa [g]	3.27	109

Las ecuaciones de diseño para esta etapa al igual que en los biorreactores de propagación son las siguientes:

### Balance de Biomasa

$$\frac{d(X \cdot V)}{dt} = \mu \cdot X \cdot V$$

Ecuación 4.17

Como el volumen de fermentación permanece constante:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

Ecuación 4.18

Integrando y considerando la zona de crecimiento exponencial:

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_{max} \cdot t$$

Ecuación 4.19

Dónde,

$X_f$ : Biomasa final alcanzada en lote, [g/L].

$X_0$ : Biomasa inicial en lote, [g/L].

$\mu_m$ : Velocidad máxima de crecimiento, [ $h^{-1}$ ].

t: Tiempo de crecimiento exponencial, [h]

V: Volumen de reacción que se mantiene constante, [L].

Las condiciones iniciales para la operación por lote, están dadas por la composición del medio de cultivo, asumiendo que no hay productos metabólicos al inicio del cultivo y suponiendo que para un  $t=0$  [h] el cultivo crece a una velocidad máxima de crecimiento  $\mu=\mu_{max}$ .

Ejemplo de cálculo:

$$\ln \frac{30}{0,6} = 0,26 \cdot t$$

Empleando la Ecuación 4.19 se obtiene que el tiempo total del cultivo por lote es de 15,1 [h]. En la Tabla 4.18 se presentan las condiciones de fermentación del cultivo por lote de la etapa de producción.

Tabla 4.21: Condiciones de fermentación del cultivo por lote en  $FU_{lote}$ .

Condiciones	Valor
$\mu_{max}$ [ $h^{-1}$ ]	0,26
T [ $^{\circ}C$ ]	30
$X_0$ [g/L]	0,6
t [h]	15
$X_f$ [g/L]	30
V [L]	1.090

### Modalidad Cultivo por Lote Alimentado Exponencialmente con glicerol (FU<sub>cla1</sub>)

Una vez que alcanzada la concentración celular deseada en la etapa por lote, la siguiente etapa, es en modalidad lote alimentado exponencialmente con glicerol como fuente de carbono. Esta etapa es más corta (aproximadamente 4 [h]) y tiene como objetivo aumentar aún más la concentración de biomasa, mientras se prepara las células para el cambio de sustrato. Además se decide realizar el cambio de alimentación de glicerol a metanol a concentraciones de biomasa cercanas a 50 [g/L].

La Tabla 4.22 muestra el balance de masa al biorreactor FU<sub>cla1</sub>.

Tabla 4.22: Balance de masa a FU<sub>cla1</sub> en *P. pastoris*.

Compuesto	F-12	F-lote	F-cla1
Glicerol [kg]	60.45	0	0
BSM [kg]	0	13.36	0
PTM1 [kg]	0	56.74	0
Agua [kg]	86.35	1.09	1176.35
Biomasa [kg]	0	32.70	59.99

Las ecuaciones de diseño del cultivo por lote alimentado exponencialmente corresponden a la Ecuación 4.20; 4.21; y 4.22, y se detallan a continuación.

#### Variación de volumen:

$$\frac{dV}{dt} = F(t)$$

Ecuación 4.20

#### Balance de sustrato:

$$\frac{dS_R V}{dt} = F \cdot S_F - \frac{\mu \cdot X \cdot V}{Y_{x/s}}$$

Ecuación 4.21

De acuerdo a la relación de Monod, para que un cultivo crezca a “ $\mu$ ” constante, se debe imponer que durante todo el CLA la concentración de sustrato limitante en el fermentador ( $S_R$ ) sea constante.

Balance de biomasa:

$$\frac{dXV}{dt} = \mu \cdot X \cdot V$$

Ecuación 4.22

Diferenciando la Ecuación 4.21 y a continuación reemplazando en ella la Ecuación 4.20 y la ecuación 4.21 previamente integrada ( $\mu$  cte), se obtiene:

$$S_R \cdot F = F \cdot S_F - \frac{\mu}{Y_{X/S}} \cdot X_0 \cdot V_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$$

Ecuación 4.23

De donde se puede despejar F, llegando a la Ecuación 4.24.

$$F = \frac{\mu \cdot X_0 \cdot V_0 \cdot e^{\mu \cdot t}}{Y \cdot (S_F - S_R)}$$

Ecuación 4.24

Dónde,

F: Flujo de alimentación en el tiempo, [L/h].

$Y_{X/S}$ : rendimiento de sustrato en biomasa, [g/g].



$S_F$ : Concentración de sustrato en la alimentación, [g/L].

$S_R$ : Concentración de sustrato residual, [g/L].

Resolviendo por Runge-Kutta las ecuaciones 4.20; 4.21; y 4.22 se obtiene la solución al sistema de ecuaciones planteado. En la Figura 4.11 se muestra el gráfico de la variación de biomasa, mientras que en la Figura 4.12 se muestra el gráfico con el perfil del flujo de alimentación de glicerol.

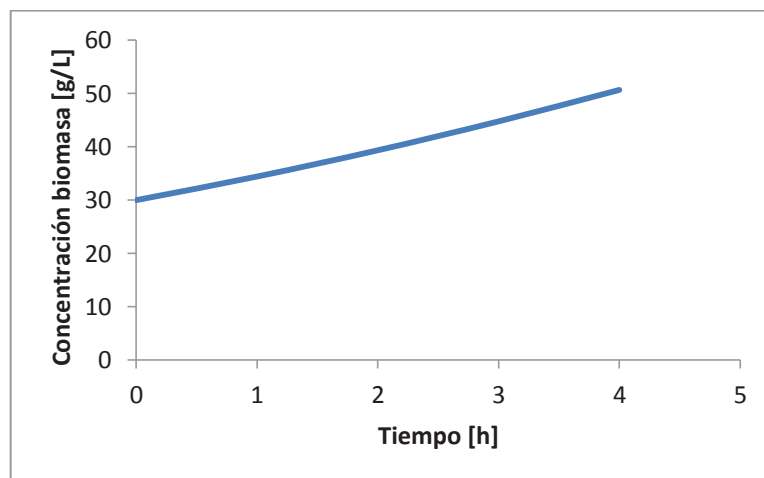


Figura 4.10: Comportamiento de la biomasa en  $FU_{cla1}$  en *P. pastoris*.

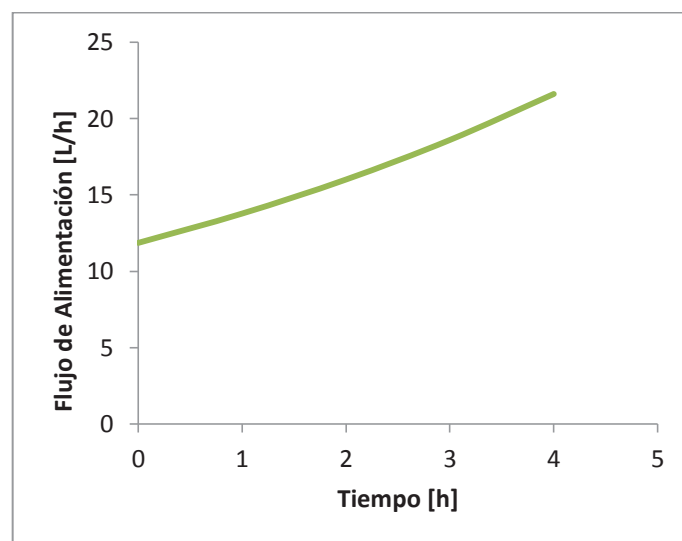


Figura 4.11: Variación del flujo de alimentación en  $FU_{cla1}$  en *P. pastoris*.

En la Tabla 4.23 se muestra el resumen de las condiciones del cultivo por Lote Alimentado con Glicerol.

Tabla 4.23: Condiciones de fermentación en  $FU_{cla1}$  alimentado exponencial con glicerol en *P. pastoris*.

Condiciones	Valor
$\mu_{set}$ [ $h^{-1}$ ]	0,15
$X_0$ [g/L]	30
$Y_{x/glicerol}$ [g/g]	0,6
$S_R$ [g/L]	10
$S_{feed}$ [g/L]	700
$V_0$ [L]	1.090
$V_f$ [L]	1.176,4
$t$ [h]	4
$X_f$ [g/L]	50,7

#### Modalidad Cultivo por Lote Alimentado Exponencialmente con Metanol ( $FU_{cla2}$ )

La última etapa de fermentación, es la etapa de producción tal, por medio de una inducción en modalidad de lote alimentado con metanol. Esta última fase debe llevar a concentraciones de biomasa mayores a 150 [g/L] dentro de 2-3 días (Hao et al., 2006). Como se mencionó anteriormente, la inducción se realiza con una corriente alimentada exponencialmente y la velocidad específica de crecimiento  $\mu$  permanece constante, igual a 0,026 [ $h^{-1}$ ], que de acuerdo al estudio realizado por Wu et al., (2011), a esta velocidad de crecimiento, y con las condiciones de operación optimizadas, la productividad de la proteína interferón fue la mayor sin presentar inhibiciones.

En la Tabla 4.24 se el balance de masa asociado a esta etapa.

Tabla 4.24: Balance de masa a  $FU_{cla2}$  en *P. pastoris*.

Compuesto	F-cla1	F-23	F-24
Metanol [kg]	0	1.326,66	0
BSM [kg]	13,36	0	13,36
PTM1 [kg]	56,74	0	56,74
Biomasa [kg]	60	0	416,45
rBoIFN- $\alpha$ [g]	0	0	703,7
Agua [kg]	1.176,35	1.552	2.728

El modelamiento de esta etapa se realizó de la misma forma que para  $FU_{cla1}$  y los perfiles de biomasa (azul) e IFN (rojo), y de flujo de alimentación se muestran en las Figuras 4.12 y 4.13, respectivamente.

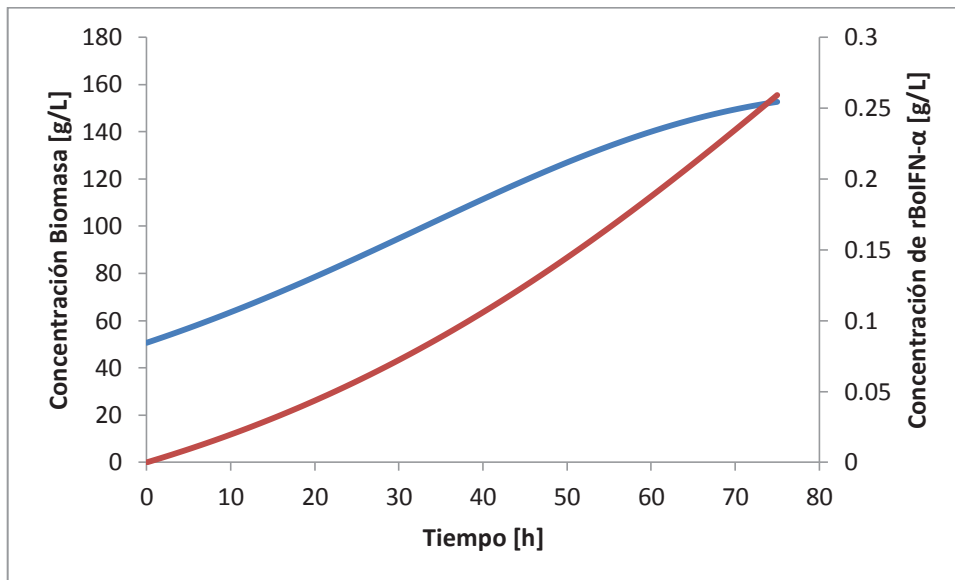


Figura 4.12: Comportamiento de la de biomasa y producto en  $FU_{cla2}$  en *P. pastoris*.

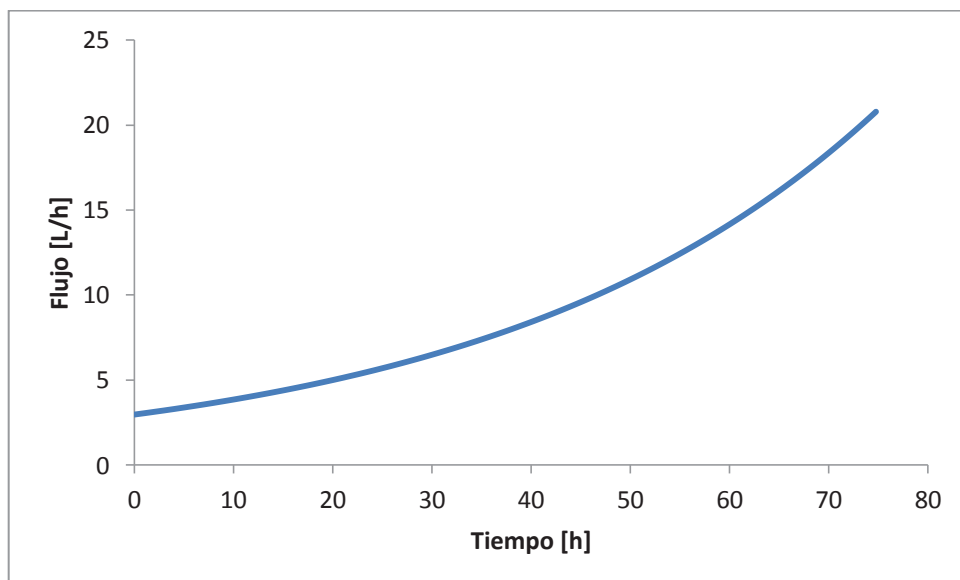


Figura 4.13: Variación del flujo de alimentación en  $FU_{cla2}$  en *P. pastoris*.

En la Tabla 4.25 se resumen las condiciones del cultivo por lote alimentado con metanol.

Tabla 4.25: Condiciones de fermentación en  $FU_{\text{cla2}}$  alimentado exponencial con metanol en *P. pastoris*.

Condiciones	Valor
$\mu_{\text{set}} [\text{h}^{-1}]$	0,026
$X_0 [\text{g/L}]$	50,7
$Y_{\text{x/metanol}} [\text{g/g}]$	0,61
$S_R [\text{g/L}]$	0,75
$S_{\text{feed}} [\text{g/L}]$	855
$V_0 [\text{L}]$	1.176,4
$q_{\text{IFN}} [\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$	0,000035
$t [\text{h}]$	75
$X_f [\text{g/L}]$	152,5

### c) Demanda y Transferencia de Oxígeno (Aireación)

Dado un balance de masa se puede establecer la variación de la concentración de oxígeno ( $C_L$ ) como la diferencia entre la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) y la velocidad de consumo del mismo (VCO), como se muestra en la Ecuación 4.25.

$$\frac{dC_L}{dt} = VTO - VCO$$

Ecuación 4.25

Para que el proceso no sea limitado por oxígeno, la velocidad de consumo de oxígeno y la velocidad de transferencia de oxígeno deben al menos ser iguales. Este es el supuesto principal para realizar los cálculos en esta sección. Para que el proceso no tenga limitación de oxígeno se debe cumplir que:

$$VCO = VTO$$

La VCO se describe en la Ecuación 4.26.

$$VCO = q_{O_2} \cdot X_f$$

Ecuación 4.26

Dónde,

$q_{O_2}$ : Velocidad específica de consumo de oxígeno, [ $g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ ].

$X_f$ : Concentración de biomasa, [g/L].

Para determinar la demanda de oxígeno en la Tabla 4.26, se cuenta con los datos de la concentración de biomasa (X), la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el rendimiento de oxígeno en biomasa ( $Y_{O_2}$ ) para determinar la velocidad específica de consumo de oxígeno.

Tabla 4.26: Parámetros para la transferencia de  $O_2$  en *P. pastoris*.

Variables	FP1	FP2	FU <sub>lote</sub>	FU <sub>cla1</sub>	FU <sub>cla2</sub>	Referencia
$\mu$ [ $h^{-1}$ ]	0,6	0,6	0,26	0,15	0,026	Wu et al.,
T [ $^{\circ}C$ ]	30	30	30	30	26	2011
$Y_{O_2}$	1,217	1,217	1,217	1,217	1,5	Jahic et al., 2002
$C^*$ [mmol $O_2$ /L]	1,2	1,2	1,2	1,2	1,272	-
X [g/L]	6	6	30	50,7	152,7	-
V [L]	10,9	109	1.090	1.176,4	2.728	-

La velocidad específica de consumo de oxígeno por parte del cultivo se determina con la Ecuación 4.27

$$q_{O_2} = \frac{\mu}{Y_{O_2}}$$

Ecuación 4.27

Dónde,

$\mu$ : Velocidad específica de crecimiento, [ $h^{-1}$ ].

$Y_{O_2}$ : Rendimiento de oxígeno en biomasa, [g/g].

La cantidad de biomasa a la cual se determina la demanda de oxígeno (VCO) en los cultivos CLA, es la máxima concentración alcanzada en el biorreactor al final del lote alimentado con glicerol y al final del lote alimentado con metanol, ya que en esta condición el cultivo demandará una mayor cantidad de oxígeno.

Ejemplo de Cálculo:

$$q_{O_2} = \frac{0,6 [h^{-1}]}{1,217 \left[ \frac{gO_2}{gCélulas} \right]} = 0,493 \left[ \frac{gO_2}{gCélulas \cdot h} \right]$$

Por otra parte, la tasa específica de flujo de aire al reactor medida en volumen de gas por volumen de líquido por minuto [vvm] puede determinarse mediante la Ecuación 4.28.

$$\frac{F}{V} = \frac{N_a \cdot 22,4 \cdot T}{1000 \cdot 0,21 \cdot \varepsilon \cdot \pi \cdot 273 \cdot 60}$$

Ecuación 4.28

Dónde,

$F/V$ : Tasa específica de aireación, [vvm].

$N_a$ : Requerimiento de aire, [ $mmol O_2 \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ]. Igual a VCO [ $mmol O_2 \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ].

$T$ : Temperatura, [K].

$\varepsilon$ : Tasa de absorción.

$\pi$ : Presión, [atm]; 1 [atm].

Así, estableciendo que se trabaja a una presión de 1 [atm] y una tasa de absorción promedio estimada de 20% (Acevedo, 2002), se calcula el flujo de aire por volumen de líquido requerido.

Ejemplo de Cálculo:

$$\frac{F}{V} = \frac{92,440 \left[ \frac{\text{mmol } O_2}{L \cdot h} \right] \cdot 22,4 \cdot 303 [K]}{1000 \cdot 0,21 \cdot 0,2 \cdot 1[\text{atm}] \cdot 273 \cdot 60} = 0,912 [vvm]$$

Como ya se ha mencionado en el Capítulo 3 (Ver Sección 3.2.1), la tensión de oxígeno disuelto se pretende mantener al 20%. De acuerdo a esto, y con el valor de VTO calculado (considerando VTO=VCO), es posible obtener el valor de  $K_L a$  según la Ecuación 4.29.

$$VTO = k_L a \cdot (C^* - C_L)$$

Ecuación 4.29

Además, la concentración de oxígeno disuelto ( $C_L$ ), se determina según la Ecuación 4.30.

$$C_L = \frac{C^* \cdot \%TOD}{100}$$

Ecuación 4.30

Dónde,

VTO: Velocidad de transferencia de oxígeno, [ $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ].

$k_L a$ : Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, [ $h^{-1}$ ]

$C^*$ : Solubilidad del oxígeno puro, [mg/L].

$C_L$ : Oxígeno disuelto, [mg/L].

%TOD: Porcentaje de saturación de oxígeno disuelto.

Ejemplo de Cálculo:

$$C_L = \frac{1,2 \left[ \frac{\text{mmol } O_2}{L} \right] \cdot 20}{100} = 0,408 \left[ \frac{\text{mmol } O_2}{L} \right];$$

$$92,440 \left[ \frac{\text{mmol } O_2}{L \cdot h} \right] = k_L a \cdot \left( 1,2 \left[ \frac{\text{mmol } O_2}{L} \right] - 0,408 \left[ \frac{\text{mmol } O_2}{L} \right] \right)$$

$$k_L a = 116,72 [h^{-1}]$$

Por otra parte, para determinar el caudal de aire que se necesita suministrar, se debe conocer la cantidad de volumen de aire por volumen de medio de cultivo por minuto (vvm) necesaria para satisfacer los requerimientos de oxígeno, y se relacionan según la Ecuación 4.31.

$$vvm = \frac{F}{V}$$

Ecuación 4.31

Reordenando,

$$F = V \cdot vvm$$

Ejemplo de Cálculo:



$$F = 10,9 [L] \cdot 0,912 [min^{-1}] = 9,95 \left[ \frac{L}{min} \right]$$

En la Tabla 4.27 se presenta un cuadro resumen con los resultados de la demanda y transferencia de oxígeno para los biorreactores de propagación FP1 y FP2, y para el biorreactor FU en sus tres etapas.

Tabla 4.27: Resultados de la demanda y transferencia de oxígeno en *P. Pastoris*.

Variable	FP1	FP2	FU <sub>lote</sub>	FU <sub>cla1</sub>	FU <sub>cla2</sub>
q <sub>O2</sub> [h·g <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> ]	0,493	0,493	0,214	0,123	0,017
Biomasa [g/L]	6	6	30	50,7	152,7
VCO [mmolO <sub>2</sub> ·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ]	92,440	92,440	200,3	195,091	82,685
k <sub>La</sub> [h <sup>-1</sup> ]	116,7	116,7	252,888	246,327	98,5
vvm [min <sup>-1</sup> ]	0,912	0,912	1,977	1,926	0,805
F [m <sup>3</sup> /h]	0,597	5,967	129,292	135,915	131,82

De acuerdo a la Ecuación 4.26 es posible concluir que la demanda irá cambiando a medida que la concentración de biomasa aumente. Sin embargo, para fines de cálculo se asumieron las condiciones finales de la fermentación donde se representa la mayor concentración a la cual se espera que el proceso no se vea limitado por oxígeno.

#### d) Balance de Energía

La temperatura a la cual se desarrolla la fermentación es una de las condiciones de operación más relevante dentro de las variables que se puede controlar. Para mantener la temperatura seleccionada es necesario realizar un control continuo de la temperatura, por lo general este control se lleva a cabo mediante un sistema de serpentín o una chaqueta presente en el biorreactor.

A continuación se presentan las ecuaciones para definir los requerimientos de energía en el proceso de fermentación. Para el caso del proceso de producción con *P. pastoris*, se trabaja a las temperaturas de 30 [°C] y a 26 [°C] para la inducción con metanol.

Un balance simplificado de energía térmica en torno al fermentador resulta en la Ecuación 4.32 (Bailey y Ollis, 1986).

$$Q_F + Q_A = Q_P + Q_R$$

Ecuación 4.32

### Calor generado por fermentación

El calor generado por el metabolismo celular se relaciona directamente con la velocidad de consumo de oxígeno. El calor de fermentación en fermentaciones aerobias se puede determinar según la Ecuación 4.33 (Acevedo, 2002).

$$Q_F = 0,12 \cdot VCO \cdot V$$

Ecuación 4.33

Ejemplo de cálculo:

$$Q_F = 0,12 \cdot 92,440 \left[ \frac{\text{mmol } O_2}{L \cdot h} \right] \cdot 10,9 [L] = 120,9 \left[ \frac{\text{kcal}}{h} \right]$$

Con el objetivo de mantener la temperatura seleccionada para el proceso, es necesario realizar un control continuo de la temperatura. Para retirar el calor neto generado se pueden utilizar distintos equipos, como se detalla en la Tabla 4.28.

Tabla 4.28: Equipo de transferencia de calor en fermentadores.

Equipo	Usos y limitaciones
Chaqueta	Se utiliza en algunos equipos de tamaño piloto. Alto costo y área de transferencia limitada
Serpentín	Es el más utilizado, por su bajo costo y alta área de transferencia. En casos extremos el área que proporciona no es suficiente
Lluvia externa	Barato y eficaz, usado a veces en conjunto con serpentines
Intercambiador externo	Para casos que serpentín no fuese suficiente. Aumenta costo y peligro de contaminación e insuficiencia de aireación

El equipo estándar es el serpentín sumergido, utilizando agua como fluido de enfriamiento.

#### Calor generado por agitación/aireación

El calor generado por la agitación del medio corresponde al 10% del calor generado por la fermentación, como se describe en la Ecuación 4.34.

$$Q_A = 0,1 \cdot Q_F$$

Ecuación 4.34

Ejemplo de cálculo:

$$Q_A = 0,1 \cdot 120,9 \left[ \frac{\text{kcal}}{\text{h}} \right] = 12,09 \left[ \frac{\text{kcal}}{\text{h}} \right]$$

#### Calor disipado por las paredes del fermentador

$Q_p$  puede ser evaluado según la Ecuación 4.35 considerando las pérdidas de calor por las paredes del cuerpo cilíndrico del fermentador. Para ello, se supone que la pared alcanza la temperatura constante del caldo y que la temperatura ambiente también es constante. Además el coeficiente de convección  $h$  puede suponerse de un valor comprendido entre 10 – 25 [kcal/h·m·°C] (Acevedo, 2002).

$$Q_p = h \cdot T \cdot H_L \cdot \pi \cdot (T_F - T_{Al})$$

Ecuación 4.35

$Q_p$ : Calor paredes, [J/s].

$h$ : Coeficiente convección = 20 [kcal/h·m·°C].

$H_L$ : Altura del fermentador, [m].

$T_f$ : Temperatura de fermentación, [°C].

$T_a$ : Temperatura ambiente, [°C] = 20 [°C].

$T$ : Diámetro del fermentador, [m].

$\pi$ : Presión, 1[atm].

La altura del líquido puede ser determinada desde el volumen del fermentador considerando que éste es un cuerpo cilíndrico, con la Ecuación 4.36.

$$H_L = 2 \cdot \sqrt[3]{\frac{4 \cdot V_F}{2 \cdot \pi}}$$

Ecuación 4.36

Ejemplo de cálculo:

$$H_L = 2 \cdot \sqrt[3]{\frac{4 \cdot 10,9 [L]}{2 \cdot \pi}} = 0,381 [m]$$

$$Q_p = 20 \left[ \frac{kcal}{h \cdot m \cdot ^\circ C} \right] \cdot 0,191 [m] \cdot 0,381 [m] \cdot \pi \cdot (30 [^\circ C] - 20 [^\circ C]) = 14,55 \left[ \frac{kcal}{h} \right]$$

Calor retirado por el sistema de enfriamiento

$Q_R$  se despeja a partir de la Ecuación 4.32 para determinar el calor de reacción que debe ser retirado por el sistema de enfriamiento.

$$Q_R = Q_F + Q_A - Q_P$$

Una vez obtenido  $Q_R$  con la ecuación 4.37 se despeja el flujo de agua necesario para enfriar el fermentador.

$$Q_R = M \cdot C_P \cdot (T_S - T_E)$$

Ecuación 4.37

Reordenando,

$$M = \frac{Q_R}{C_P \cdot (T_S - T_E)}$$

Dónde,

$C_P$ : Capacidad calorífica específica, [ $J \cdot g^{-1} \cdot ^\circ C^{-1}$ ] = 4,186 [ $J/g \cdot ^\circ C$ ].

$T_S$ : Temperatura a la cual se quiere mantener la fermentación, [ $^\circ C$ ].

$T_E$ : Temperatura del agua de enfriamiento, [ $^\circ C$ ] = 10 [ $^\circ C$ ].

Ejemplo de cálculo:

$$Q_R = 120,9 \left[ \frac{kcal}{h} \right] + 12,09 \left[ \frac{kcal}{h} \right] - 14,55 \left[ \frac{kcal}{h} \right] = 118,45 \left[ \frac{kcal}{h} \right]$$

$$M = \frac{118,45 \left[ \frac{\text{kcal}}{\text{h}} \right] \cdot 4184 \left[ \frac{\text{J}}{\text{kcal}} \right]}{4,186 \left[ \frac{\text{J}}{\text{g} \cdot ^\circ\text{C}} \right] \cdot (30 [^\circ\text{C}] - 10 [^\circ\text{C}])} = 5919,72 \left[ \frac{\text{g}}{\text{h}} \right] = 0,00592 \left[ \frac{\text{m}^3}{\text{h}} \right]$$

La Tabla 4.29 muestra un resumen del balance de energía para todos los fermentadores tanto de propagación como de producción.

Tabla 4.29: Resultados del balance de energía *P. pastoris*.

Parámetro	FP1	FP2	FU <sub>lote</sub>	FU <sub>cla1</sub>	FU <sub>cla2</sub>
T [°C]	30	30	30	30	26
Q <sub>F</sub> [kcal/h]	120,91	1.209,1	26.197,6	27.539,5	27.067,9
Q <sub>A</sub> [kcal/h]	12,1	120,9	2.619,7	2.753,9	2.706,7
Q <sub>P</sub> [kcal/h]	14,55	67,5	577,9	577,9	346,8
Q <sub>i</sub> [kcal/h]	118,5	1.262,5	28.239,5	29.715,6	29.426,9
M [m <sup>3</sup> /h]	0,0059	0,063	1,411	1,485	1,838

#### 4.1.5 Etapa de Recuperación y Purificación

##### a) Centrifugación (C-1)

Posterior a la fermentación es necesario separar la biomasa del caldo de cultivo para recuperar la proteína rBoIFN- $\alpha$  que ha sido secretada por las células de *P. pastoris* al medio, por lo que la separación de la biomasa se realizará por medio de una centrifugación.

En la Figura 4.14 se puede apreciar las corrientes de entrada y de salida de la centrifuga 1, en donde la corriente F-25 es la corriente de líquido clarificado, que contiene al IFN, y la corriente F-26 corresponde a los sólidos retenidos, que se desechan.

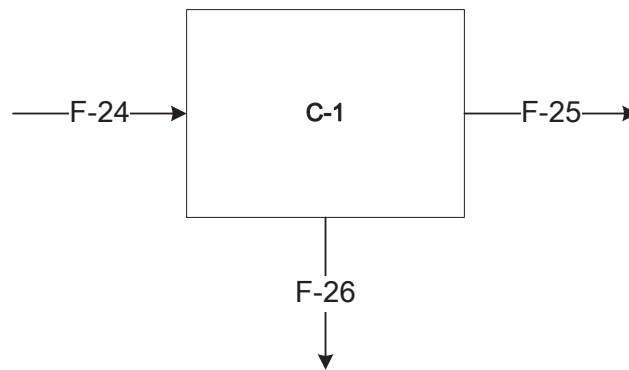


Figura 4.14: Corrientes asociadas a la centrifuga C-1 en *P. pastoris*.

Las condiciones iniciales de la centrifugación serán las finales provenientes de la fermentación en cultivo por lote alimentado. Considerando una retención de células de un 99,5%, la Ecuación 4.38 permite obtener la cantidad de células al final de la centrifugación en la corriente de clarificado.

$$C_{F-24} \cdot V_{F-24} \cdot 0,05 = C_{F-25} \cdot V_{F-25}$$

Ecuación 4.38

Dónde,

$C_{F-24}$ : concentración celular en la alimentación, [g/L].

$V_{F-24}$ : Volumen de la alimentación, [L].

$C_{F-25}$ : Concentración celular en la corriente de clarificado, [g/L].

$V_{F-25}$ : Volumen de la corriente de clarificado, [L].

Asumiendo que el líquido clarificado es un 95% del volumen inicial y que la corriente de proteína rBoIFN- $\alpha$  permanece constante en la entrada y la salida.

El concentrado de biomasa de cada centrifugación se almacenará en un estanque de desecho para luego enviarlos a una empresa externa para su tratamiento.

En la Tabla 4.30 se resume el balance de masa a la etapa de centrifugación.

Tabla 4.30: Composición de corrientes asociadas a la centrifuga 1 (C-1) en *P. pastoris*.

Compuesto	F-24	F-25	F-26
Agua [kg]	2.728,2	2.591.8	136.4
rBoIFN- $\alpha$ [g]	703,7	703,7	0
Biomasa [kg]	416.450,1	2,0823	414.367,9
BSM [kg]	13,35967	13,35968	0
PTM1 [kg]	56,7424	56,7425	0

### Balance de energía centrifugación

La centrifuga Alfa Laval CLARA 20, que fue elegida en el Capítulo 5 (ver sección 5.2), tiene un consumo de 3.7 kW. La operación de la centrifuga está diseñada para que dure 1 hora, con lo cual el consumo energético sería de 3.7 kWh, lo que anualmente se traduciría en 188.7 kWh/año.

### b) Cromatografía de Intercambio Iónico (C-IA)

#### Estanque de Mezclamiento (E-7) para dilución de clarificado

Luego de la centrifugación, el sobrenadante de la fermentación debe ser diluido con una solución de Tris-HCl 50 [mM], para luego ser cargada a la columna cromatográfica (C-IA).

Se ha decidido que la dilución se realizará con un volumen equivalente al 2% del volumen de trabajo (F-25). El estanque E-7 debe contener Tris-HCl. El buffer correspondiente al estanque tiene un volumen de 51,9 [L], y posee una concentración determinada en función de la dilución de las sales. Con la Ecuación 4.15, se puede determinar la concentración de Tris-HCl en el estanque E-7.

Ejemplo de cálculo: Concentración de Tris-HCl.

$$C_{E-7} \cdot 51,9 [L] = 50[mM] \cdot 2643,6[L]$$

$$C_{E-7} = 2550 [mM]$$

De esta manera se obtiene que la concentración de Tris-HCl en el estanque E-7 debe ser 2550 [mM], lo cual es posible considerando la solubilidad del compuesto en agua es de 5506 [mM]. El balance de masa al estanque E-7 queda resumido en la Tabla 4.31.



Tabla 4.31: Balance de masa al estanque de buffer (E-7) en *P. pastoris*.

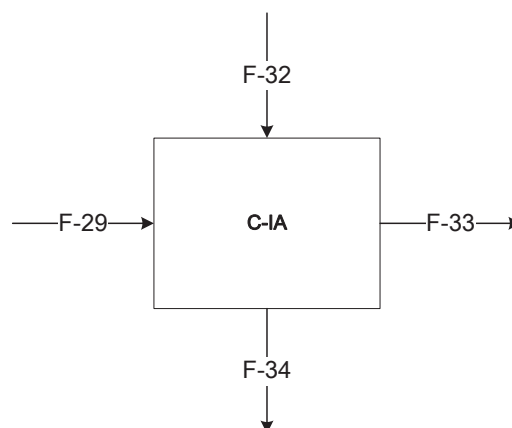
Compuesto	F-25	F-28	F-27	F-29
Agua [kg]	2.591,80	0	51,9	2.643,70
rBoIFN- $\alpha$ [g]	703,7	0	0	703,7
Biomasa [kg]	2,08	0	0	2,08
BSM [kg]	13,36	0	0	13,36
PTM1 [kg]	56,74	0	0	56,74
Tris-HCl [kg]	0	20,83	0	20,83

### Cromatografía de intercambio aniónico

Siguiendo el protocolo de purificación, en esta etapa se utilizan diferentes soluciones buffer para equilibrar, cargar, lavar y eluir la proteína de interés con el objetivo de aumentar su pureza. Para simplificar el análisis se limitará a evaluar sólo los rendimientos de la proteína de interés en esta etapa, y a determinar los volúmenes de buffer a utilizar en cada una de las etapas, además de la composición de entrada de cada uno de esos buffer.

Para simplificar el cálculo, se considerará que la composición de la solución final obtenida de esta etapa corresponde a una mezcla de la proteína retenida más las sales en las concentraciones establecidas en el último buffer agregado, correspondiente al de elución.

Esta etapa consiste en un mecanismo que permite la separación de moléculas basada en sus propiedades de carga eléctrica, y será analizada en esta sección según el diagrama de bloques presentado en la Figura 4.17.

Figura 4.15: Corrientes involucradas en la unidad cromatográfica C-IA en *P. pastoris*.

La corriente F-29 contiene la masa de rBoIFN- $\alpha$  recuperada de la centrifugación, F-32 es la corriente que proporciona el buffer de elución, F-34 es la corriente de solución de desecho la cual lleva también un pequeño porcentaje de rBoIFN- $\alpha$  y F-33 es, finalmente, la corriente que lleva el producto hacia su formulación final.

Para realizar el balance de rBoIFN- $\alpha$  se utilizará como referencia el rendimiento calculado por Shi et al., (2007) para esta etapa, que equivale a un 89%, de esta forma el balance puede ser planteado de acuerdo a la Ecuación 4.39.

$$V_{F-29} \cdot [P]_{F-29} \cdot 0,89 = V_{F-33} \cdot [P]_{F-33}$$

Ecuación 4.39

Las cantidades de buffer a utilizar para esta etapa y la composición de cada solución se encuentran estandarizadas por protocolo, y el volumen de buffer a utilizar es expresado en CV (volumen de columna). Considerando que el volumen de la columna cromatográfica equivale a 514 [L] (ver sección 5.4.1), en la Tabla 4.32 se muestra la composición y cantidad de cada solución buffer en cada una de las etapas que se lleva a cabo (Equilibrado, lavado y elución).

Tabla 4.32: Cantidad y composición de soluciones buffer a utilizar en C-IA en *P. pastoris*.

	F-32		
	Equilibrado	Lavado	Eluido
Volumen [L]	2.568,25	2.568,25	5.136,5
NaCl [M]	0	0	0 – 1
Tris-HCl [mM]	50	50	50
EDTA [mM]	1	1	1
Sacarosa (%)	5	5	5
PMSF [mM]	1	1	1

En la Tabla 4.33 se describe finalmente el balance de masa al equipo C-IA.

Tabla 4.33: Balance de masa a la columna cromatográfica de intercambio iónico C-IA en *P. pastoris*.

Compuesto	F-29	F-33	F-32	F-34
Agua [kg]	2.643,61	1.818,90	10.273,00	11.097,71
rBoIFN- $\alpha$ [g]	703,72	626,31	0,00	77,41
NaCl [kg]	0,00	106,30	300,18	193,88
Tris-HCl [kg]	20,83	14,33	80,95	87,45
EDTA [kg]	0,00	0,53	3,00	2,47
Sacarosa [kg]	0,00	101,00	513,65	412,65
PMSF [kg]	0,00	0,32	1,79	1,47

### c) Ultrafiltración (UF-1)

La ultrafiltración tiene como objetivo concentrar el medio proveniente de la salida de la columna cromatográfica, con el fin de aumentar la concentración de rBoIFN- $\alpha$  en solución y facilitar el proceso de purificación. El volumen de entrada se reduce 20 veces, de forma que al tratar 1.818,9 [L], estos se reducen finalmente a 90,945 [L] de solución.

En la Figura 4.16 se muestra un diagrama con las corrientes asociadas al sistema.

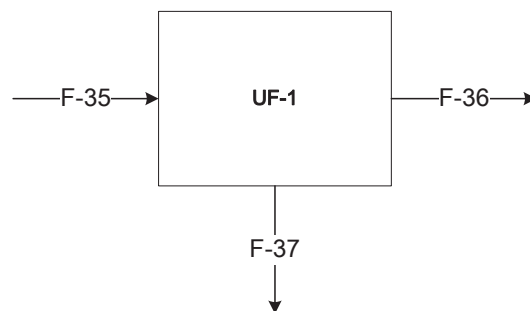


Figura 4.16: Corrientes asociadas a la etapa de ultrafiltración (UF-1) en *P. pastoris*.

El rendimiento de esta etapa está determinado por el coeficiente de retención de la membrana seleccionada que es mayor al 99%, con lo que se asegura una pérdida mínima de proteína. Por otro lado para determinar las concentraciones de los compuestos presentes otorgados por el buffer, supondremos un valor estimado para impurezas en general en este tipo de proceso del 5%.

El balance de la proteína en esta etapa está determinado por las Ecuaciones 4.40; 4.41; y 4.42.

$$R = \frac{[P]_{F-36}}{[P]_{F-35}} = 0,99$$

Ecuación 4.40

$$V_{F-35} \cdot [P]_{F-35} = V_{F-36} \cdot [P]_{F-36} + V_{F-37} \cdot [P]_{F-37}$$

Ecuación 4.41

$$V_{F-35} = V_{F-36} + V_{F-37}$$

Ecuación 4.42

En la Tabla 4.34 se presenta el balance de masa de la etapa de ultrafiltración.

Tabla 4.34: Balance de masa de equipo UF-1 en *P. pastoris*.

<b>Compuesto</b>	<b>F-35</b>	<b>F-37</b>	<b>F-36</b>
Agua [kg]	1.818,90	1.727,95	90,95
rBoIFN- $\alpha$ [g]	626,31	6,27	620,04
NaCl [kg]	106,30	100,99	5,32
Tris-HCl [kg]	14,33	13,61	0,72
EDTA [kg]	0,53	0,50	0,03
Sacarosa [kg]	101,00	95,95	5,05
PMSF [kg]	0,32	0,30	0,02

#### d) Cromatografía de exclusión molecular (C-EM)

Esta etapa corresponde al último paso del proceso de purificación, con el fin de obtener un producto en solución lo más puro posible. Este mecanismo consiste en la separación por tamaño, específicamente por peso molecular, y se analizará en esta sección según el diagrama de bloques presentado en la Figura 4.17.

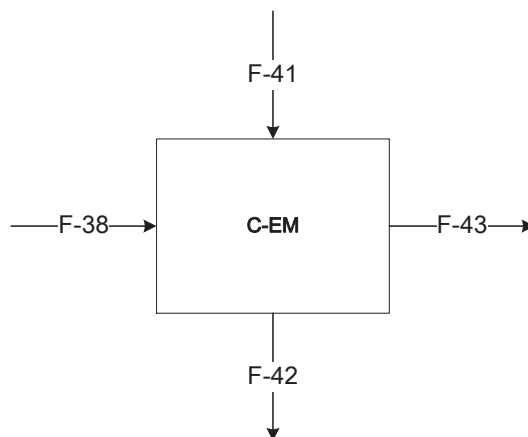


Figura 4.17: Corrientes involucradas en la unidad cromatográfica C-EM en *P. pastoris*.

La corriente de entrada a la columna F-38 contiene la masa de rBoIFN- $\alpha$  recuperada en la ultrafiltración, la corriente F-41 es del buffer de elución, F-42 es la corriente de desecho la cual lleva también un pequeño porcentaje de rBoIFN- $\alpha$  y F-43, es la corriente que lleva el producto hacia su formulación final.

El rendimiento de esta etapa de acuerdo a Shi et al., (2006) es de 80% y la pureza final de la proteína resulta ser mayor a un 95% (Shi et al., 2011).

El balance de masa de la proteína interes se plantea en la Ecuación 4.43.

$$V_{F-42} \cdot [P]_{F-42} = 0,8 \cdot V_{F-38} \cdot [P]_{F-38}$$

Ecuación 4.43

Por otro lado, la masa de contaminantes presentes en la solución viene dado por la Ecuación 4.44.

$$F_{F-42} \cdot [Contaminantes] = 0,05 \cdot \frac{0,8 \cdot F_{F-38} \cdot [P]_{F-38}}{0,95}$$

Ecuación 4.44

En la Tabla 4.35 se especifica la composición de la corriente que contiene la proteína de interés. La corriente F-43 corresponde a la fracción eluída que se desecha, por lo tanto no será caracterizada.

Tabla 4.35: Balance de masa cromatografía de exclusión molecular C-EM en *P. pastoris*.

Compuesto	F-38	F-42	F-41	F-43
Agua [kg]	90,95	90,95	598,50	598,500
rBoIFN- $\alpha$ [g]	620,04	496,04	0,00	124,009
Tris-HCl [kg]	0,72	0,0026	0,00	0,714
EDTA [kg]	0,03	0,0026	0,00	0,024
Sacarosa [kg]	5,05	0,0026	0,00	5,047
PMSF [kg]	0,02	0,0026	0,00	0,013
NaPO4 [kg]	0,00	0,0026	3,53	3,527
NaCl [kg]	5,32	0,0026	5,25	10,564

#### e) Rendimiento global del proceso de recuperación y purificación

Considerando que el rendimiento global de un proceso es dado por el producto entre los rendimientos de cada una de sus etapas, es que se puede calcular el rendimiento global del proceso de recuperación y purificación mediante la ecuación 4.45.

$$\eta_{global} = \prod \eta_i$$

Ecuación 4.45

Luego, el rendimiento global del proceso corresponde a un 70%, es decir de los 703,72 [mg] de rBoINF- $\alpha$  que ingresaron a la centrifuga (C-1), se recupera finalmente 496,035 [mg] en la corriente F-42, que es la corriente que se destina al producto final.

Ya que inicialmente la proteína de interés estaba contenida en un medio lleno de contaminantes de diversa índole (sales, proteína, etc); cabe destacar que finalizado este proceso, la pureza alcanzada es mayor a 95%, suficiente para ser comercializado como biofármaco.

#### **4.1.6 Etapa de Formulación Final**

Esta etapa presenta un balance simple, ya que básicamente en esta etapa se debe distribuir la solución proveniente de la corriente F-44, que es la corriente de salida del estanque de retención E-12, y disponerlas en frascos de acuerdo a las dosis que tendrá el producto. Posteriormente los frascos son liofilizados, por lo que el rendimiento de la proteína rBoIFN- $\alpha$  se espera que sea de un 100%.

En la Tabla 4.36 se resumen todas las corrientes del proceso y su composición.

Tabla 4.36: Resumen de composiciones de corrientes y balances de masa del sistema en *P. pastoris*.

Compuesto	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6	F-7	F-8	F-9	F-10.1	F-10.2	F-10.3	F-11.1	F-11.2
Agua [L]	14,461	93.09	712.22	86.35	1,552	0	0	0	0	0.01	0.13	92.94	2.73	27.26
Glicerol [g]	0	0	0	0	0	0	0	60,446.81	0	0	0	0	0	0
Glucosa [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metanol [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	1,086,153	0	0	0	0	0
BSM [g]	0	0	0	0	0	66,902.62	0	0	0	9.48	94.8	66,798.36	0	0
PTM1 [g]	0	0	0	0	0	0	296,182	0	0	0	0	0	1,133.60	11,336
Biomasa [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rBoIFN- $\alpha$ [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tris HCl [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaCl [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EDTA [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sacarosa [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PMSF [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inóculo [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaPO4 [kg]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Compuesto	F-11.3	F-12	F-13	F-14	F-15	F-16	F-17	F-18	F-19	F-20	F-21	F-22	F-23	F-24
Agua [L]	682.23	86.35	1552	6.93	0.14	1.09	10.9	69.27	1.44	109	164.13	41.69	1,552	2,728
Glicerol [g]	0	60,446.81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	52,534.43	0	0
Glucosa [g]	0	0	0	0	129.76	0	0	0	1,297.60	0	0	0	0	0
Metanol [g]	0	0	1,326,660	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,326,660	0
BSM [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13,359.67
PTM1 [g]	283,712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	56,742.40
Biomasa [g]	0	0	0	0	0	6.54	65.4	0	0	654	0	0	0	416,450.10
rBoIFN- $\alpha$ [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	703.7
Tris HCl [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaCl [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EDTA [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sacarosa [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PMSF [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inóculo [g]	0	0	0	0	0	0	108,346.00	0	0	108,346	0	0	0	0
NaPO4 [kg]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Compuesto	F-25	F-26	F-27	F-28	F-29	F-30	F-31	F-32	F-33	F-34	F-35	F-36	F-37	F-38
Agua [L]	2,591.80	136.4	51.9	0	2,643.70	10,273	0	10,273	1,818.90	11,097.71	1,818.90	90.95	1,727.95	90.95
Glicerol [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucosa [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metanol [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BSM [g]	13,359.67	0	0	0	13,359.67	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PTM1 [g]	56,742.40	0	0	0	56,742.40	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa [g]	2,082.30	414,367.90	0	0	2,082.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rBoIFN- $\alpha$ [g]	703.7	0	0	0	703.7	0	0	0	626.31	77.41	626.31	620.044	6.27	620.044
Tris HCl [g]	0	0	0	10,032.30	10,032.30	0	80,950	80,950	14,330	87,450	14,330	720	13,610	720
NaCl [g]	0	0	0	0	0	0	300,180	300,180	106,300	193,880	106,300	5,310	100,990	5,310
EDTA [g]	0	0	0	0	0	0	3	3	531.56	2,470	531.56	26.58	504.98	26.58
Sacarosa [g]	0	0	0	0	0	0	513,650	513,650	101,000	412,650	101,000	5,050	95,950	5,050
PMSF [g]	0	0	0	0	0	0	1,790	1,790	316.85	1,470	316.85	20	296.85	20
Inóculo [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaPO4 [kg]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Compuesto	F-39	F-40	F-41	F-42	F-43
Agua [L]	598.5	0	598.5	90.95	598.5
Glicerol [g]	0	0	0	0	0
Glucosa [g]	0	0	0	0	0
Metanol [g]	0	0	0	0	0
BSM [g]	0	0	0	0	0
PTM1 [g]	0	0	0	0	0
Biomasa [g]	0	0	0	0	0
rBoIFN- $\alpha$ [g]	0	0	0	496.04	124.009
Tris HCl [g]	0	0	0	2.6	714
NaCl [g]	0	5,250	5,250	2.6	10,564
EDTA [g]	0	0	0	2.6	24
Sacarosa [g]	0	0	0	2.6	5,047
PMSF [g]	0	0	0	2.6	13
Inóculo [g]	0	0	0	0	0
NaPO4 [g]	0	3,530	3,530	3.6	3,527



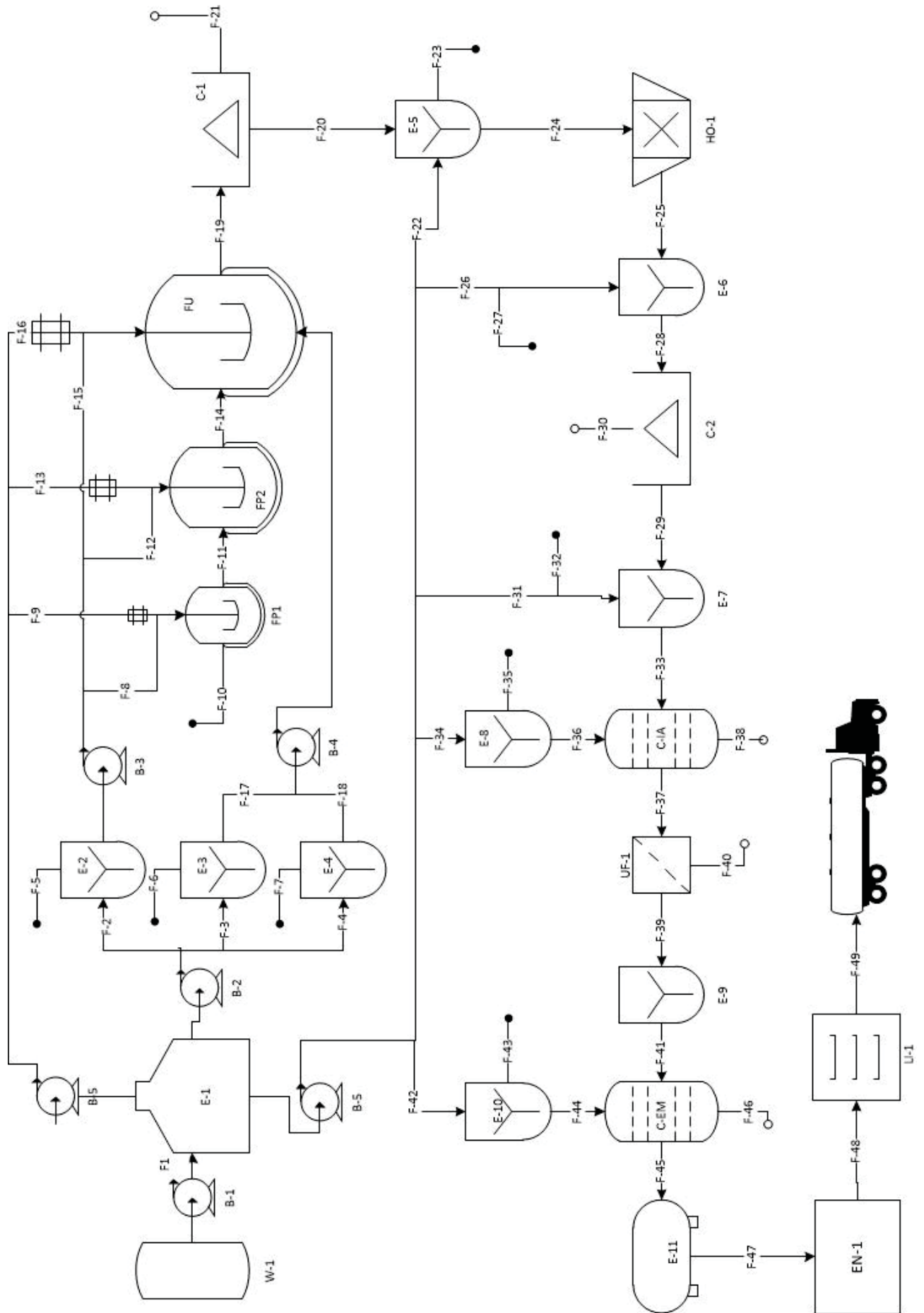
## 4.2 BALANCE DE MATERIA Y ENERGÍA EN PROCESO DE PRODUCCIÓN CON *E. coli*

Con la finalidad de establecer un panorama comparativo entre ambos procesos de producción, la cantidad de la proteína rBoIFN- $\alpha$  a producir a través de la fermentación de *Escherichia coli*, es la misma cantidad a producir por fermentación de *Pichia pastoris*. Para lograr abarcar la producción estimada en el capítulo 2, se deberán producir 25 [kg] de rBoIFN- $\alpha$  al año, lo que significa producir 490 [g] de la proteína a la semana.

En la Figura 4.18 se presenta el diagrama de flujos del proceso de *E. coli*.

### Nomenclatura para Figura 4.18

Pretratamiento		Producción		Recuperación		Purificación		Formulación y envasado	
Nomenclatura	Equipo	Nomenclatura	Equipo	Nomenclatura	Equipo	Nomenclatura	Equipo	Nomenclatura	Equipo
W-1	Purificador de Agua	FP1	Fermentador propagación 1	C-1	Centrifuga 1	E-7	Estanque buffer	EN-1	Envasadora
E-1	Estanque agua purificada	FP2	Fermentador propagación 2	E-5	Estanque buffer	E-8	Estanque buffer	LI-1	Liofilizador
E-2	Estanque medio cultivo	FU	Fermentador producción	HO-1	Homogenizador	C-1A	Crom. Int. Iónico		
E-3	Estanque glicerol			E-6	Estanque buffer	UF-1	Ultrafiltro		
E-4	Estanque lactosa			C-2	Centrifuga 2	E-9	Estanque buffer		
						E-10	Estanque buffer		
						C-EM	Crom. Exc. Molecular		
						E-11	Estanque retención		

Figura 4.18: Diagrama de flujos del proceso de *E. coli*.

#### 4.2.1 Medio de cultivo

En esta sección se describen la composición que debe llevar el medio de cultivo de modo que pueda alcanzarse la concentración de biomasa deseada en cada bioreactor.

##### a) Composición del medio de cultivo

El inóculo del fermentador de producción será la totalidad del medio de cultivo proveniente de la fermentación de propagación previa, que será igual al 10% del volumen de trabajo del fermentador de producción. Además, para comenzar la etapa de inducción en la fermentación de producción, que corresponde al término del cultivo por lote, se debe tener una concentración de biomasa de 20 [g/L] (Gombert & Kilikian, 1997). El volumen de cada etapa de fermentación, y las concentraciones de biomasa se detallan en la Tabla 4.37. En la sección 4.2.2 se encuentra el procedimiento para calcular el volumen del fermentador de producción.

Tabla 4.37: Volumen y concentración de biomasa en las etapas de fermentación en *E. coli*.

	<b>Matraz</b>	<b>FP1</b>	<b>FP2</b>	<b>FU<sub>lote</sub></b>	<b>FU<sub>cla</sub></b>
Volumen [L]	0,56	1,4	14	139	200
X <sub>r</sub> [g/L]	2	8	8	20	30

La biomasa que se requiere alcanzar está estrechamente ligada a la concentración que hay de cada nutriente en el medio, por lo que una estimación precisa de la composición del medio de cultivo es fundamental. Esta estimación se hace según la Ecuación 4.3.

Se mostrará el cálculo para determinar la concentración inicial de glucosa, el procedimiento para los demás nutrientes es el mismo. Se debe mencionar que para los nutrientes que no son la fuente de carbono se consideró un porcentaje de exceso equivalente al 30%, esto implica multiplicar el término que resulte del cálculo de S<sub>0</sub> por un factor de 1,3.

$$S_0 = \frac{0 \left[ \frac{g}{L} \right] + (20 - 0,8) \left[ \frac{g}{L} \right]}{0,41}$$

$$S_0 = 46,83 \left[ \frac{g}{L} \right]$$

En la Tabla 4.38 se detalla la composición del medio de cultivo para *E. coli*. También se encuentran los rendimientos  $Y_{X/S}$  para cada nutriente.

Tabla 4.38: Composición del medio de cultivo de *E. coli*.

Elemento	Compuesto	Concentración [g/L]				$Y_{X/S}$ [g/g]	Fuente
		Matraz	FP1	FP2	FU		
C	Glucosa	4,39	17,56	17,56	46,83	0,41	
N	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,09	6,16	6,16	24,97	1,52	
P	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,47	1,23	1,23	5,00	7,59	
K	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,77	0,21	0,21	0,85	44,89	
Mg	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	2,02	0,29	0,29	1,16	32,70	
Fe	FeCl <sub>3</sub> *H <sub>2</sub> O	9,55	0,06	0,06	0,24	155,00	(Albistur, 2005)
Zn	ZnCl <sub>2</sub>	0,59	0,98	0,98	3,96	9,59	
Co	CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,31	1,89	1,89	7,66	4,96	
Cu	CuCl <sub>2</sub>	0,15	3,96	3,96	16,08	2,36	
Mn	MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0,20	2,88	2,88	11,68	3,25	
Mo	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,49	1,18	1,18	4,79	7,93	
	Ext. Levadura	0,44	1,76	1,76	4,68		

Ahora, al multiplicar las concentraciones de cada compuesto (Tabla 4.38) por el volumen del reactor (Tabla 4.37) se obtiene la masa total de cada compuesto en cada fermentación. En la Tabla 4.39 se detalla la cantidad, en gramos, de cada compuesto para cada etapa de fermentación.

Tabla 4.39: Masa de nutrientes por etapa de fermentación en *E. coli*.

Compuesto	Matraz	FP1	FP2	FU	Total [g]
Glucosa	2,46	24,59	245,85	6509,27	6782,17
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,05	8,62	86,21	4.994,74	5.089,62
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,26	1,73	17,26	1.000,26	1.019,52
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,55	0,29	2,92	169,12	173,89
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,13	0,40	4,01	232,17	237,71
FeCl <sub>3</sub> *H <sub>2</sub> O	5,35	0,08	0,85	48,98	55,26
ZnCl <sub>2</sub>	0,33	1,37	13,67	791,74	807,10
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,17	2,64	26,44	1.531,88	1.561,14
CuCl <sub>2</sub>	0,08	5,55	55,50	3.215,59	3.276,72
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0,11	4,03	40,32	2.336,00	2.380,46
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,27	1,65	16,53	957,50	975,95
Ext. Levadura	0,25	2,46	24,59	936,59	963,88

**b) Preparación del Medio de Cultivo, Medio de Alimentación, Medio de lactosa.**

Para la preparación del medio de cultivo, primero se necesita saber en cuánto volumen de agua se va a disolver cada compuesto, según su solubilidad. Además, como la masa de nutrientes ocupa un volumen determinado, es necesario conocerlo para especificar el volumen final que debe tener el estanque en el cual se va a preparar el medio. La masa de agua necesaria para la disolución total se determina desde la Ecuación 4.4.

En la Tabla 4.40 se muestran las solubilidades de cada compuesto a 20 [°C], la cantidad de agua necesaria para disolver dicho compuesto y la densidad que se utiliza para determinar el volumen que ocupa su masa.

Tabla 4.40: Propiedades y volumen de agua utilizado para preparar el medio de *E. coli*.

Compuesto	Masa [g]	Solubilidad [g/L]	Agua [L]	Densidad [kg/L]	Volumen [L]
Glucosa	6.782,17	900	7,54	1,54	4,40
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.089,62	744	6,84	1,77	2,88
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.019,52	226	4,51	2,34	0,44
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	173,89	1.492	0,12	2,44	0,07
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	237,71	700	0,34	0,9	0,26
FeCl <sub>3</sub> *H <sub>2</sub> O	55,26	900	0,06	2,8	0,02
ZnCl <sub>2</sub>	807,10	4.320	0,19	2,91	0,28
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	1.561,14	530	2,95	1,9	0,82
CuCl <sub>2</sub>	3.276,72	760	4,31	3,39	0,97
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	2.380,46	520	4,58	2,95	0,81
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	975,95	840	1,16	0,73	1,34
Ext. Levadura	963,88	410	2,35	0,5	1,93
<b>Total [L]</b>			<b>34,94</b>		<b>14,21</b>

El volumen necesario para disolver el medio de cultivo sería de 34,94 [L], mientras que el volumen que ocupa la masa de nutrientes es de 14,21 [L]. Si bien los volúmenes no pueden considerarse aditivos, se asumirá posible, con el fin de poder determinar el volumen del estanque que se requiere para la preparación del medio de cultivo, en este caso sería 50 [L], aproximadamente.

### Preparación del medio de cultivo

El balance de masa de las corrientes de entrada y salida del estanque (E-2) de mezclado se muestran en la Figura 4.19 y en la Tabla 4.41.

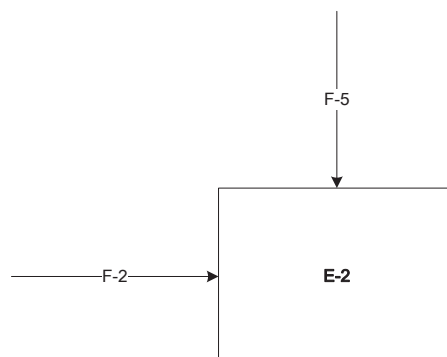


Figura 4.19: Corrientes involucradas en estanque de medio de cultivo (E-2) en *E. coli*.

El balance de masa para el estanque de medio de cultivo E-2, queda determinado por la Ecuación 4.46. El término  $M_{E-2}$  representa la masa de medio de cultivo en el estanque.

$$F_{F-2} + F_{F-5} = M_{E-2}$$

Ecuación 4.46

Tabla 4.41: Balance de masa al estanque de medio de cultivo (E-2) *E. coli*.

Corriente	Compuesto	Masa [kg]	Volumen [L]
F-2	Agua	34,94	34,94
F-5	Medio en polvo	23,32	14,21
$M_{E-2}$	Medio concentrado	58,26	49,15

### Preparación de medio de alimentación, Glicerol

El caso del glicerol es distinto debido a que ya se encuentra líquido. En este caso, sólo se asume que la masa de glicerol puro ha de diluirse hasta alcanzar los 150 [g/L] que es la concentración necesaria que debe llevar el medio de alimentación de CLA. Se debe preparar una solución de alimentación de 61 [L] para alimentar al fermentador, pero por seguridad se prepararán 65 [L]. Las propiedades del glicerol, y los volúmenes resultantes de su preparación, se detallan en la Tabla 4.42.

Tabla 4.42: Volumen de agua para diluir el medio de alimentación al CLA en *E. coli*.

Compuesto	Masa [g]	Densidad [kg/L]	Volumen glicerol[L]	Agua [L]	Concentración [g/L]
Glicerol	9.750	1,26	7,74	65	150

El volumen utilizado por glicerol disuelto será de 72,5 [L]. El balance de masa del estanque (E-3) de mezclado se muestra en la Figura 4.20 y en la Tabla 4.43.

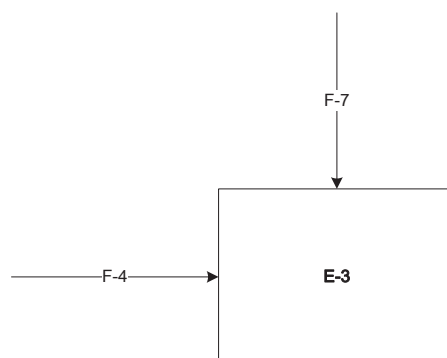


Figura 4.20: Corrientes involucradas en estanque de medio de alimentación (E-3) en *E.coli*.

El balance de masa para el estanque de glicerol E-3, queda determinado por la Ecuación 4.47.

$$F_{F-3} + F_{F-6} = M_{E-3}$$

Ecuación 4.47

Tabla 4.43: Balance de masa estanque de medio de alimentación (E-3) en *E. coli*.

Corriente	Compuesto	Masa [kg]	Volumen [L]
F-3	Agua	65	65
F-6	Glicerol	9,75	7,74
M <sub>E-3</sub>	Medio Glicerol	74,75	72,7

### Preparación de la solución inductora, Lactosa

En el caso de la lactosa, se preparará una solución concentrada de 370 [g/L] (Gombert & Kilikian, 1998) para que sea capaz de inducir en un solo pulso. La concentración de lactosa en el reactor debe ser de 20 [g/L] al momento de la inducción. Por lo que el volumen necesario de la solución a preparar se despeja de la Ecuación 4.48.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Ecuación 4.48

Dónde,

C<sub>1</sub>: Concentración de lactosa en la solución, [g/L].

V<sub>1</sub>: Volumen de solución de lactosa a preparar, [L].

C<sub>2</sub>: Concentración de lactosa en el biorreactor, [g/L].

V<sub>2</sub>: Volumen de medio en el biorreactor, [g/L].

Despejando, se tiene:

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{20 \left[ \frac{g}{L} \right] \cdot 140 [L]}{370 \left[ \frac{g}{L} \right]} = 7,6 [L]$$

La cantidad de lactosa queda determinada al multiplicar V<sub>1</sub> por C<sub>1</sub> lo que resulta en una masa de 2.812 [g]. El diagrama con las corrientes se muestra en la Figura 4.21.



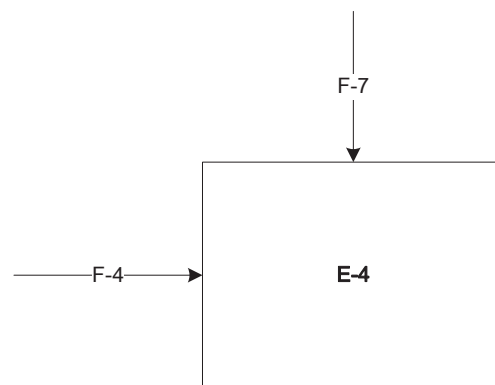


Figura 4.21: Corrientes involucradas en estanque de lactosa (E-4) en *E. coli*.

El balance de masa al estanque de lactosa E-4 queda determinado por la Ecuación 4.49. y el resultado del balance de masa se resume en la Tabla 4.44.

$$F_{F-4} + F_{F-7} = M_{E-4}$$

Ecuación 4.49

Tabla 4.44: Balance de masa al estanque de lactosa (E-4) de *E. coli*.

Corriente	Compuesto	Masa [kg]	Volumen [L]
F-4	Agua	7,6	7,6
F-7	Lactosa	2,8	1,85
M <sub>E-4</sub>	Solución Lactosa	10,4	9,45

### c) Esterilización del Medio de Cultivo y Balance de Energía

En esta sección se muestran los resultados para la esterilización de medio de cultivo, solución de glicerol, y fermentadores. La lactosa será esterilizada en autoclave debido al reducido tamaño.

El cálculo de los requerimientos de esterilización se hace de manera equivalente al proceso de *Pichia* (ver sección 4.1.4). Los resultados se muestran en las Tabla 4.45 y 4.46.

Tabla 4.45: Tiempos de esterilización de cada fermentador y estanque para *E. coli*.

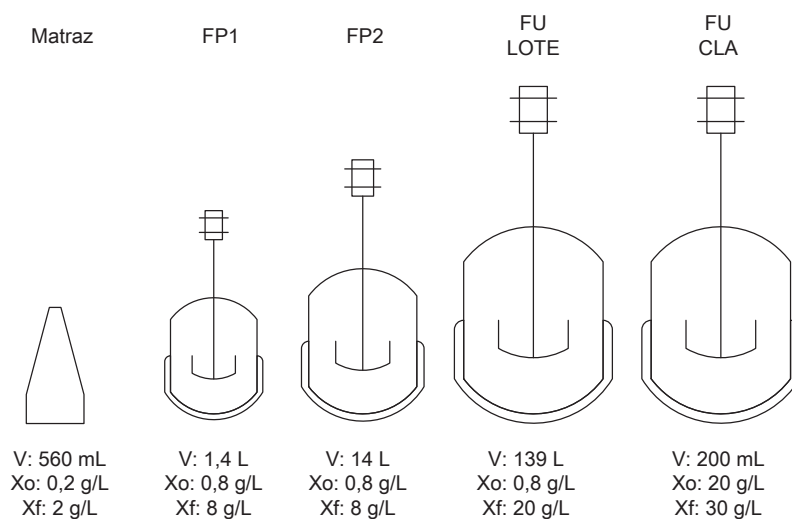
Parámetro	Fermentador			Glicerol
	FP1	FP2	FU	
Volumen [L]	0,84	12,6	125	65
N/No	$1.42 \cdot 10^{-12}$	$6.30 \cdot 10^{-15}$	$6.40 \cdot 10^{-17}$	$2.37 \cdot 10^{-16}$
t est [min]	35	42	48	47

Tabla 4.46: Requerimientos de vapor para esterilización de reactores y medios en *E. coli*.

Parámetro	FP1	FP2	FU	Glicerol
M vapor pared [kg]	0,29	2,96	26,88	14,68
Qp[J/h]	482.069	2.237.564	13.173.772	9.684.259
Fv [kg/h]	0,22	1,02	5,99	4,40
M vapor total [kg]	0,42	3,68	31,71	18,11
V co [L]	0,45	3,90	33,63	19,20

#### 4.2.2 Etapas de fermentaciones en *E. coli*

Con el objetivo de alcanzar la biomasa necesaria para poder inducir la producción de la proteína de interés, se requiere de fermentaciones previas a la fermentación de producción. El esquema del proceso de propagación y producción se muestra en la Figura 4.22.

Figura 4.22: Diagrama de etapas de fermentación en *E. coli*.

Las fermentaciones que consideran el uso de un biorreactor con agitación están bajo la nomenclatura de FP1, FP2, y FU. Durante esta sección se hablará principalmente de FP1, FP2, y FU, dado que los balances de materia ayudarán a dimensionar los requerimientos de los fermentadores, que son los equipos relevantes en esta etapa del proceso productivo.

#### a) Fermentaciones de propagación

Comprende etapas de fermentación en modalidad de cultivo por lote FP1 Y FP2, donde el volumen útil de la última etapa corresponde al 10% de la siguiente. Además en todas las etapas propagación se utiliza el mismo medio de cultivo que en la fermentación principal, descrito en la Tabla 4.38, y las mismas condiciones de crecimiento (ver Tabla 4.47).

Tabla 4.47: Parámetros cinéticos de las etapas de propagación en *E. coli*.

Parámetros	FP1	FP2
$\mu_{\max}$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	0,46	0,46
T [ $^{\circ}\text{C}$ ]	37	37
$X_0$ [g/L]	0,8	0,8
t [h]	5	5
$X_f$ [g/L]	8	8
V [L]	1,4	14

La cinética de las fermentaciones de propagación es similar en todas y se muestra en la Figura 4.23.

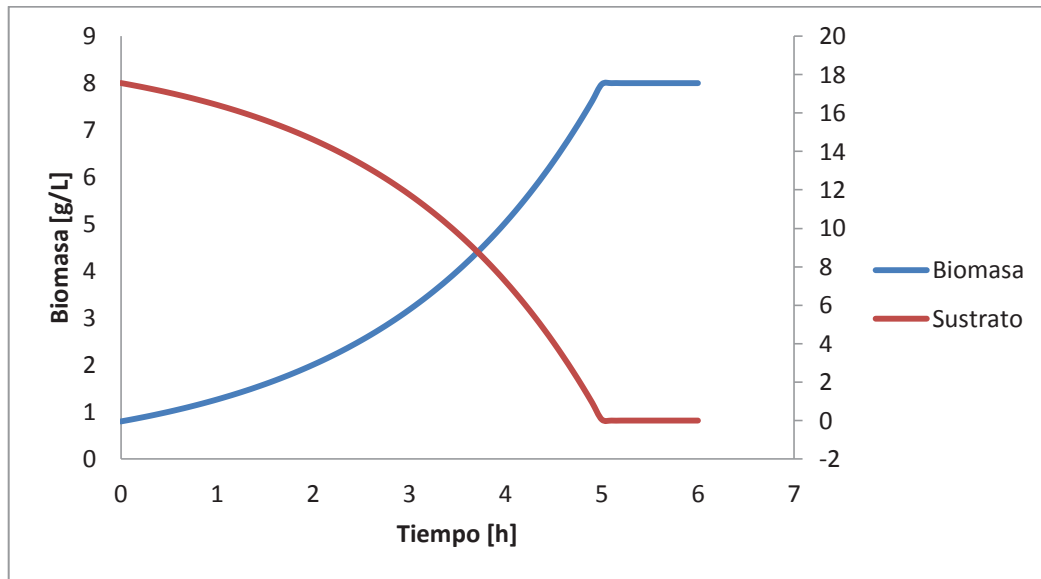


Figura 4.23: Cinética de fermentación en cultivos por lote (propagación) de *E. coli*.

En la Figura 4.24 se muestra el diagrama de las corrientes involucradas en la fermentación de propagación FP1.

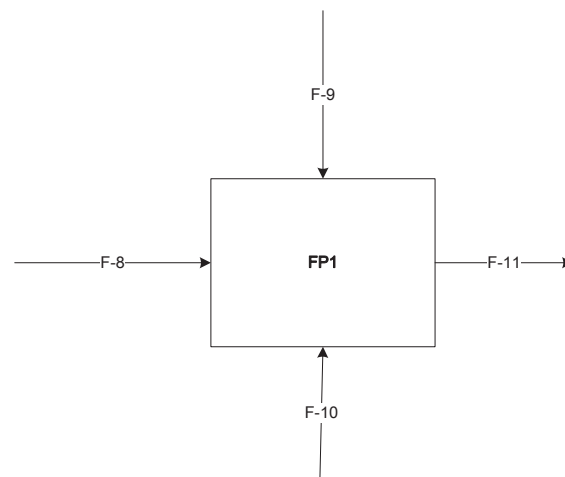


Figura 4.24: Corrientes asociadas a la fermentación de propagación (FP1) en *E. coli*.

El medio de cultivo concentrado proveniente del estanque de almacenamiento E-2 se debe diluir en una cantidad determinada de agua más el volumen de inóculo proveniente de la fermentación de propagación previa. El volumen de inóculo para FP1 será de 0,56 [L] provenientes de un matraz Erlenmeyer, por lo tanto, la masa de agua

y medio de cultivo quedan determinadas mediante un balance de masa a cualquier compuesto disuelto en el medio de cultivo concentrado. Tomaremos como referencia la masa de la fuente de carbono (glucosa).

De la Ecuación 4.50 podemos determinar el volumen de medio de cultivo necesario, en base a la concentración que debe haber de glucosa en el fermentador.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Ecuación 4.50

Siendo  $C_1$  la concentración de glucosa en el medio de cultivo concentrado (194,11 [g/L]),  $V_1$  el volumen de medio a añadir,  $C_2$  la concentración de glucosa que debe haber en el fermentador (17,56 [g/L]), y  $V_2$  el volumen útil del fermentador (1,4 [L]).

$$194,11 \left[ \frac{g}{L} \right] \cdot V_1 = 17,56 \left[ \frac{g}{L} \right] \cdot 1,4 [L]$$

$$V_1 = \frac{17,56 \cdot 1,4}{194,11} = 0,13 [L]$$

Por lo tanto, se requieren 0,18 [L] de medio de cultivo concentrado.

El balance de masa al fermentador FP1 queda entonces determinado por la Ecuación 4.51.

$$F_{F-9} + F_{F-10} + F_{F-11} = F_{F-12}$$

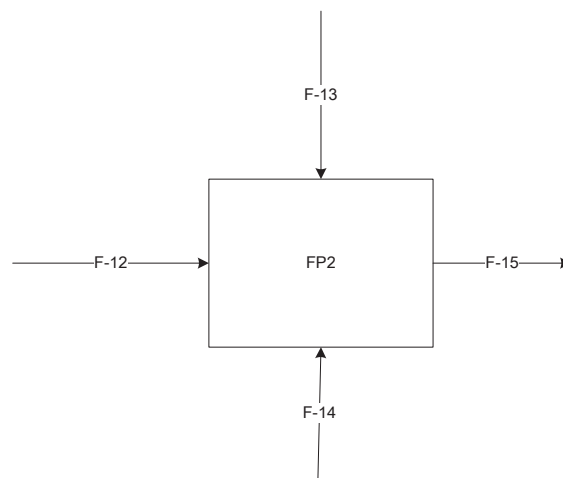
Ecuación 4.51

Los valores resultantes del balance de masa al fermentador FP1 se encuentran especificados en la Tabla 4.48.

Tabla 4.48: Balance de masa asociado a FP1 en *E. coli*.

Corriente	Compuesto	Masa [kg]	Volumen [L]
F-8	Medio de cultivo	0,053	0,13
F-9	Agua	0,71	0,71
F-10	Inóculo	0,56	0,56
F-11	Inóculo para FP2	1,32	1,4

En la Figura 4.25 se muestra el diagrama de las corrientes involucradas en la fermentación de propagación FP2.

Figura 4.25: Corrientes asociadas a la fermentación de propagación (FP2) en *E. coli*.

La Ecuación 4.52 determina el balance de masa al fermentador.

$$F_{F-12} + F_{F-13} + F_{F-14} = F_{F-15}$$

Ecuación 4.52

Luego, el resumen del balance de masa al fermentador FP2 se detalla en la Tabla 4.49.

Tabla 4.49: Balance de masa asociado a FP2 en *E. coli*.

Corriente	Compuesto	Masa [kg]	Volumen [L]
F-11	Inóculo	1,32	1,4
F-12	Medio de cultivo	0,53	1,27
F-13	Agua	11,33	11,33
F-14	Inóculo para FU	13,19	14

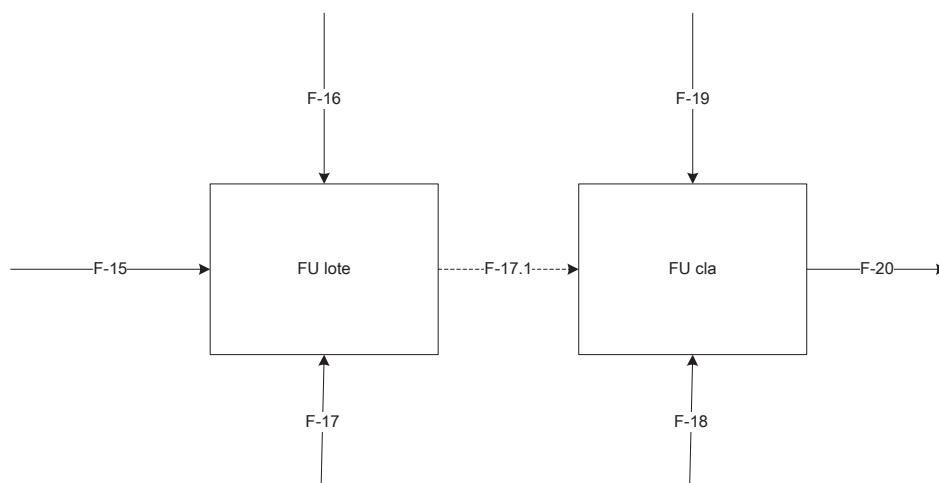
### b) Fermentación de producción FU

En general, el proceso de producción consiste en dos fases: 1) cultivo por lote ( $FU_{\text{lote}}$ ) hasta agotar la fuente de carbono (glucosa) que tiene por objetivo generar una cantidad determinada de biomasa, y 2) cultivo por lote alimentado ( $FU_{\text{cla}}$ ) con alimentación exponencial utilizando glicerol como fuente de carbono e induciendo la síntesis de interferón por medio de un pulso con lactosa.

La planta industrial se mantiene en operación durante 51 semanas al año y se realizarán dos fermentaciones productivas por semana, por lo que para cumplir con la producción anual se deben producir unos 496 gramos por semana.

#### Modalidad Cultivo por Lote $FU_{\text{lote}}$

El balance de masa se realiza de manera equivalente a los otros cultivos por lote. Sin embargo, la Figura 4.26 representa el proceso de producción completo, el cual se realiza en el mismo equipo (FU), pero se visualizan las etapas por separado.

Figura 4.26: Corrientes de la fermentación de producción ( $FU_{\text{lote}}$  y  $FU_{\text{CLA}}$ ) en *E. coli*.

La corriente F-17.1 no existe como tal, sólo se muestra para ejemplificar aquellos compuestos que siguen hacia la etapa de CLA. El balance de masa de la etapa por lotes queda descrito por la Ecuación 4.53, mientras que el resumen del balance de masa para  $FU_{LOTE}$  se muestra en la Tabla 4.50.

$$F_{F-15} + F_{F-16} + F_{F-17} = F_{F-17.1}$$

Ecuación 4.53

Tabla 4.50: Balance de masa para la etapa  $FU_{LOTE}$  en *E. coli*.

Corriente	Compuesto	Masa [kg]	Volumen [L]
F-14	Inóculo	13,19	14
F-15	Medio de cultivo	22,72	33,53
F-16	Agua	91,47	91,47
F-16.1	Caldo para $FU_{CLA}$	127,38	139

En la Tabla 4.51 se presentan los parámetros y condiciones iniciales y finales del cultivo por lote realizado en el fermentador principal ( $FU_{LOTE}$ ).

Tabla 4.51: Parámetros cinéticos de la fermentación de producción etapa por lote ( $FU_{LOTE}$ ) en *E. coli*.

Parámetros	Valor	Referencia
$\mu_{max}$ [ $h^{-1}$ ]	0,46	(Gombert & Kilikian, 1998)
T [ $^{\circ}C$ ]	37	
$X_0$ [g/L]	0,8	
t [h]	7	
$X_f$ [g/L]	20	
V [L]	139	

### Modalidad Cultivo por Lote Alimentado Exponencialmente con glicerol ( $FU_{cla}$ )

Siguiendo el protocolo de producción, se realizará el CLA con alimentación exponencial de glicerol. El objetivo de esta etapa es provocar la síntesis de interferón, y evitar el sobreflujo metabólico, que pudiera derivar en la formación de cuerpos de inclusión. Para inducir la síntesis se dispone de una solución de lactosa, la cual será



alimentada en un solo pulso. Para evitar la formación de cuerpos de inclusión a causa del sobreflujo metabólico se mantendrá la velocidad de crecimiento específico en un valor bajo y constante;  $\mu = 0,15 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ . Al fijar una velocidad de crecimiento específico se determina entonces la respuesta del cultivo, y por ende, se obtiene como resultado el flujo de alimentación que es capaz de mantener dicha respuesta.

Las ecuaciones de diseño y el procedimiento de solución al sistema planteado, son equivalentes a la etapa de CLA en *Pichia pastoris* (Ecuación 4.20; 4.21; 4.22). Con ello, los parámetros de diseño se muestran en la Tabla 4.52.

Tabla 4.52: Parámetros de diseño del CLA en *E. coli*.

Condiciones	Valor	Referencia
$\mu_{\text{set}} \text{ [h}^{-1}\text{]}$	0,15	
$X_0 \text{ [g/L]}$	20	
$V_0 \text{ [L]}$	139	
$Y_{x/\text{glicerol}} \text{ [g/g]}$	0,47	
$S_R \text{ [g/L]}$	0,032	
$S_{\text{feed}} \text{ [g/L]}$	150	
$q_D \text{ [g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\text{]}$	0,024	(EL-Baky et al. 2015)
$t \text{ [h]}$	8	(Gombert & Kilikian, 1998)
$K_S$	0,6	(Albistur, 2015)

$S_R$  se refiere al sustrato residual que se mantiene en el reactor durante todo el cultivo, y cuyo valor es clave en el desarrollo del proceso. Este parámetro resulta al despejar la Ecuación 4.54, considerando que se quiere mantener una velocidad específica de crecimiento baja y constante, para evitar el sobreflujo metabólico.

$$\mu = \frac{S_R}{K_S + S_R}$$

Ecuación 4.54

Reemplazando los valores de  $\mu$  y  $K_S$  que están en la Tabla 4.52, y despejando, se obtiene el valor de  $S_R$ .

Los resultados obtenidos al despejar el sistema de ecuaciones del CLA por Runge–Kutta de 4<sup>to</sup> orden, se muestran en la Tabla 4.53.

Tabla 4.53: Condiciones finales del CLA en *E. coli*.

Condiciones	Valor
V <sub>f</sub> [L]	200
X <sub>f</sub> [g/L]	30
rBoIFN-α [g/L]	3,81

El gráfico de variación del flujo en el tiempo se muestra en la Figura 4.27.

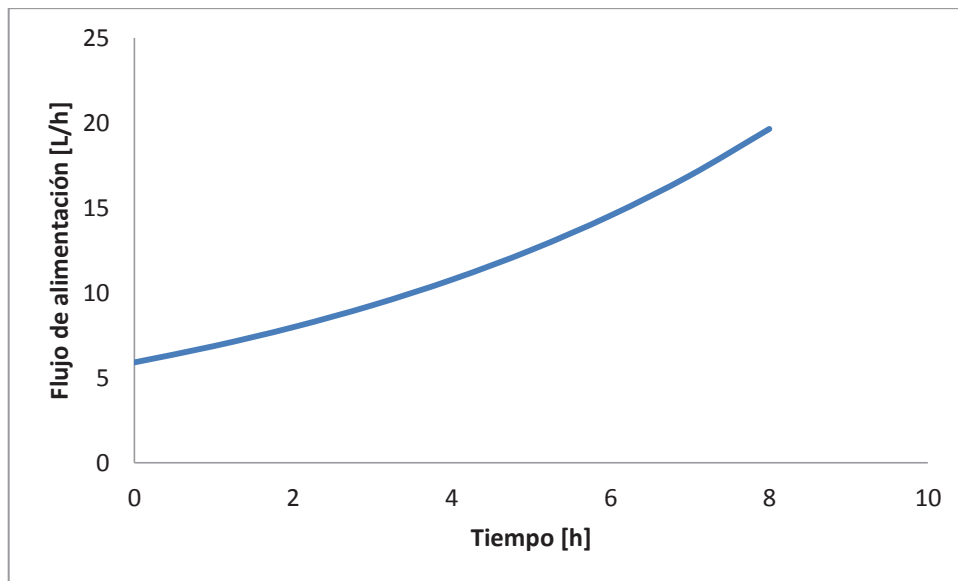


Figura 4.27: Variación del flujo de alimentación en el tiempo en FU<sub>cla</sub> en *E. coli*.

Esta gráfica representa el medio de alimentación con glicerol, en una concentración de 150 [g/L], el cual comenzará a añadirse una vez agotada la glucosa del lote previo a la inducción.

Esta etapa sólo cuenta con una corriente de alimentación F-18, y una corriente inductora F-19. Esto implica que no se debe agregar agua, ni medio de cultivo en esta etapa. Sólo debe agregarse la solución de alimentación de acuerdo al flujo que se muestra en la Figura 4.27, y un pulso de inducción con la solución concentrada de lactosa de 370 [g/L]. Los volúmenes añadidos de medio de alimentación y solución inductora se muestran en la Tabla 4.54, junto con el balance de masa de esta etapa, descrito por la Ecuación 4.55.

$$F_{F-18} + F_{F-19} = F_{F-20}$$

Tabla 4.54: Balance de masa de soluciones añadidas al CLA en *E. coli*.

Corriente	Compuesto	Masa [kg]	Volumen [L]
F-17	Glicerol	69,87	61
F-18	Lactosa	10,41	7,4
F-19	Caldo agotado	207,66	200

#### 4.2.3 Demanda y transferencia de oxígeno (aireación)

Para determinar la demanda y transferencia de oxígeno en el proceso, se realizará de manera equivalente al proceso con *P. pastoris* (ver sección 4.1.4 letra c). Considerando igualmente que, para que el proceso no sea limitado por oxígeno, la velocidad de consumo de oxígeno y la velocidad de transferencia de oxígeno deben ser iguales. Además, la cantidad de biomasa a la cual se determinará  $q_{O_2}$  en FP3 y FU, es la máxima concentración alcanzada en los biorreactores al final del lote y del posterior cultivo por lote alimentado (CLA).

A continuación, a modo de resumen, en la Tabla 4.55 se presenta un cuadro de los valores utilizados y los resultados de la demanda y transferencia de oxígeno.

Tabla 4.55: Resultados de transferencia de oxígeno para *E. coli*.

Parámetro	FP1	FP2	FU <sub>lote</sub>	FU <sub>cla</sub>	Referencia
V [L]	1,4	14	139	200	
$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	0,46	0,46	0,46	0,15	(Albistur, 2005)
T [K]	310	310,00	310,00	310,00	
Y <sub>O<sub>2</sub></sub> [g/g]	1,6	1,60	1,60	1,60	(Albistur, 2005)
X [g/L]	8	8	20,00	30,00	
V [L]	1,4	14,00	139,00	200,00	
VCO [mmol/h*L]	71,88	71.88	179,69	87,89	
C* [mmolO <sub>2</sub> /L]	0,93	0,93	0,93	0,93	
Cl [mmolO <sub>2</sub> /L]	0,31	0,31	0,31	0,31	
K <sub>La</sub> [h <sup>-1</sup> ]	117,73	117.73	294,33	143,96	
F/V [VVM]	0,06	0.48	1,21	0,59	
F [m <sup>3</sup> /h]	0,005	0.41	10,08	7,10	

#### 4.2.4 Balance de energía y potencia para el proceso de producción con *E. coli*

Para mantener la temperatura seleccionada para este proceso de fermentación, es necesario realizar un control continuo de temperatura, por lo general el fermentador contiene algún sistema de serpentín o chaqueta.

##### Energía asociada a la transmisión de calor

Habiendo ya determinado en el proceso de *Pichia pastoris* (ver sección 4.1.4 letra c) las ecuaciones para definir los requerimientos de enfriamiento o calentamiento en el proceso de fermentación, para el caso del proceso de producción en *E. coli*, se trabajará a la temperatura de 37 [°C] durante todo el proceso.

La Tabla 4.56 muestra el resumen del balance de energía para el fermentador de propagación y el fermentador principal.

Tabla 4.56: Resultados balance de energía fermentadores *E. coli*.

Parámetro	FP1	FP2	FU <sub>LOTE</sub>	FU <sub>CLA</sub>
T [°C]	37	37	37	37
H <sub>L</sub> [m]	0,19	0,41	1,01	1,01
T [m]	0,1	0,21	0,50	0,50
h [kcal/h*m*°C]	20	20	20	20
Tamb [°C]	20	20	20	20
T agua entr [°C]	10	10	10	10
U [kcal/h*m <sup>2</sup> *°C]	600	600	600	600
Qf [kcal/h]	12,075	120,75	2997,19	2.109,38
Qa [kcal/h]	1,2075	12,08	299,72	210,94
Qp [kcal/h]	6,46	29,27	171,70	171,70
Q <sub>R</sub> [kcal/h]	6,8225	103,55	3.125,21	2.148,61
Q <sub>i</sub> [kcal/h]	6,8225	103,55	3.125,21	2.148,61
Magua [m <sup>3</sup> /h]	0,0003	0,004	0,12	0,08

#### 4.2.5 Centrifugación (C-1)

Posterior a la fermentación es necesario separar la biomasa del caldo de cultivo. Las condiciones iniciales de la centrifugación serán las finales provenientes de la fermentación por cultivo por lote alimentado. En esta etapa se asume que la centrífuga tiene un porcentaje de recuperación del 99.5% (Araya & Fardella, 2015). Además, se optó por reducir el volumen proveniente de la fermentación 10 veces, esto porque se ha estudiado que una concentración de hasta 150 [g/L] en la corriente de alimentación

al homogenizador, no altera el porcentaje de ruptura en células de *E. coli* (Middelberg, 2000).

#### a) Balance de masa centrifugación

En la Figura 4.28 se pueden apreciar las corrientes involucradas en la centrifuga (C-1).

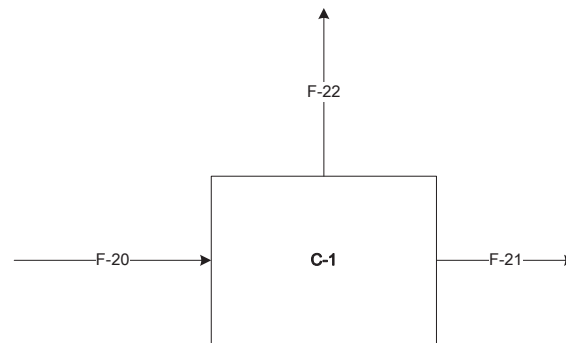


Figura 4.28: Corrientes involucradas en la primera centrifuga C-1 en *E. coli*.

La Ecuación 4.56 muestra el balance de masa a la centrifuga C-1.

$$F_{F-20} = F_{F-21} + F_{F-22}$$

Ecuación 4.56

El balance de masa para la biomasa, que involucra el porcentaje de recuperación de la centrifuga, queda determinado por la Ecuación 4.57 y es importante determinar porque aquí va contenido el interferón.

$$C_{F-21} \cdot V_{F-21} = 0,995 \cdot C_{F-20} \cdot V_{F-20}$$

Ecuación 4.57

Donde el término C representa la concentración de biomasa, el subíndice se refiere a la corriente en particular, y el término V representa el volumen de dicha corriente.

La Tabla 4.57 muestra el resumen del balance de masa a las corrientes involucradas en C-1.

Tabla 4.57: Balance de masa a la centrifuga C-1 en *E. coli*.

<b>Compuesto</b>	<b>F-19</b>	<b>F-20</b>	<b>F-21</b>
Agua [kg]	0.2	0.02	0.18
Biomasa [kg]	6	5.97	0.03
Medio cultivo [kg]	4.86	0.02	4.84
rBoIFN- $\alpha$ [g]	0	759,38	3,82

#### **b) Balance de energía centrifugación**

La centrifuga seleccionada en el capítulo 5 tiene un consumo de 3.7 kW. Con su capacidad hidráulica es posible procesar el flujo de 200 litros en una hora. La etapa de centrifugación tiene asociado un tiempo total de 1 hora, lo que se traduciría en un consumo de energía de 3.7 kWh. Son dos procesos a la semana por lo que al año el consumo de energía es de 377,4 kWh/año.

#### **4.2.6 Homogenización (HO-1)**

La etapa de homogenización se produce a altas presiones y de manera discontinua. La finalidad de esta etapa es la disrupción de las células, liberando así el interferón al medio. Se requieren 4 pasos a través del homogenizador para liberar >99% de la proteína, no obstante, el homogenizador tiene un rendimiento de un 74% (Datar & Rosén, 1987). Además, el interferón que se recuperará es el que se encuentra en su forma soluble, que corresponde al 70% del interferón total (EL-Baky, 2015).

#### **a) Balance de masa**

Previo al proceso de homogenización, el concentrado proveniente de la centrifuga C-1 debe ser mezclado con buffer 20 mM de Tris HCl de pH 7,5, en un estanque de mezclado E-8, con el objetivo de que la corriente de alimentación al homogenizador tenga una concentración de células de 150 [g/L]. El diagrama con las corrientes involucradas en el estanque E-8 se muestra en la Figura 4.29.

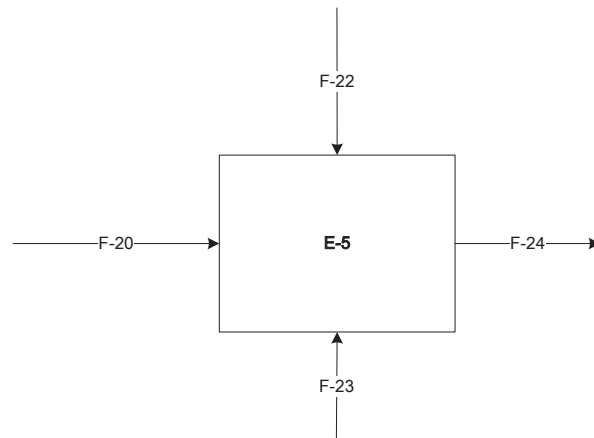


Figura 4.29: Corrientes involucradas en el estanque E-5 para *E. coli*.

El buffer debe agregarse previo al proceso de homogenización, de modo que la concentración a la entrada del equipo HO-1 sea de 150 [g/L]. Por ello, el volumen de buffer a agregar queda despejado de la Ecuación 4.58.

$$\frac{C_{F-20} \cdot V_{F-20}}{C_{F-24}} = V_{F-24}$$

Ecuación 4.58

Donde  $C_{F-20}$  es la concentración de biomasa en la corriente F-20,  $V_{F-20}$  es el volumen de dicha corriente,  $C_{F-24}$  es la concentración de biomasa en la corriente F-24, y  $V_{F-24}$  el volumen de la corriente F-24. Despejando la expresión se tiene:

$$\frac{298,5 \left[ \frac{g}{L} \right] \cdot 20[L]}{150 \left[ \frac{g}{L} \right]} = V_2 = 40[L]$$

Luego, la cantidad de buffer a agregar a la corriente F-20 que transporta agua son 20 [L], por lo que el volumen del estanque para realizar la mezcla ha de ser de 50 litros considerando un factor de seguridad de 20%. El resumen de las corrientes queda especificado en la Tabla 4.58.

Tabla 4.58: Balance de masa al estanque de buffer E-5 en *E. coli*.

Compuesto	F-20	F-22	F-23	F-24
Agua [kg]	20	20	0	40
Biomasa [kg]	5,21	0	0	5,21
Medio cultivo [kg]	0,02	0	0	0,02
rBolFN- $\alpha$ [g]	759,38	0	0	759,38
Tris-HCl [kg]	0	0	0,05	0,05

En cuanto al homogenizador, en la Figura 4.30 se pueden apreciar las corrientes asociadas al equipo.

Figura 4.30: Corrientes asociadas al homogenizador HO-1 en *E. coli*.

Y el balance de masa para el interferón viene dado por la Ecuación 4.59.

$$C_{F-24} \cdot V_{F-24} \cdot 0,74 \cdot 0,7 = C_{F-25} \cdot V_{F-25}$$

Ecuación 4.59

Dónde,

$C_{F-24}$ : Concentración de interferón a la entrada del homogenizador, [g/L].

$V_{F-24}$ : Volumen de la corriente de entrada a HO-1, [L].

$C_{F-25}$ : Concentración de interferón a la salida de HO-1, [g/L]



$V_{F-25}$ : Volumen de la corriente de salida de HO-1, [L].

Antes de despejar la Ecuación 4.59 es necesario aclarar que  $C_{F-24}$  se puede calcular considerando la cantidad de interferón que hay por unidad de biomasa, esto es 0,1272 [ $g_{IFN}/g_{biomasa}$ ], por lo que  $C_{F-24}$  se obtiene al multiplicar 0,1272 por los 150 [g/L] de biomasa que vienen en la corriente F-24.

Despejando se tiene la concentración de interferón en la corriente de salida.

$$\frac{C_{F-24} \cdot V_{F-24}}{V_{F-25}} \cdot 0,74 \cdot 0,7 = C_{F-25} = \frac{19 \left[ \frac{g}{L} \right] \cdot 40 [L]}{40 [L]} \cdot 0,74 \cdot 0,7$$

$$C_{F-25} = 9,78 \left[ \frac{g}{L} \right]$$

En la Tabla 4.59 se muestran las composiciones de las corrientes asociadas al proceso de homogenización.

Tabla 4.59: Balance de masa para el equipo HO-1 en *E.coli*.

Parámetros	F-24	F-25
Agua [kg]	40,00	40,00
Biomasa [kg]	5,97	0
rBoIFN- $\alpha$ [g]	759,38	389,43
Restos celulares [kg]	0	5,58
Medio cutivo [kg]	0,02	0,02
Tris-HCl [kg]	0,05	0,05

En la columna “Parámetros” los restos celulares representan la cantidad de biomasa menos los gramos de interferón viable y soluble después de la disrupción.

## b) Balance de energía

El balance de energía al homogenizador está asociado a la potencia que utiliza el equipo elegido en el Capítulo 5 (ver sección 5.3). El homogenizador tiene una potencia máxima de 1,5 kW y el proceso de homogenización tiene asociado un tiempo de 1

hora, por lo que el gasto de energía es de 5.5 kWh. Como se realiza esta operación dos veces por semana, el consumo anual del homogenizador es 561 kWh/año.

#### 4.2.7 Centrifugación 2 (C-2)

Esta segunda centrifugación tiene por objetivo la concentración y eliminación de los restos celulares (lo que en inglés se conoce como *cell debris*). En esta etapa lo que importa es recuperar el clarificado de la centrífuga porque ahí se encuentra soluble el interferón. Como no se dispone de información sobre el porcentaje de proteína soluble en *E. coli*, se asumirá que el coeficiente de retención de sólidos de la centrífuga (99,5%) es aplicable sobre la totalidad de los gramos de desechos celulares, es decir, se retiene el 99,5% de los restos celulares.

El comportamiento de los restos celulares en una centrifugación varía con respecto a la separación sólido/líquido de la primera centrífuga (C-1), esto porque se ha disminuido el tamaño de las partículas a separar producto de la disrupción. De acuerdo a los principios de la centrifugación, es más difícil separar partículas de menor tamaño. Antes de centrifugar se resuspenderá la corriente proveniente del homogenizador en buffer 20mM de Tris HCl, hasta que los sólidos representen un 4% del volumen, y se asumirá que a la salida de la centrífuga, serán el 50% del volumen de la corriente de descarte (Hemfert & Kohlstette, 1998).

##### a) Balance de masa

Primero se realizará el balance de masa del estanque (E-6) asociado a la dilución de los restos celulares, antes de la centrífuga. Asumiendo una densidad de 1,03 [g<sub>debris</sub>/cm<sup>3</sup>] de los restos celular, el volumen que representan los gramos de restos celulares provenientes del homogenizador quedan determinados por la Ecuación 4.60.

$$\frac{M_{debris}}{\rho_{debris} \cdot 1000} = V_{debris}$$

Ecuación 4.60

$$\frac{5580,57 [g]}{1,03 \left[ \frac{g}{cm^3} \right] \cdot 1000 \left[ \frac{cm^3}{L} \right]} = 5,4 [L]$$

El volumen proveniente del homogenizador son 40 litros, por lo que el porcentaje en volumen de los restos celulares en dicha corriente es de 13,5%. Para que sea un 4%, el volumen debe ser de 135 litros.

En la Figura 4.31 se muestran las corrientes involucradas en el estanque de mezcla (E-9).

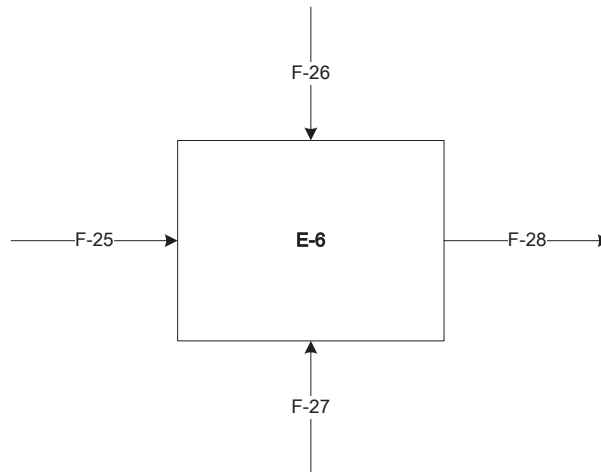


Figura 4.31: Corrientes asociadas al estanque E-6 de buffer en *E. coli*.

En la Tabla 4.60 se muestra el balance de masa al estanque de mezcla E-6.

Tabla 4.60: Balance de masa para el estanque de mezclado E-6 en *E. coli*.

Parámetros	F-25	F-26	F-27	F-28
Agua [kg]	40	95	0	135
Restos celulares [kg]	5,58	0	0	5,58
rBoIFN- $\alpha$ [g]	389,43	0	0	389,43
Tris-HCl [kg]	48,6	0	230,2	278,8
Medio cultivo [kg]	0,024	0	0	0,024

En la Figura 4.32 se aprecian las corrientes involucradas en el segundo proceso de centrifugación.

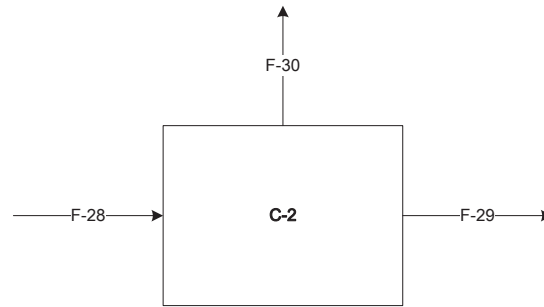


Figura 4.32: Corrientes asociadas a la segunda centrífuga C-2 en *E. coli*.

El balance de masa para la segunda centrífuga es equivalente al de la centrífuga C-1, en este caso, el balance es aplicado a los restos celulares, que quedan retenidos en un 99,5% en la centrífuga C-2.

En la Tabla 4.61 se muestra el balance de masa a C-2.

Tabla 4.61: Balance de masa para la segunda centrífuga (C-2) en *E. coli*.

Parámetros	F-28	F-29	F-30
Agua [kg]	135	124,2	10,8
Residuos celulares [kg]	5,58	0,03	5,55
rBolFN- $\alpha$ [g]	389,43	387,48	1,95
Medio cultivo [kg]	0,0243	0,0242	0,0001
Tris-HCl [kg]	0,2788	0,2774	0,0014

#### b) Balance de energía

El balance de energía para esta etapa queda determinado al igual que en la centrífuga C-1. Por lo que al año sería un total de 377,4 kWh/año.

#### 4.2.8 Cromatografía de intercambio iónico (C-IA)

##### Estanque de Mezclamiento para Dilución de Clarificado (E-7)

En la Figura 4.33 se muestran las corrientes asociadas al estanque de mezclamiento de buffer E-7, previo a la cromatografía de intercambio iónico.

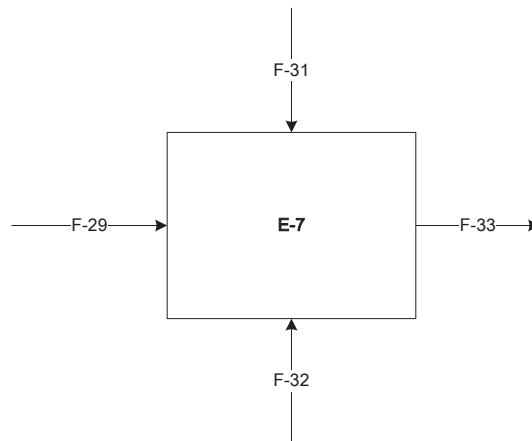


Figura 4.33: Corrientes asociadas al estanque de buffer E-7 en *E. coli*.

La corriente de de clarificado proveniente de la etapa de centrifugación (C-2) debe ser diluida con una solución de Tris-HCl al 50 [mM], para luego ser cargada a la columna cromatografica. La solución concentrada de Tris-HCl con la cual se diluye la corriente F-29 tiene un volumen igual al 2% del volumen de ésta, esto es, 2,484 litros.

Luego, utilizando la Ecuación 4.61 se obtiene la concentración del Tris-HCl con respecto a la corriente de agua en la que se va a diluir.

$$C_{F-32} \cdot V_{F-31} = C_{E-7} \cdot V_{E-7}$$

Ecuación 4.61.

Resolviendo

$$C_{F-32} \cdot 2,484 [L] = 50[mM] \cdot 126,7[L]$$

$$C_{F-32} = 2550 [mM]$$

De esta manera se obtiene que la masa de Tris-HCl en el estanque E-7 debe ser 0,998 [kg].

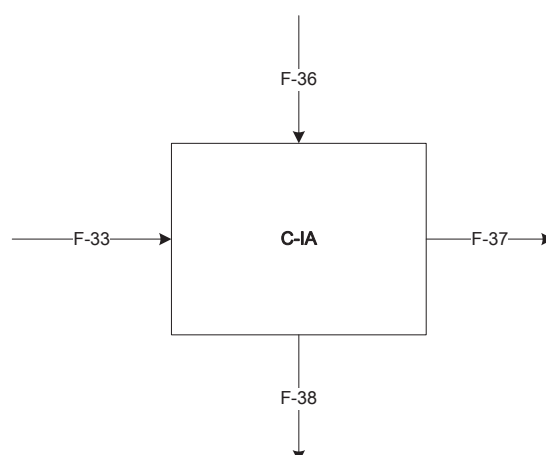
En la Tabla 4.62 se muestra el balance de masa al estanque de mezcla E-7.

Tabla 4.62: Balance de masa al estanque de mezcla E-7 en *E. coli*.

Compuesto	F-29	F-31	F-32	F-33
Agua [kg]	124,2	2,5	0	126,7
rBoIFN- $\alpha$ [g]	387,48	0	0	387,48
Restos celulares [kg]	0,03	0	0	0,03
Tris-HCl [kg]	0,28	0	1,00	1,28
Medio de cultivo [kg]	0,02	0	0	0,02

### Cromatografía de intercambio aniónico C-IA

En esta etapa se utilizan diferentes soluciones buffer para equilibrar, cargar, lavar y eluir la proteína de interés con el objetivo de aumentar su pureza. Esta etapa será analizada en esta sección según el diagrama de bloques en la Figura 4.34.

Figura 4.34: Corrientes asociadas a la unidad cromatográfica C-IA en *E. coli*.

La corriente F-33 contiene la masa de rBoIFN- $\alpha$  recuperada de la centrifugación, F-36 es la corriente que proporciona el buffer de elución, F-38 es la corriente de solución de desecho la cual lleva también un pequeño porcentaje de rBoIFN- $\alpha$  y F-37 es, finalmente, la corriente que lleva el producto hacia su formulación final.

Las cantidades y composición de los buffers a utilizar para esta etapa, se tienen estandarizadas por protocolo y se encuentran en la Tabla 4.63. Los volúmenes de buffer se expresan en CV, en función del volumen de la columna equivalente a 62,9[L].

Para el balance de la proteína de interés rBoIFN- $\alpha$  se utilizará un rendimiento equivalente a un 89%, de esta forma el balance puede ser planteado con la Ecuación 4.39, de manera análoga al proceso en *Pichia pastoris*.

Ejemplo de cálculo:

$$126,7 [L] \cdot 3,059 \left[ \frac{g}{L} \right] = 0,89 \cdot 86,7 [L] \cdot [P]_{c1}$$

$$[P]_{c1} = 3,98 \left[ \frac{g}{L} \right]$$

En la Tabla 4.63, se muestra la composición y cantidad de cada solución buffer en cada una de las etapas que se llevan a cabo (Equilibrado, lavado y elución).

Tabla 4.63: Composición y cantidad de soluciones buffer a utilizar en la cromatografía de intercambio iónico en *E. coli*.

Compuesto	Equilibrado	Eluido
Volumen[L]	326	163,00
NaCl [M]	0,15	0,15
NaPO <sub>4</sub> [M]	0,05	0,05

En la Tabla 4.64 se describe el balance a la etapa de elución.

Tabla 4.64: Balance de masa a la cromatografía de intercambio iónico (C-IA) en *E. coli*.

Compuesto	F-33	F-37	F-36	F-38
Agua [kg]	126,7	86,7	1.258,44	1.171,74
rBoIFN- $\alpha$ [g]	387,48	344,86	0	42,62
NaCl [kg]	0	5,07	36,77	31,70
Tris-HCl [kg]	1,28	0,68	9,92	10,51
EDTA [kg]	0	0,03	0,37	0,34
Sacarosa [kg]	0	4,34	62,92	58,58
PMSF [kg]	0	0,0151	0,22	0,204

#### 4.2.9 Unidad de ultrafiltración (UF-1)

La ultrafiltración tiene como función concentrar el medio con el fin de aumentar la concentración de rBoIFN- $\alpha$  en solución y facilitar el proceso de purificación. El volumen de entrada se reduce 10 veces, de forma que al tratar 86,7 [L], estos se reducen finalmente a 8,67 [L] de solución.

En la Figura 4.35, se muestra un diagrama con las corrientes asociadas al sistema. La corriente F-37 corresponde a la solución proveniente de la columna cromatográfica de intercambio aniónico, F-39 es la corriente del retenido, donde se encuentra la proteína de interés y F-40 es la corriente del permeado de la ultrafiltración, corriente que será desechada.

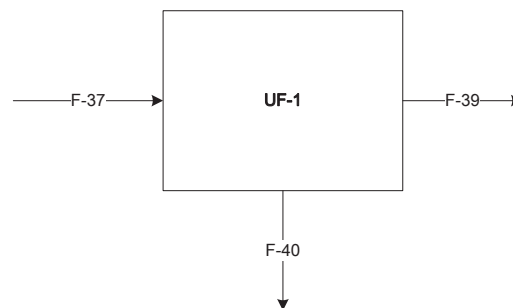


Figura 4.35: Corrientes asociadas al equipo de ultrafiltración UF-1 en *E. coli*.

El rendimiento de esta etapa está determinado por el coeficiente de retención de la membrana seleccionada que es del 99%, con lo que se asegura una pérdida mínima de proteína.

El balance de la proteína en esta etapa está determinado de manera análoga al proceso de *Pichia* por la Ecuación 4.40, Ecuación 4.41 y Ecuación 4.42.

Resolviendo, se tiene:

$$R = \frac{M_{F-40} [g]}{344,86 [g]} = 0,99$$

$$M_{F-39} = 341,42 [g]$$



$$86,7 [L] = 8,67[L] + V_{F-41}$$

$$V_{F-40} = 78,03 [L]$$

$$86,7 [L] \cdot 3,997 \left[ \frac{g}{L} \right] = 8,67 [L] \cdot 39,38 \left[ \frac{g}{L} \right] + 78,03 [L] \cdot [P]_{F-40}$$

$$[P]_{F-40} = 0,044 \left[ \frac{g}{L} \right]$$

Luego, en la Tabla 4.65 se muestra el balance de masa asociado a la etapa de ultrafiltración.

Tabla 4.65: Balance de masa a la unidad de ultrafiltración UF-1 en *E. coli*.

Compuesto	F-37	F-39	F-40
Agua [kg]	86,7	8,67	78,03
rBoIFN- $\alpha$ [g]	344,86	341,41	3,45
NaCl [kg]	5,07	0,25	4,82
Tris-HCl [kg]	0,68	0,03	0,65
EDTA [kg]	0,025	0,001	0,024
Sacarosa [kg]	4,34	0,217	4,123
PMSF [kg]	0,0151	0,0008	0,0143

#### 4.2.10 Cromatografía de exclusión molecular (C-EM)

Finalmente el proceso de purificación consta con una etapa de cromatografía por exclusión molecular (SEC) cuya finalidad es obtener un producto en solución lo más puro posible. El rendimiento de esta etapa es de un 88% (Shi et al., 2007) y se alcanza una pureza final mayor a un 95%.

En la Figura 4.36, se representa el diagrama de bloques para la unidad de la cromatografía. La corriente de entrada a la columna F-41 contiene la masa de rBoIFN- $\alpha$  recuperada en la ultrafiltración, la corriente F-44 es del buffer de elución, F-46 es la corriente de desecho la cual lleva también un pequeño porcentaje de rBoIFN- $\alpha$  y F-45 es la corriente que lleva el producto hacia su formulación final.

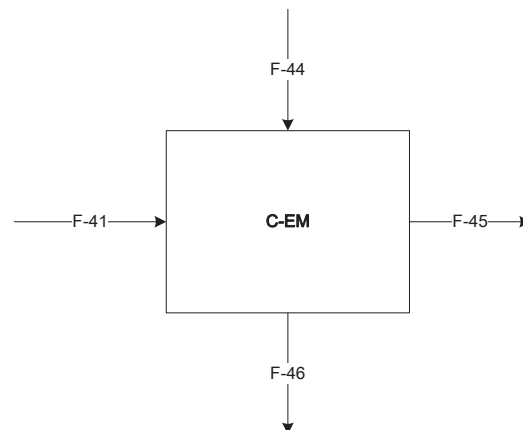


Figura 4.36: Corrientes asociadas a la unidad cromatográfica C-EM en *E. coli*.

El balance de masa de la proteína rBolFN- $\alpha$  se plantea en la Ecuación 4.43.

$$8,67 [L] \cdot [P]_{F-45} = 0,8 \cdot 8,67 [L] \cdot 39,38 \left[ \frac{g}{L} \right]$$

$$[P]_{F-45} = 31,502 \left[ \frac{g}{L} \right]$$

Además, la masa de contaminantes presentes en la solución viene dado por la Ecuación 4.44.

$$8,67 [L] \cdot [Contaminantes] = 0,05 \cdot \frac{0,8 \cdot 8,67 [L] \cdot 39,378 \left[ \frac{g}{L} \right]}{0,95}$$

$$[Contaminantes] = 0,191 \left[ \frac{g}{L} \right]$$

Luego, en la Tabla 4.61 se resume el balance de masa a la cromatografía de exclusión molecular. La corriente F-48 corresponde a la fracción eluida que no interesa, por lo tanto no será caracterizada.

Tabla 4.66: Balance de masa cromatografía de exclusión molecular C-EM en *E. coli*.

<b>Compuesto</b>	<b>F-41</b>	<b>F-45</b>	<b>F-44</b>	<b>F-46</b>
Volumen [L]	8,670	8,670	0,000	489
rBoIFN- $\alpha$ [g]	341,410	273,128	0,000	68,282
Tris-HCl [kg]	0,034	0,0003	0,000	0,0339
EDTA [kg]	0,001	0,0003	0,000	0,0010
Sacarosa [kg]	0,217	0,0003	0,000	0,2167
PMSF [kg]	0,001	0,0003	0,000	0,0005
NaCl [kg]	0,254	0,0003	4,287	4,5407
NaPO <sub>4</sub> [kg]	0,000	0,0003	0,003	0,0026

#### 4.2.11 Rendimiento global del proceso de recuperación y purificación

Tomando en consideración que el rendimiento global de un proceso puede ser dado por el producto entre los rendimientos de cada una de sus etapas, es que se puede calcular con la Ecuación 4.45. El rendimiento global del proceso de recuperación y purificación para *E. coli* es de 33%.

#### 4.2.12 Resumen de los flujos más relevantes en *E. coli*.

En la Tabla 4.67 se muestra un resumen con las composiciones de las corrientes más relevantes del proceso.

Tabla 4.67: Resumen de la composición de las corrientes del proceso en *E. coli*.

Compuesto	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6	F-7	F-8	F-9	F-10	F-11	F-12	F-13	F-14
Agua [L]	2,077	34.94	65	7.6	0	0	0	0.13	0.71	0.56	1.4	1.27	11.33	14
Medio cultivo [g]	0	0	0	0	23,323.45	0	0	53.41	0	0	0	553.14	0	0
Glicerol [g]	0	0	0	0	0	9,750	0	0	0	0	0	0	0	0
Lactosa [g]	0	0	0	0	0	0	2,812	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rBoIFN- $\alpha$ [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cell debris [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tris HCl [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaCl [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EDTA [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sacarosa [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PMSF [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inóculo [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	559.02	1,322.43	0	0	13,186.60
NaPO <sub>4</sub> [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Compuesto	F-15	F-16	F-17	F-18	F-19	F-20	F-21	F-22	F-23	F-24	F-25	F-26	F-27	F-28
Agua [L]	33.53	91.47	61	7.4	200	20	180	20	0	40	40	95	0	135
Medio cultivo [g]	22,723.84	0	0	0	4,864.40	24.3	4,840.10	0	0	24.3	24.3	0	0	24.3
Glicerol [g]	0	0	69,871	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lactosa [g]	0	0	0	10,412	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa [g]	0	0	0	0	5,210.62	5,210.62	30	0	0	5,210.62	0	0	0	0
rBoIFN- $\alpha$ [g]	0	0	0	0	759.38	759.38	3.82	0	0	759.38	389.43	0	0	389.43
Cell debris [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,580.57	0	0	5,580.57
Tris HCl [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	48.6	48.6	48.6	0	230.2	278.8
NaCl [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EDTA [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sacarosa [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PMSF [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inóculo [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaPO <sub>4</sub> [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Compuesto	F-29	F-30	F-31	F-32	F-33	F-34	F-35	F-36	F-37	F-38	F-39	F-40	F-41	F-42
Agua [L]	124.2	10.8	2.5	0	126.7	1,258.44	0	1,258.44	86.7	1171.74	8.67	78.03	8.57	480.33
Medio cultivo [g]	24.18	0.12	0	0	24.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glicerol [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lactosa [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rBoIFN- $\alpha$ [g]	387.48	1.95	0	0	387.48	0	0	0	344.86	46.62	341.41	3.45	341.41	0
Cell debris [g]	27.9	5,552.70	0	0	27.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tris HCl [g]	277.41	1.39	0	998	1,275.40	0	0	683.19	10,510	30	650	30	0	0
NaCl [g]	0	0	0	0	0	0	36,772	36,772	5070	31,702	250	4,820	250	0
EDTA [g]	0	0	0	0	0	0	367.76	367.76	25.34	342.42	1,270	24.07	1270	0
Sacarosa [g]	0	0	0	0	0	0	62,920	62,920	4340	58,580	220	4,123	220	0
PMSF [g]	0	0	0	0	0	0	219.22	219.22	15.1	204.12	0.8	14.3	760	0
Inóculo [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaPO <sub>4</sub> [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Compuesto	F-43	F-44	F-45	F-46	F-47	F-48	F-49
Agua [L]	0	480,33	8.67	489	8.67	8.67	8.67
Medio cultivo [g]	0	0	0	0	0	0	0
Glicerol [g]	0	0	0	0	0	0	0
Lactosa [g]	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa [g]	0	0	0	0	0	0	0
rBoIFN- $\alpha$ [g]	0	0	273,127	68,282	273,127	273,127	273,127
Cell debris [g]	0	0	0	0	0	0	0
Tris HCl [g]	0	0	0.275	33.88	0.275	0.275	0.275
NaCl [g]	4,287	4,287	0.275	4,541	0.275	0.275	0.275
EDTA [g]	0	0	0.275	0.992	0.275	0.275	0.275
Sacarosa [g]	0	0	0.275	216.7	0.275	0.275	0.275
PMSF [g]	0	0	0.275	0.48	0.275	0.275	0.275
Inóculo [g]	0	0	0	0	0	0	0
NaPO <sub>4</sub> [g]	2.884	2.884	0.275	2.609	0.275	0.275	0.275

### 4.3 REFERENCIAS CAPÍTULO 4

Acevedo F. y J.C. Gentina. (2002) Cinética de Fermentaciones. En: F. Acevedo, J.C Gentina e Illanes. Fundamentos de Ingeniería Bioquímica. Pp: 91-168. Valparaiso.

Araya, P. and Fardella, M. (2015). Evaluación técnico-económica de una planta productora de ácido p-cumárico por fermentación. PUCV.

Bailey, J. and Ollis, D. (1986). Biochemical Engineering Fundamentals. 2nd ed. McGraw-Hill Science.

Datar, R. and Rosén, C. (1987). Centrifugal Separation in the Recovery of Intracellular Protein from *E. coli*. The Chemical Engineering Journal, 34, pp.49-56.

Doran, P. (1998). Principios de ingeniería de los bioprocesos. Editorial ACRIBIA, S.A. pp: 229-411. Zaragoza, España.

El-Baky, N., Linjawi, M. H., & Redwan, E. M. (2015). Auto-induction expression of human consensus interferon- $\alpha$  in *Escherichia coli*. BMC Biotechnology.15:14.

Gombert, A. and Kilikian, B. (1998). Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. Journal of Biotechnology, 60, pp.47-54.

Hao, Y., Chu, J., Wang, Y., Zhang, S. and Zhuang, Y. (2006). Expression and aggregation of recombinant human consensus interferon-a mutant by *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, (28), pp.905-909.

Middelberg, A. (2000). Microbial Cell Disruption by High-Pressure Homogenization. In: M. Kalyanpur, A. Middelberg and A. Zydney, ed., Downstream Processing of Proteins, 1st ed. Mohamed Desai, pp.11-21.

Müller, A. y Gerding, G. (2014). Evaluación de la factibilidad técnico-económica de una planta productora de rhBMP-2 producida en células CHO. PUCV.

Shi, L., Wang, D., Chan, W. and Cheng, L. (2007). Efficient expression and purification of human interferon alpha2b in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, (54), pp.220-226.

Tejeda A., Montesinos R.M., Guzmán R. (1995). Bioseparaciones. Primera Edición., UNISON; Hermosillo, Sonora. México.

## CAPÍTULO 5

### DISEÑO Y SELECCIÓN DE EQUIPOS

#### 5.1 FERMENTADORES

La geometría del tanque de fermentación se obtiene empleando las relaciones geométricas estándares recomendadas para un impulsor tipo turbina "Rushton" de 6 paletas rectas estándar. Todos los biorreactores, de propagación y producción se diseñan de la misma forma y con las mismas relaciones geométricas presentadas en la Tabla 5.1.

Los parámetros que se calcularán según razones recomendadas para el diseño de fermentadores, pueden ser observados en la Figura 5.1.

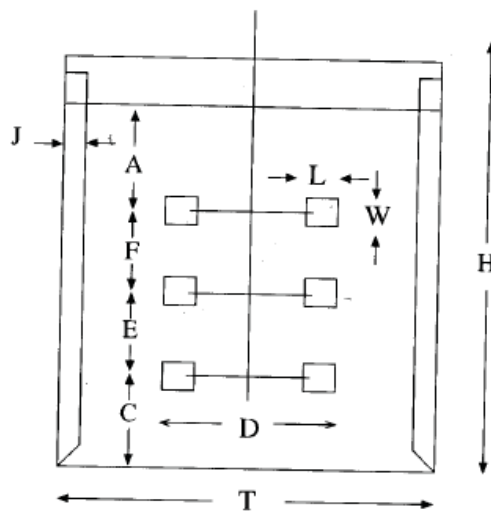


Figura 5.1: Parámetros geométricos de un fermentador. (Doran, 1998)

Dónde,

A: Altura entre primer agitador a la superficie, [m].

F: Altura entre segundo y primer agitador, [m].

C: Espacio vertical entre último impulsor y la superficie del líquido, [m].

D: Diámetro del impulsor, [m].

H: Altura de total, [m].

J: Ancho de baffle o deflector, [m].

L: Longitud de la paleta del impulsor, [m].

T: Diámetro de tanque, [m].

W: Ancho de la paleta del impulsor, [m].

Por otra parte, las razones recomendadas para la confección de los fermentadores de este tipo son detalladas según bibliografía y se muestran en la Tabla 5.1

Tabla 5.1: Relaciones geométricas considerando turbina tipo Rushton (Doran, 1998)

Razón	Valor	Valor Elegido
H/T	1-3	2
T/D	3	3
A (C)/D	0,5-3	1
N° de Baffles	4	4
J/T	0,08-0,1	0,09
L/D	0,25	0,25
W/D	0,2	0,2
Dd/D	0,67	0,67

Para el cálculo de las dimensiones se utilizan las relaciones elegidas de la Tabla 5.1 y la Ecuación 5.1 y Ecuación 5.2.

$$T = \sqrt[3]{\left(\frac{4}{\pi} \cdot V\right)}$$

Ecuación 5.1

$$i = \frac{(H - D)}{D}$$

Ecuación 5.2

Dónde,

i: Número de rotores.

V: Volumen útil del fermentador, [m<sup>3</sup>].

Ejemplo de cálculo:

$$T = \sqrt[3]{\left(\frac{4}{\pi} \cdot 0,011 \text{ [m}^3\text{]}\right)} = 0,191 \text{ [m]}$$

$$i = \frac{(0,382 - 0,064)}{0,064} = 5$$

Las dimensiones determinadas a continuación, están calculadas tomando en cuenta la cinética de crecimiento del microorganismo y el cálculo previo del volumen de cada fermentador.

En el caso de *Pichia pastoris* para la primera propagación se utilizará un fermentador de volumen de trabajo 10,9 [L], para la segunda propagación uno de 109 [L] y para la fermentación principal se trabaja con un volumen de 2728 [L]; los biorreactores tendrán forma cilíndrica vertical, con fondo redondeado para evitar espacios detenidos donde el mezclado sea deficiente y para la agitación se utilizarán rotores de turbina Rushton.

En la Tabla 5.2 y 5.3 se presenta el resumen de las dimensiones determinadas según la Ecuación 5.1 y Ecuación 5.2 y las relaciones de la Tabla 5.1 tanto para *P. pastoris* como para *E. coli*.



Tabla 5.2: Dimensiones de fermentadores *P. pastoris*.

	FP1	FP2	FU
V [m <sup>3</sup> ]	0,011	0,109	2,728
T [m]	0,240	0,518	1,514
D [m]	0,080	0,173	0,505
H [m]	0,240	0,518	1,514
i	2,000	2,000	2,000
A [m]	0,080	0,173	0,505
J [m]	0,022	0,047	0,136
L [m]	0,020	0,043	0,126
W [m]	0,016	0,035	0,101
Dd [m]	0,048	0,103	0,300

Tabla 5.3: Dimensiones de fermentadores *E. coli*.

	FP1	FP2	FU
<b>V [m3]</b>	0,0014	0,014	0,200
<b>T [m]</b>	0,096	0,207	0,503
<b>D [m]</b>	0,032	0,069	0,168
<b>H [m]</b>	0,192	0,415	1,006
i	5,000	5,000	5,000
<b>A [m]</b>	0,032	0,069	0,168
<b>J [m]</b>	0,009	0,019	0,045
<b>L [m]</b>	0,008	0,017	0,042
<b>W [m]</b>	0,006	0,014	0,034
<b>Dd [m]</b>	0,021	0,046	0,112

### Cálculo de Potencia de Agitación

Para los cálculos de potencia de agitación de cada fermentador se utilizarán las Ecuaciones 5.3 y 5.4 para determinar el número de Reynolds y la potencia no gaseada respectivamente. Además, se considerarán las propiedades del agua (densidad igual a  $1 \cdot 10^{-3}$  [kg/m<sup>3</sup>] y viscosidad 1000 [kg/m·s]). Por otro lado la velocidad de agitación se estimará dentro de los rangos recomendados en bibliografía (Acevedo et al., 2002), donde se especifica que para fermentadores de laboratorio fluctúa entre los 200 y 1000 [rpm], mientras que para fermentadores industriales varía entre 50 y 300 [rpm].

$$Re = \frac{N \cdot D_i^2 \cdot \rho}{\mu}$$

## Ecuación 5.3

Dónde,

Re: Número de Reynolds.

$\mu$ : Viscosidad de líquido, [kg/m·s].

$\rho$ : Densidad del fluido, [kg/m<sup>3</sup>].

N: Velocidad de agitación, [s<sup>-1</sup>].

Ejemplo de cálculo:

$$Re = \frac{3,33 [S^{-1}] \cdot 0,06358 [m] \cdot 1000 \left[ \frac{kg}{m^3} \right]}{0,001 \left[ \frac{kg}{m \cdot s} \right]} = 13460,86$$

Una vez determinado el tipo de flujo, trabajando con flujos turbulentos ( $Re > 10^4$ ), la potencia requerida está dada por la Ecuación 5.4.

$$P = N_p \cdot \rho \cdot D_i^5 \cdot N^3$$

## Ecuación 5.4

Dónde,

P: Potencia de agitación, [kW].

$N_p$ : Número de potencia para turbina Rushton = 5 - 6 (Acevedo et al., 2002).

Ejemplo de cálculo:

$$P = 5 \cdot 1000 \left[ \frac{kg}{m^3} \right] \cdot 0,06358^5 [m^5] \cdot 3,33^3 [s^{-3}] = 0,19181 [W]$$

Luego, la potencia de agitación con aireación será calculada mediante la Ecuación 5.5 (Michel & Miller, 1962).

$$P_g = K \cdot \left( \frac{P^2 \cdot N \cdot D^3}{F^{0,56}} \right)^{0,45}$$

Ecuación 5.5

Dónde,

P: Potencia no gaseada para mover un impulsor, [W].

$P_g$ : potencia gaseada para mover un impulsor, [W].

K: 1 para volúmenes de fermentación mayores a 1000 [L] y 0,72 para volúmenes menores.

N: Velocidad de agitación, [ $s^{-1}$ ].

D: diámetro del agitador, [m].

F: flujo de aire, [ $m^3/s$ ].

El flujo de aire, “F” en [ $m^3/s$ ] necesario para cada fermentador fue determinado en el Capítulo 4 (ver sección 4.1.4 y sección 4.2.2).

Para determinar la potencia requerida es necesario multiplicar  $P_g$  por el número de impulsores como se muestra en la Ecuación 5.7. Así mismo la energía requerida se obtiene multiplicando este valor por las horas de funcionamiento de la etapa.

$$v_s = \frac{4 \cdot Q_a}{\pi \cdot r^2}$$

Ecuación 5.6

$$P_{gi} = P_g \cdot (0,4 + 0,6 \cdot i)$$

## Ecuación 5.7

Dónde,

$k_{La}$ : Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, [ $s^{-1}$ ].

$P_{gi}$ : Potencia gaseada necesaria para mover ambos impulsores, [W].

$P_{g/V}$ : Potencia gaseada volumétrica necesaria para mover los dos impulsores, [ $W \cdot m^3$ ].

$V_s$ : Velocidad superficial del aire, [m/s].

$i$ : Número de impulsores.

$r$ : radio del fermentador, [m].

$Q_a$ : Flujo de aire, [ $m^3 \cdot s^{-1}$ ].

Ejemplo de cálculo:

$$P_g = 0,72 \cdot \left( \frac{0,19181^2 \left[ \frac{kg \cdot m^2}{m^3} \right] \cdot 3,33 [S^{-1}] \cdot 0,06358^3 [m]}{0,00017^{0,56} \left[ \frac{m^3}{s} \right]} \right)^{0,45} = 0,06082 [W]$$

$$P_{gi} = 0,06082 [W] \cdot (0,4 + 0,6 \cdot 4) = 0,17030 [W]$$

En la Tabla 5.4 y 5.5 se presentan los valores definidos para determinar la potencia de agitación de cada fermentador y sus resultados, en los respectivos procesos.

Tabla 5.4: Potencia de agitación fermentadores *P. pastoris*.

Parámetro	FP1	FP2	FU <sub>LOTE</sub>	FU <sub>CLA1</sub>	FU <sub>CLA2</sub>
V [L]	10,9	109,0	1090,0	1176,3	2728,0
V [m3]	0,0109	0,1090	1,0900	1,1763	2,7280
Ni [rps]	3,33	2,50	1,67	1,67	0,83
Re	13.461	46.907	268.096	268.096	133.780
F [L/min]	9,9	99,0	2.157	2.265	2.197
Qa [m3/s]	0,0002	0,002	0,04	0,04	0,04
Vs [m/s]	0,05	0,11	0,29	0,30	0,30
P [W]	0,2	3,8	240,5	240,5	29,9
Pg [W]	0,06	1,23	117,73	116,29	13,12
Pgi [W]	0,17	3,44	329,64	325,61	36,73
Pg/V [W/m3]	15,61	31,56	302,09	276,80	13,47
t [h]	3,84	3,84	20,00	4,00	74,50
Pgi [kW]	0,0002	0,0034	0,3300	0,3300	0,0370
kWh	0,0007	0,0132	6,600	1,3024	2,7400

Tabla 5.5: Potencia de agitación fermentadores *E. coli*.

Parámetro	FP1	FP2	FU <sub>LOTE</sub>	FU <sub>CLA</sub>
V [L]	1,4	14	139	200
V [m3]	0,014	0,014	0,139	0
Ni [rps]	3	3,33	2,5	2,5
Re	3.427	15.905	70.303	70.303
F [L/min]	0,08	33,86	336,14	236,57
Qa [m3/s]	$1,3 \cdot 10^{-6}$	0,001	0,006	0,004
Vs [m/s]	0,002	0,15	0,25	0,18
P [W]	0,01	0,29	10	10
Pg [W]	0,00	0,06	2,46	2,69
Pgi [W]	0,01	0,17	6,90	7,54
Pg/V [W/m3]	6,23	12,13	49,62	37,68
t [h]	5	5,0	7,0	8,0
Pgi [kW]	0,00001	0,0003	0,010	0,010
kWh	0,00003	0,001	0,035	0,060

### Esterilización del Aire

Dentro de los requerimientos para mantener las condiciones de operación lo más estériles posibles, además de las corrientes líquidas, las corrientes gaseosa también son de importancia, debido a que están en contacto directo con el cultivo. Para evitar

estos problemas de contaminación se utilizan filtros en las entradas de aire para las fermentaciones de propagación y la fermentación principal.

Como agente filtrante se utiliza lana de vidrio, que tiene las siguientes características:

$d_f$ : Diámetro del poro de la fibra =  $1,9 \cdot 10^{-5}$  [m]

$\alpha^m$ : Fracción ocupada por la lana de vidrio = 0,033.

Además, se consideran las siguientes condiciones de operación:

$d_p$ : Diámetro partícula a filtrar =  $10^{-6}$  [m].

$v_s$ : Velocidad de aire a través del lecho.

$\mu$ : Viscosidad del aire a 20 [°C] = 0,01812 [cP].

Para determinar la cantidad de microorganismos que pasarán por el filtro por fermentación se resuelve la Ecuación 5.8.

$$N_0^m = Qa \cdot N_0 \cdot tf$$

Ecuación 5.8

Dónde,

$N_0^m$ : Número de microorganismos que entran al filtro por fermentación, [m.o./operación].

$N_0$ : Microorganismos presentes en el aire,  $10^3$  [m.o./m<sup>3</sup> aire].

$N^m$ : Número de microorganismos que pasan el filtro de aire,  $10^{-3}$  [m.o./operación].

$Qa$ : Flujo de aire, [m<sup>3</sup>/h].

$t_f$ : Tiempo de fermentación, [h].

Ejemplo de cálculo:

$$N_0^m = 0,5974 \left[ \frac{m^3}{h} \right] \cdot 10^3 \left[ \frac{m.o}{m^3 \text{ aire}} \right] \cdot 3,838 [h] = 2292,5794 \left[ \frac{m.o}{operación} \right]$$

El largo del filtro se determina por la Ecuación 5.9.

$$L = \frac{\pi \cdot df \cdot (1 - a^m)}{4 \cdot a^m \cdot \eta \alpha^m} \cdot \ln \left( \frac{N_0^m}{N_m \cdot Qa \cdot tf} \right)$$

Ecuación 5.9

Dónde,

L: Largo del filtro, [m].

$n_\alpha^m = 0,01$ .

El diámetro del filtro se determina a partir de las relaciones que se muestran en la Ecuación 5.10; 5.11; y 5.12.

$$A = \frac{Qa}{v}$$

Ecuación 5.10

$$D = \sqrt{\frac{A \cdot 4}{\pi}}$$

Ecuación 5.11

$$v = \frac{v_s}{1 - a^m}$$

Ecuación 5.12

Ejemplos de cálculos:

$$L = \frac{\pi \cdot 1,9 \cdot 10^{-5} [m] \cdot (1 - 0,033)}{4 \cdot 0,033 \cdot 0,01} \cdot \ln \left( \frac{2292,5794 \left[ \frac{m \cdot o}{operación} \right]}{10^{-3} \left[ \frac{m \cdot o}{operación} \right] \cdot 0,5974 \left[ \frac{m^3}{h} \right] \cdot 3,8376 [h]} \right)$$

$$= 0,6767 [m]$$

$$v = \frac{0,05227 \left[ \frac{m}{s} \right]}{1 - 0,033} = 0,05170 \left[ \frac{m}{s} \right]$$

$$A = \frac{0,000166 \left[ \frac{m^3}{h} \right]}{0,05170 \left[ \frac{m}{s} \right] \cdot 3600} = 0,00321 [m^2]$$

$$D = \sqrt{\frac{0,00321 [m^2] \cdot 4}{\pi}} = 0,0639 [m]$$

El resultado de los diámetros y largos de los filtros de aire para cada fermentador se encuentran en la Tabla 5.6 y Tabla 5.7 para *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*, respectivamente.



Tabla 5.6: Características de los filtros de aire de los fermentadores para *P. pastoris*.

Equipo	L [m]	D [m]
FP1	0,68	0,06
FP2	0,88	0,20
FU	1,40	0,95

Tabla 5.7: Características de los filtros de aire de los fermentadores para *E. coli*.

Equipo	L [m]	D [m]
FP1	0,6	0,3
FP2	0,6	5,0
FU	0,6	15,8

### Sistema de enfriamiento en *P. pastoris* (Diseño de serpentín)

El diseño de los serpentines de los distintos fermentadores se realizará según el método que presenta Acevedo et al., (2002). Las opciones existentes son; chaqueta, serpentín (interno y externo) e intercambiador de calor, opciones cuyo esquema se encuentra en la Figura 5.2.

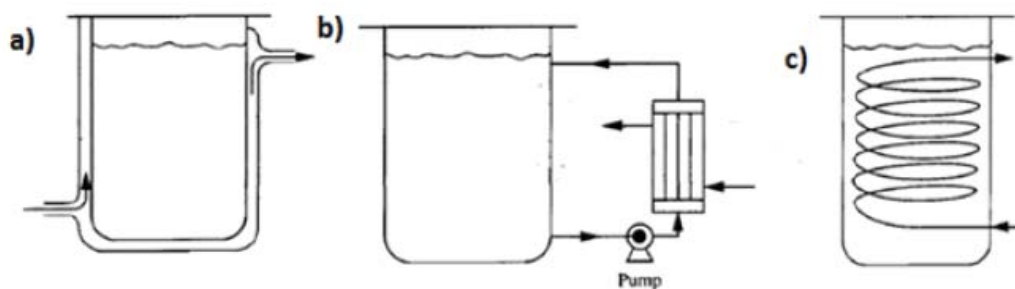


Figura 5.2: Sistemas de intercambio de calor en fermentadores. Donde a) representa el fermentador con una chaqueta, b) con intercambiador de calor y c) con serpentín.

Se ha optado por el serpentín interno debido a que para procesos industriales provee de un área adecuada, y no genera problemas de aireación, que se dan en los sistemas por intercambiador de calor.

Los equipos disponibles en el mercado para los volúmenes de propagación, comúnmente son equipados con chaquetas. Por lo que, el diseño del serpentín se realiza para el enfriamiento del biorreactor de fermentación principal.

El área requerida de transferencia de calor se despeja de la Ecuación 5.13. Para calcular el área de transferencia de calor se utiliza el calor requerido calculado en el Capítulo 4 en la sección de balance de energía (4.1.4 y 4.2.2).

$$Q_i = U \cdot A_s \cdot \Delta T$$

Ecuación 5.13

Dónde,

$Q_i$ : calor transferido, intercambiado, [kcal/h].

$U$ : coeficiente global de transferencia = 400-800  $\left[ \frac{\text{kcal}}{\text{h} \cdot \text{m}^2 \cdot ^\circ\text{C}} \right]$

$A_s$ : área superficial de transferencia de serpentín.

$\Delta T$ : media logarítmica entre  $(T_f - T_2)$  y  $(T_f - T_1)$ .

$T_{a_0}$ : Temperatura líquido de enfriamiento inicial, [ $^\circ\text{C}$ ].

$T_{a_f}$ : Temperatura líquido de enfriamiento final, [ $^\circ\text{C}$ ].

$T_f$ : Temperatura del fermentador, [ $^\circ\text{C}$ ].

$T_{\text{amb}}$ : Temperatura ambiental, [ $^\circ\text{C}$ ].

$T_f$ ,  $T_2$ ,  $T_1$ : Temperatura fermentación 26 [ $^\circ\text{C}$ ], temperatura salida agua 26 [ $^\circ\text{C}$ ], temperatura ingreso agua 10 [ $^\circ\text{C}$ ]; respectivamente.

Luego, el área superficial necesaria para realizar la transferencia de calor entre el fermentador y el serpentín se calcula con la Ecuación 5.13.

Ejemplo de cálculo:

$$A_s = \frac{29.427,93 \left[ \frac{kcal}{h} \right]}{600 \left[ \frac{kcal}{h \cdot m^2 \cdot ^\circ C} \right] \cdot 34 [^\circ C]} = 1,443 [m^2]$$

Con el área de transferencia de calor se procede a calcular la longitud total de la tubería del intercambiador de calor. Los valores utilizados se muestran en la Tabla 5.8.

Tabla 5.8: Valores utilizados para el diseño de las tuberías del serpentín de FU en *P. pastoris*.

Fermentador	FU
D Nominal [m]	0,03
D externo [m]	0,03
D interno [m]	0,02
A específica [m <sup>2</sup> /m]	0,03

La longitud total de la tubería se determina a partir de la Ecuación 5.14.

$$L = \frac{A_s}{\pi \cdot D_n}$$

Ecuación 5.14

Dónde,

L: Longitud total de tubería del serpentín.

D<sub>n</sub>: Diámetro nominal de la tubería.

Ejemplo de cálculo:

$$L = \frac{1,443 [m^2]}{\pi \cdot 0,0254 [m]} = 18,1 [m]$$

Con el largo del serpentín requerido, es posible calcular el número de vueltas del serpentín según la ecuación 5.15.

$$A_t = \pi \cdot d_s$$

Ecuación 5.15

$$n = \frac{A_s}{A_t}$$

Dónde,

$d_s$ : Superficie exterior, [ $m^2/m$ ].

$n$ : número de vueltas del serpentín.

$l$ : longitud del serpentín, [ $m$ ].

$A_t$ : Área de transferencia por vuelta.

Ejemplo de cálculo:

$$A_t = \pi \cdot 0,031959 \left[ \frac{m^2}{m} \right] = 0,1 [m^2]$$

$$n = \frac{1,443 [m^2]}{0,1 [m^2]} = 14,36 \sim 15$$

Los resultados del número de vueltas y largo del serpentín se detallan en la Tabla 5.9.

Tabla 5.9: Resultados del diseño de serpentín de enfriamiento para fermentador FU en *P. pastoris*.

Variable	FU
Qi [kcal/h]	29.427,93
At [m <sup>2</sup> ]	1,44
l [m]	18,10
n	15

## 5.2 CENTRIFUGACIÓN

Para el diseño del equipo se puede utilizar la Ecuación 5.16, que determina la velocidad terminal de la partícula.

$$F = 2 \cdot v_g \cdot \Sigma$$

Ecuación 5.16

Dónde,

F: Flujo de operación de la centrifuga,  $2,8 \cdot 10^{-4}$  [m<sup>3</sup>/s].

$v_g$ : Velocidad terminal de la partícula, [m/s].

$\Sigma$ : Factor de diseño, que corresponde al área equivalente de un sedimentador de altura H, que realiza igual trabajo que la centrifuga, [m<sup>2</sup>].

La velocidad terminal de la partícula a separar se calcula a su vez mediante la Ecuación 5.17.

$$v_g = \frac{(\rho_s - \rho_l) \cdot Dp^2 \cdot g}{18 \cdot \mu_l}$$

Ecuación 5.17

Dónde,

$\rho_s$ : Densidad de la biomasa, 1100 [kg/m<sup>3</sup>].

$\rho_l$ : Densidad del caldo de cultivo, 1000 [kg/m<sup>3</sup>].

$D_p$ : Diámetro de la partícula, aproximadamente  $5 \cdot 10^{-6}$  [m] para *P. pastoris*.

$g$ : Aceleración de gravedad, 9,8 [m/s<sup>2</sup>].

$\mu_l$ : Viscosidad del caldo de cultivo, 0,001 [kg/m·s].

Ejemplo de cálculo:

$$v_g = \frac{\left(1100 \left[\frac{kg}{m^3}\right] - 1000 \left[\frac{kg}{m^3}\right]\right) \cdot 0,000005^2 [m] \cdot 9,8 \left[\frac{m}{s^2}\right]}{18 \cdot 0,001 \left[\frac{kg}{m \cdot s}\right]} = 1,3611 \cdot 10^{-6} \left[\frac{m}{s}\right]$$

$$\Sigma = \frac{0,00027778 \left[\frac{m^3}{s}\right]}{2 \cdot 1,3611 \cdot 10^{-6} \left[\frac{m}{s}\right]} = 102,04 [m^2]$$

Reemplazando estos valores en la Ecuación 5.16 se obtiene una velocidad terminal de  $1,3611 \cdot 10^{-6}$  [m/s]. Este valor de velocidad terminal se reemplaza luego en la Ecuación 5.17, obteniéndose un factor sigma de 102,04 [m<sup>2</sup>].

La centrifuga CLARA 20 de Alfa Laval es diseñada para ser una unidad multipropósito en industrias como la alimentaria y de fermentación. Este separador puede ser configurado como clarificador para separar sólidos de un líquido o como concentrador o purificador para separar dos fases líquidas y posiblemente también partículas sólidas. En la Tabla 5.10 se muestran las características de la centrifuga CLARA 20 de Alfa Laval.

Tabla 5.10: Especificaciones técnicas de la centrifuga CLARA 20.

<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Capacidad de Rendimiento [m <sup>3</sup> /h]	1 y 4
Velocidad de tazón [rpm]	9.512
Fuerza centrífuga	11.130 g
Volumen de líquido en el tazón [L]	2.2
Volumen de descarga fija [L]	1,1
Potencia del motor [kW]	3,7
Tiempo de inicio (puesta en marcha) [min]	3,5 - 4,5
Tiempo parada con freno	3 – 4

### 5.3 HOMOGENIZADOR (HO-1)

En cuanto al sistema de disrupción, se ha optado por romper las células de *E. coli* por medio de un homogenizador. En esta etapa se deben realizar 4 pasos por el equipo a una presión de 630 [bar], lo cual liberaría >99% de la proteína (Datar & Rosén, 1987). Considerando el balance de masa para el equipo de disrupción (Capítulo 4), el equipo debe poder tratar una cantidad de 40 litros.

En la Tabla 5.11 se resumen las características del homogenizador Niro Soavi NS2006L/Pony.

Tabla 5.11: Características del homogenizador (HO-1) Niro Soavi NS2006L/Pony para *E. coli*.

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Rango de presión [bar]	100 – 1.500
Flujo [L/h]	35 - 80
Consumo [kW]	5,5
Dimensiones W x D [mm]	790 x 1.195

### 5.4 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO (C-IA)

#### 5.4.1 Cromatografía de intercambio iónico de *P. pastoris*

Anteriormente, en el Capítulo 4 se mencionó que el proceso de purificación se llevaría a cabo siguiendo el protocolo de purificación de rhIFN- $\alpha$  realizado por Shi et al., (2007). Este protocolo presenta una etapa de cromatografía de intercambio aniónico para purificar la proteína recombinante de interés. El diseño del equipo y la selección

de la resina también fueron basadas en dicho estudio, por lo que algunos de los cálculos de diseño están en directa relación a la información entregada en ese estudio. En la Tabla 5.12 se presentan las consideraciones prácticas para la separación por intercambio iónico.

Tabla 5.12: Consideraciones prácticas para intercambio iónico. (Ion exchange chromatography handbook, Amersham Bioscience).

Etapa	Parámetro	Rango deseado
Todas las etapas	pH	8,4
Etapa Equilibrado	Volumen	5 -10 CV
	Velocidad de flujo	500 cm/h
Etapa Lavado	Volumen	5- 10 CV
	Velocidad de flujo	500 cm/h
Etapa Elución	Volumen inicial	10-20 CV
	Velocidad de flujo	300 cm/h

El volumen con el que se puede cargar la columna no está restringido en la cromatografía de intercambio iónico; por el contrario, usualmente ésta es una etapa de concentración al poder cargar grandes volúmenes a la columna, por lo que se cargará con un volumen equivalente a 2 CV. Para este caso se escoge la resina de intercambio aniónico de Q Sepharose Fast Flow de GE Healthcare®, la cual es un intercambiador de anión fuerte con una capacidad de intercambio máxima de 0,25 [mmol/ml] (Amersham Biosciences, 2002).

La Teoría de Platos es uno de los métodos más usados en el análisis de la cromatografía por elución. Sin embargo, este modelo tiene sus limitaciones en lo que se refiere al diseño y escalamiento de columnas; debido a esto se utiliza la Teoría Combinada, la cual junta la Teoría de Platos con la Teoría Cinética (Apéndice A.2).

El número teórico de platos (N) es un índice utilizado para determinar la eficiencia de las columnas y se puede calcular utilizando la Ecuación 5.18. Además la determinación de los valores de  $t_R$  y  $W_{0,5}$  se realizan a partir del cromatograma de la etapa de elución obtenido en el estudio realizado por Shi et ., 2007(Apéndice A.2).

$$N = 5,545 \cdot \left( \frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2$$



## Ecuación 5.18

Dónde,

$t_R$ : Tiempo de retención de la proteína de interés.

$W_{0,5}$ : Ancho del peak a la mitad de la altura (en unidad de tiempo).

Por otro lado, el modelo Cinético General para describir una columna cromatográfica es más complejo, pero a partir de ella se puede calcular el coeficiente de transferencia de masa de la columna cromatográfica ( $k_L$ ) y el área por unidad de volumen ( $a$ ) con la Ecuación 5.19 y Ecuación 5.20.

$$k_L = 1,17 \cdot v \cdot \left( \frac{d_p \cdot v \cdot \rho}{\mu} \right)^{-0,42} \cdot \left( \frac{\mu}{D \cdot \rho} \right)^{-0,67}$$

## Ecuación 5.19

Donde,

$d_p$ : Diámetro de partícula de gel, [cm].

$\rho$ : Densidad solución, [g/mL].

$\mu$ : Viscosidad dinámica de solución, [g/m·s].  
[cm<sup>2</sup>/s].

D: Coeficiente de difusividad,

$$a = \frac{6 \cdot (1 - \varepsilon)}{d_p}$$

## Ecuación 5.20

Dónde,

$d_p$ : Diámetro de partícula de gel, [cm].

$a$ : Área por unidad de volumen

$\varepsilon$ : Porosidad del lecho.

Pero para ello se debe conocer el valor del coeficiente de difusividad de la proteína en el gel escogido; como no se cuenta con éste dato para la proteína rBoIFN- $\alpha$ , se

supone una similitud de la solución con el agua. El cálculo del coeficiente de difusividad para una cromatografía de intercambio iónico se puede realizar con la Ecuación 5.21, denominada ecuación de Polson. En la Tabla 5.13 se presentan valores de D para Q Sepharose Fast Flow determinado con la Ecuación 5.21.

$$D_l = 2,74 \cdot 10^{-5} \cdot M_r^{-1/3}$$

Ecuación 5.21

Dónde,

$D_l$ : Coeficiente de difusividad, [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ].

$M_r$ : Peso molecular relativo, [Da].

Tabla 5.13: Coeficientes de difusividad.

Proteína	Peso Molecular [kDa]	Coeficiente de Difusividad [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ]		Fuente
		Q Sepharose	Ec. Polson	
Albumina bovina	66,4	$7,40 \cdot 10^{-7}$	$6,77 \cdot 10^{-7}$	Pyle, 1990
rBoIFN- $\alpha$	19	-	$1,03 \cdot 10^{-6}$	-

Luego, suponiendo propiedades similares al agua (densidad y viscosidad) y utilizando los datos presentados en la Tabla 5.14 junto con las ecuaciones (5.19 y 5.20) se obtienen los valores de  $k_L$  y  $a$ .

Tabla 5.14: Datos para el diseño de la columna de intercambio aniónico Q Sepharose Fast Flow.

Parámetro	Símbolo	Dato	Fuente
Diámetro partícula gel	$d_p$	$93,5 \pm 31$ [ $\mu\text{m}$ ]	(Pyle, 1990)
Velocidad superficial	$V$	300 [ $\text{cm}/\text{h}$ ]	(Amersham Bioscience, 1997)
Densidad agua	$P$	1000 [ $\text{kg}/\text{m}^3$ ]	-
Viscosidad agua	$\mu$	0,001 [ $\text{Pa} \cdot \text{s}$ ]	-
Coeficiente de difusividad	$D$	$1,03 \times 10^{-6}$ [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ]	Según Ec. (Pyle, 1990)
Fracción de vacío	$\epsilon$	0,4	(Simon, 1991)

Ejemplo de cálculo:

$$k_L = 1,17 \cdot 300 \left[ \frac{cm}{h} \right] \cdot \left( \frac{0,00935 [cm] \cdot 300 \left[ \frac{cm}{h} \right] \cdot 1 \left[ \frac{g}{cm^3} \right]}{0,001 \left[ \frac{g}{cm \cdot s} \right] \cdot \frac{3600s}{1h}} \right)^{-0,42}$$

$$\cdot \left( \frac{0,001 \left[ \frac{g}{cm \cdot s} \right]}{1,027 \cdot 10^{-6} \left[ \frac{cm^2}{s} \right] \cdot 1 \left[ \frac{g}{cm^3} \right]} \right)^{-0,67}$$

$$k_L = 2,38 \left[ \frac{cm}{h} \right]$$

$$a = \frac{6 \cdot (1 - \epsilon)}{d_p [cm]} = 385,03 \left[ \frac{1}{cm} \right]$$

Entonces, la altura de una unidad de transferencia (HTU) se determina utilizando la Ecuación 5.22 (Apéndice A.2).

$$HTU = \frac{v}{k_L \cdot a}$$

Ecuación 5.22

$$HTU = \frac{300 \left[ \frac{cm}{h} \right]}{2,38 \left[ \frac{cm}{h} \right] \cdot 385,03 \left[ \frac{1}{cm} \right]} = 0,33 [cm]$$

Luego, al conocer el número teórico de platos (N) y HTU, se puede calcular el largo teórico de la columna con la Ecuación 5.23.

$$L = HTU \cdot N$$

Ecuación 5.23

$$L = 0,33 [cm] \cdot 199,44 = 65,38 [cm]$$

Una vez obtenido el largo de la columna cromatográfica, se evalúan los equipos ofrecidos en el mercado considerando esta altura de columna determinada. En la Figura 5.3 se muestra una columna cromatográfica EasyPack®.



Figura 5.3: Columna cromatográfica vacía (VERDOT Ips<sup>2</sup> EasyPack®).

Los diámetros disponibles en el mercado se presentan en la Tabla. Las columnas escogidas corresponden a columnas cromatográficas VERDOT Ips<sup>2</sup> EasyPack®, diseñadas para aplicaciones industriales. Para columnas de dimensiones estándar de largos de 600 a 900 [mm], recomiendan diámetros desde 100 a 1000 [mm]. Una vez conociendo los equipos disponibles se puede elegir un diámetro de columna del equipo que se adapte a las necesidades del proceso y a las condiciones de escalamiento (Apéndice A.1). En la Tabla 5.15 se muestran los diámetros y características del modelo de columna EasyPack®.

Tabla 5.15: Diámetros y características de las columnas VERDOT Ips<sup>2</sup> EasyPack®.

Diámetro [mm]	Volúmen de Columna [L]	N° Cargas	Flujo [L/h]
600	184,9	7	848
700	251,7	5	1155
800	328,7	4	1508
1000	513,7	3	2356

Por lo tanto, considerando los volúmenes que se debe tratar y las recomendaciones de diámetros se decidió por utilizar el diámetro que entregue el mayor volumen de columna posible para disminuir al máximo la cantidad de cargas, y así el tiempo de operación. Además se utiliza un criterio de escalamiento que recomienda utilizar columnas más bajas y anchas, manteniendo el tiempo de residencia de la proteína de interés que controla la separación y tratando de mantener la relación de velocidad superficial y largo (v/L) lo más cercana posible a la relación obtenida en laboratorio por Shi et al., 2006 (Apéndice A.3). En la Tabla 5.16 se muestra una comparación con los valores de v/L a distintas escalas.

Tabla 5.16: Tabla comparativa de razones v/L.

Escala	Razón v/L
Escala Laboratorio	4,5
Escala producción	3

En la Tabla 5.17 se establecen las características de la columna elegida de diámetro 1000 [mm].

Tabla 5.17: Columna cromatográfica de intercambio aniónico para *P. pastoris*.

Características proveedor	Diámetro [mm]	Altura Calculada [cm]	N° Cargas	Número teórico de platos (N)	Caudal [L/h]
Diámetro columna [mm]	1000	65,4	3	199	2356

Por otro lado, conociendo la altura de la columna (L), la velocidad superficial (v) y los volúmenes de columna (VC) de las etapas de equilibrado (Eq) y elución (El), se puede estimar un tiempo de duración aproximado de ésta etapa cromatográfica, con la Ecuación 5.24.

$$t = \sum_i \frac{L \cdot CV_i}{v_i}$$

Ecuación 5.24

Dónde,

“i” corresponde a cada etapa (equilibrado, lavado, elución).

Luego,

$$t = \frac{L}{v} \cdot CV_{eq} + \frac{L}{v} \cdot CV_{la} + \frac{L}{v} \cdot CV_{el} = \left( \frac{65,4 \text{ [cm]}}{500 \frac{\text{[cm]}}{\text{[h]}}} \cdot 5 + \frac{65,4 \text{ [cm]}}{500 \frac{\text{[cm]}}{\text{[h]}}} \cdot 5 + \frac{65,4 \text{ [cm]}}{300 \frac{\text{[cm]}}{\text{[h]}}} \cdot 10 \right) \cdot 3$$

$$= 10,464 \text{ [h]}$$

Además, se tiene que el volumen de carga es 2 VC, por lo que 1027,3 [L] se cargan en 26,2 [min] por carga, considerando que se realizan 3 cargas en total, en cargar las muestras se ocupan 1,31 [h].

### **Sistema Cromatográfico *P. pastoris***

#### Cromatografía de intercambio iónico

Para la cromatografía de intercambio iónico se considera el uso de un sistema automatizado “*Process Chromatography Skid*” ( Apéndice C.1), el Skid cromatográfico es autónomo e incorpora todos los componentes necesarios (bombas, válvulas e instrumentos), armarios de control (neumáticos y eléctricos) y una pantalla táctil desde la que se puede realizar el proceso de cromatografía. Además el equipo cuenta con la función para generar gradiente, necesario para la elución en la cromatografía de intercambio iónico, y se esteriliza en el lugar (*Sterilization in place*).

Cabe destacar que para los procesos cromatográficos, el líquido de las corrientes de proceso de entrada y salida serán acumuladas en recipientes sellados, por medio de mangueras que se conectarán a los equipos cromatográficos, por lo que no existe conexión directa por medio de una bomba con los equipos precedentes y procedentes a las columnas. En la Figura 5.4 se muestra una referencia del Skid de una columna cromatográfica.



Figura 5.4: Skid para una columna cromatográfica.

#### **5.4.2 Cromatografía de intercambio iónico *E. coli*.**

Para el proceso de purificación de rBoIFN- $\alpha$  desde *E. coli*, se seguirán las mismas etapas utilizadas en el proceso de purificación para el proceso con *P. pastoris*.

De la operación anterior de centrifugación (C-2), la corriente de clarificado que contiene la proteína rBoIFN- $\alpha$  soluble será cargada a una columna de intercambio aniónico en una resina Q sepharose Fast Flow. Los valores del número de platos (N) y la altura del lecho (L), son determinados con las mismas ecuaciones utilizadas en la cromatografía de intercambio aniónico de *P. pastoris*.

Cabe destacar que en el diseño de las columnas C-IA finalmente se escoge un diámetro que esté disponible en el mercado y con el cual se mantienen los criterios de escalamiento. En la Tabla 5.18 se muestran el diámetro de columna y las características para la selección de columna cromatográfica en *Escherichia coli*.

Tabla 5.18: Diámetros y características de las columnas VERDKT Ips<sup>2</sup> EasyPack® para *E. coli*.

Diámetro [mm]	Volumen Columna [L]	N° de Cargas	Flujo [L/h]
300	47	2	212
350	63	1	289
400	82	1	377
450	104	1	477

El volumen a tratar por esta etapa corresponde a 126,7 [L], considerando que la columna cromatográfica se carga con un equivalente a 2 VC, en la Tabla 5.18 se ve que con un diámetro de 350 [mm] la cantidad de cargas a la columna es la mínima, igual a 1.

En la Tabla 5.19 se establecen las características de la columna a utilizar de Bio-Rad EasyPack®.

Tabla 5.19: Columna cromatográfica de intercambio aniónico para *E. coli*.

Características proveedor	Altura Calculada [cm]	Volumen [L]	N° Cargas	Número teórico de platos (N)	Caudal [L/h]	
Diámetro columna [mm]	350	65,4	62,922	1	199,4	289

Teniendo en cuenta las mismas consideraciones prácticas que se tienen para la cromatografía en *P. pichia* para *E. coli* se tiene que:

$$t = \frac{L}{v} \cdot CV_{eq} + \frac{L}{v} \cdot CV_{la} + \frac{L}{v} \cdot CV_{el} = \left( \frac{65,4 [cm]}{500 \frac{[cm]}{[h]}} \cdot 5 + \frac{65,4 [cm]}{500 \frac{[cm]}{[h]}} \cdot 5 + \frac{65,4 [cm]}{300 \frac{[cm]}{[h]}} \cdot 10 \right)$$

$$= 3,488 [h]$$

$$t = 3,5 [h]$$



Además, se tiene que el volumen de carga es 2 CV, 125,84 [L] se cargan en 26,12 [min], y considerar que se carga 1 sola vez, en total el tiempo ocupado en cargar la columna es de 26,12 [min].

### **Sistema Cromatográfico E. coli**

#### Cromatografía de Intercambio iónico E. coli

Para la cromatografía de intercambio iónico, se considera el uso de un sistema FlexiPro™. Este es un sistema de procesos cromatográficos para la fabricación de pequeña a escala media en la industria biofarmacéutica. Se utiliza un tablero de PC inalámbrico con software SCADA para ejecutar el proceso de cromatografía y para comunicarse con el PLC. La carcasa está hecha de acero inoxidable y plástico.

Igualmente, el líquido de las corrientes de proceso de entrada y salida serán acumuladas en recipientes sellados, por medio de mangueras que se conectarán a los equipos cromatográficos. En la Figura 5.5 se muestra una referencia del sistema FlexiPro™.



Figura 5.5: Sistema cromatográfico FlexiPro™ para *E. coli*.

## **5.5 ULTRAFILTRACIÓN (UF-1)**

### **5.5.1 Ultrafiltración *Pichia pastoris*.**

En la ultrafiltración el objetivo es la concentración de una solución por lo que la solución retenida es el producto deseado. Considerando el tamaño de la proteína de interés, se pretende utilizar un sistema de ultrafiltración con una membrana de corte de 10 [kDa], esta permitirá retener la proteína rBoIFN- $\alpha$  y reducir el volumen 20 veces.

Dentro de las modalidades y tecnologías que se encuentran disponibles en el mercado, los filtros Pellicon® amplían de forma fácil y fiable desde el laboratorio hasta la planta de producción. Garantizando que cada canal de flujo tiene la misma longitud, altura y promotor de la turbulencia, así como la dirección del flujo, esto mantiene el mismo rendimiento del ultrafiltro en todas las escalas. Esto conduce a la traducción fiable y rápida de los procesos desde el laboratorio a la escala de fabricación. Además, todos los filtros Pellicon® 2 funcionan con la misma caída de presión, velocidad de flujo y perfil de concentración para un escalado lineal rápido y simple. Los Cassettes Pellicon® 2 se encuentran disponibles en varios tamaños de módulos linealmente escalables para procesar volúmenes desde 20 [mL] hasta 10.000 [L].

Ya sea se opere a 0,1 [m<sup>2</sup>] o 100 [m<sup>2</sup>] de área instalada, cada filtro Pellicon® 2, opera a la misma caída de presión, velocidad de flujo y perfil de concentración. En la Tabla 5.20 se muestran las características de los cassettes de ultrafiltración.

Tabla 5.20: Características de cassette Pellicon® 2.

<b>Parámetro</b>	<b>Pellicon® Cassettes con Membrana Ultracel</b>
Flujo recomendado	4 – 8 L/m <sup>2</sup> ·min
Presión/Temperatura	40 psi (2,7 bar)/ 50 °C
Máxima presión inversa	30 psi (2 bar)
Concentración Caustica Máxima	0,5 N NaOH sobre 50 horas
Rango de pH de funcionamiento	2 – 13

El principal parámetro de diseño de un sistema de UF para concentrar una solución es el área necesaria para lograr una concentración determinada en un tiempo dado, bajo limitaciones de rangos de presión y temperatura tolerados por los equipos. Para determinar el área necesaria para tratar el volumen proveniente de la cromatografía de intercambio aniónico (C-IA), se utiliza la Ecuación 5.25.

$$A = \frac{1}{j} \cdot \frac{(V_0 - V)}{\Delta t}$$

Ecuación 5.25

Dónde,

A: Área de filtración, [m<sup>2</sup>].

J: Flux, [L/m<sup>2</sup>·h].

V<sub>0</sub>: Volumen inicial, [L].

V: Volumen final, [L].

T: tiempo, [h].

Como se determinó en el Capítulo 4 (sección 4.1.5 letra c), la corriente de entrada al equipo de ultrafiltración es una corriente de un volumen de 1818,9 [L], que contiene 626,3 [g rBoIFN-α], suponiendo una densidad igual a la del agua, se tendría una corriente con 0,034 % p/p de rBoIFN-α en solución. Luego, comparando este dato con el gráfico proporcionado por Millipore (2014) (Apendice B.1), se puede estimar un flux de 100 [L/m<sup>2</sup>·h].

Luego, el volumen inicial de 1818,9 [L] se reducirá 20 veces obteniéndose un volumen final de 90,945[L], además diseñando para realizar la operación en 2 [h], se reemplazan los valores en la Ecuación 5.25.

$$A = \frac{1}{100 \left[ \frac{L}{m^2 \cdot h} \right]} \cdot \frac{\left( 1818,9 - \frac{1818,9}{20} \right)}{2 [h]} = 8,639 \sim 10 [m^2]$$

De esta forma se obtiene que el área requerida es de 10 [m<sup>2</sup>]; así, el módulo cassette escogido es el de mayor área, de 2,5 [m<sup>2</sup>], y la membrana escogida es la Biomax-10, una membrana de corte de 10 [kDa] con un coeficiente de retención de 99%. En la Tabla 5.21 se encuentran las características de los Cassettes proporcionadas por Millipore® para la operación en *P. pastoris* mientras que en la Figura 5.6 se muestran las partes del equipo de ultrafiltración.

Tabla 5.21: Características módulo de ultrafiltración en *P. pastoris*. (Millipore, 2004)

Característica	Descripción
Módulo*	Cassette
Modelo*	Pellicon 2 Serie Biomax 30
Membrana*	Polietersulfona Modificada
Área de filtración por cassette*	2,5 [m <sup>2</sup> ]
Cantidad de módulos	4
Tiempo	103,67 [min] (1,727 [h])

\*Datos obtenidos de (Millipore,2004)



Figura 5.6: Equipos Pellicon. (Izq.) Cassette Pellicon® 2 (Der.) Soporte (holder) para cassette Pellicon.

El equipo Pellicon ® incorpora una bomba peristáltica que permitirá el flujo adecuado de entrada al equipo de ultrafiltración.

### 5.5.2 Ultrafiltración *Escherichia coli*

En esta etapa se busca reducir el volumen de la solución a un 10% de su volumen de entrada. Como ya se mencionó anteriormente, la concentración se llevará a cabo en Cassettes con membrana de la marca Pellicon®.

Para determinar el área necesaria para tratar el volumen proveniente de la cromatografía de intercambio aniónico (C-IA), correspondiente a 86,7 [L], se utiliza la Ecuación 5.25.

$$A = \frac{1}{100 \left[ \frac{L}{m^2 \cdot h} \right]} \cdot \frac{\left( 86,7 - \frac{86,7}{10} \right)}{0,5 [h]} = 1,6 [m^2]$$

La membrana Biomax-10 es una membrana de corte e 10 [kDa] con un coeficiente de retención de 99%. Además el módulo de cassette elegido es el de mayor área, de 2,5 [m<sup>2</sup>], por lo que ecalculamos el tiempo de la etapa de ultrafiltración.

$$t = \frac{1}{100 \left[ \frac{L}{m^2 \cdot h} \right]} \cdot \frac{\left( 86,7 - \frac{86,7}{10} \right)}{2,5 [m^2]} = 0,31 [h] \sim 18,73 [min]$$

En la Tabla 5.22 se muestran las características del módulo de ultrafiltración para *E. coli*.

Tabla 5.22: Características módulo de ultrafiltración en *E. coli*. (Millipore, 2004).

Característica	Descripción
Módulo	Cassette
Modelo	Pellicon 2 Serie Biomax 10
Membrana	Polietersulfona Modificada
Área de filtración por cassette	2,5 [m <sup>2</sup> ]
Cantidad de módulos	1
Tiempo	18,73 [min]

## 5.6 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (C-EM)

### 5.6.1 Cromatografía *Pichia pastoris*.

Al igual que en la etapa de cromatografía por intercambio aniónico, para el diseño de la columna cromatográfica SEC se utiliza la Teoría Combinada para determinar las dimensiones de la columna. En la Tabla 5.23 se presentan las consideraciones prácticas para la separación.

Tabla 5.23: Consideraciones prácticas para cromatografía de exclusión molecular.

Etapa	Parámetro	Rango deseado
Todas las etapas	pH	3 – 12
Etapa Equilibrado	Volumen	2 CV
	Velocidad de flujo	50 cm/h
Etapa Elución	Volumen inicial	1 CV
	Velocidad de flujo	30 cm/h

Considerando que para que haya una alta resolución en el fraccionamiento en la cromatografía de exclusión molecular, se debe cargar un volumen de muestra de 0,5-4% del volumen de la columna cromatográfica (Amersham Bioscience, 2002). De acuerdo al protocolo de purificación seguido por Shi et al., 2007, se recomienda la utilización de Superdex 75, esta matriz combina las excelentes propiedades SEC del dextrano reticulado con las estabilidades físicas y químicas de la agarosa altamente reticulada, para producir un medio de separación con una selectividad excepcional y una alta resolución. Además, su baja interacción inespecífica permite una alta recuperación del material biológico. Juntas, estas propiedades hacen de Superdex 75 una excelente elección para todas las aplicaciones, desde escala de laboratorio hasta escala de proceso. En la Tabla 5.24 se muestran los datos para el diseño de la columna cromatográfica en *P. pastoris*.

Tabla 5.24: Datos para el diseño de la columna de exclusión molecular Superdex™ 75 en *P. pastoris*.

Parámetro	Símbolo	Dato	Fuente
Diámetro partícula gel [ $\mu\text{m}$ ]	Dp	34	(Pyle, 1990)
Velocidad superficial [cm/h]	V	10 – 50	(Amersham Bioscience, 1997)
Densidad agua [ $\text{kg}/\text{m}^3$ ]	P	1.000	-
Viscosidad agua [ $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ]	$\mu$	0,001	-
Coefficiente de difusividad [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ]	D	$1,026 \times 10^{-6}$	(Polson, 1950)
Fracción de vacío	$\epsilon$	0,35	(Amersham Bioscience, 1997)

Utilizando las ecuaciones desarrolladas en la cromatografía de intercambio aniónico y a través del cromatograma SEC del apéndice A.2, se obtiene un largo de lecho de 25,4 [cm].

Para escoger qué columna es adecuada para el proceso, se utilizan los mismos criterios de escalamiento mencionados en el diseño de la cromatografía de intercambio iónico. Las columnas IsoPak® de Merck proveen un empaquetamiento rápido, más limpio y más reproducible para procesos de purificación; se encuentran disponibles en un amplio rango de diámetros incluyendo los mencionados en la Tabla 5.25, todas las dimensiones se encuentran disponibles en alturas de cama que van desde 50 a 500 [mm] o de 500 a 1000 [mm].

Tabla 5.25: Diámetros y características para columnas IsoPak® Merck en *P. pastoris*.

Diámetro [mm]	Volúmen de Columna [L]	N° Cargas	Caudal [L/h]
440	39	59	45,6
630	80	29	93,5
800	128	18	151
1000	200	12	236

Tabla 5.26: Tabla comparativa de razones v/L a distintas escalas.

Escala	Razón v/L
Escala Laboratorio	0,9
Escala producción	1,2

Finalmente, en la Tabla 5.27 se establecen las características de la columna elegida de diámetro 1000 [mm].

Tabla 5.27: Columna cromatográfica de exclusión molecular para *P. pastoris*.

Características proveedor	Altura Calculada [cm]	Nº Cargas	Número teórico de platos (N)	Caudal [L/h]	
Diámetro columna [mm]	1000	25,4	12	915,8	236

Entonces, el volumen de la columna de cromatografía de exclusión molecular es de 199,5 [L].

Luego, para determinar el tiempo total de la cromatografía.

$$t = \frac{L}{v} \cdot CV_{eq} + \frac{L}{v} \cdot CV_{el} = \left( \frac{25,4 \text{ [cm]}}{50 \left[ \frac{\text{cm}}{\text{h}} \right]} \cdot 2 \cdot \frac{25,4 \text{ [cm]}}{30 \left[ \frac{\text{cm}}{\text{h}} \right]} \cdot 1 \right) \cdot 12 = 10,32 \text{ [h]}$$

Además, el volumen de carga es de 7,98 [L], por lo que a un flujo de 236 [L/h] el tiempo de carga de la muestra a la columna resulta en 2 [min] por carga, considerando el total de cargas, el tiempo total de cargado resulta en 24,1 [min].

### 5.6.2 Cromatografía de Exclusión Molecular *Escherichia coli*.

Tal como se ha mencionado anteriormente, se empleará la teoría combinada para calcular las dimensiones de la columna considerando los datos proporcionados por el protocolo de la filtración en gel (Amersham Bioscience, 2002).

Cabe destacar que en el diseño de las columnas C-EM finalmente se escoge un diámetro que esté disponible en el mercado y con el cual se mantienen los criterios de escalamiento. Las columnas escogidas corresponden columnas cromatográficas IsoPak® de Merck.



Tabla 5.28: Diámetros y características para columnas IsoPak® Merck en *E. coli*.

Diámetro [mm]	Volumen Columna [L]	N° de cargas	Flujo [L/h]
440	39	6	45,6
630	80	3	93,5
800	128	2	151
1000	200	2	236

En este tipo de cromatografía los volúmenes de carga son bastantes restringidos, generalmente entre 0,2 – 4%. Por lo que, considerando que el volumen total de la columna es 128 [L], el volumen de carga será de 5,1 [L]. Finalmente la cantidad de cargas a realizar, para tratar el total del volumen proveniente de la etapa de ultrafiltración, es de 2. En la Tabla 5.29 se resumen las características de la columna.

Tabla 5.29: Columna cromatográfica de exclusión molecular para *E. coli*.

Características proveedor	Altura Calculada [cm]	Volumen [L]	N° Cargas	Número teórico de platos (N)	Caudal [L/h]	
Diámetro columna [mm]	800	25,4	127,67	2	915,8	251

Luego, el tiempo de la etapa de cromatografía de exclusión molecular, se determina de la siguiente manera:

$$t = \frac{L}{v} \cdot CV_{eq} + \frac{L}{v} \cdot CV_{el} = \left( \frac{25,4 [cm]}{50 \left[ \frac{cm}{h} \right]} \cdot 2 + \frac{25,4 [cm]}{30 \left[ \frac{cm}{h} \right]} \cdot 1 \right) \cdot 2 = 3,72 [h]$$

Como el volumen de carga es de 6,38 [L], a un flujo de 251 [L/h], el tiempo de carga de la muestra a la columna resulta en 3,1 [min], por 2 cargas, es un tiempo de 6,2 minutos.

### 5.6.3 Sistema Cromatográfico EM

Para la etapa de cromatografía por exclusión molecular (SEC) para el proceso con *E. coli* y *P. pastoris* se considera el uso de un sistema “*Slurry Transfer Skid*” que incorpora bombas y válvulas para transferir el fluido a y desde la columna. Las válvulas de deslizamiento se accionan neumáticamente y el uso de la pantalla táctil proporciona una solución sencilla y confiable para el embalaje, desembalaje y operaciones CIP.

Otra consideración, es que al igual que para la cromatografía de intercambio iónico, se operará de tal forma que no existe conexión directa por medio de una bomba con las columnas cromatográficas y las operaciones que preceden y proceden. Igualmente, el líquido de interés será acumulado en recipientes sellados, por medio de mangueras que luego serán conectadas a los equipos cromatográficos. En la Figura 5.7 se muestra una referencia del Skid del sistema cromatográfico de exclusión molecular.



Figura 5.7: Skid cromatográfico de cromatografía de exclusión molecular.

### 5.6.4 Resumen etapa de purificación

#### Etapa de Recuperación y Purificación para *P. pastoris*

En la Tabla 5.30 se presentan los volúmenes de los flujos de entrada y salida de cada una de las etapas de recuperación y purificación de la proteína de interés, y los

tiempos de duración de cada etapa, de acuerdo a lo calculado en el diseño de los equipos.

Tabla 5.30: Resumen de flujos en operaciones de recuperación y purificación en *P. pastoris*.

<b>Etapa</b>	<b>Volumen de entrada [L]</b>	<b>Volumen de Salida [L]</b>	<b>Duración</b>
C	2728,2	2591,8	60 [min]
C-IA	2643,6	1818,9	10,46 [h]
UF	1818,9	90,95	104 [min]
C-EM	90,95	90,95	10,32 [h]

### **Etapa de Recuperación y Purificación para *E. coli***

En la Tabla 5.31 se presentan los volúmenes asociados a las operaciones de purificación.

Tabla 5.31: Resumen de flujos en operaciones de recuperación y purificación en *E. coli*.

<b>Etapa</b>	<b>Volumen de entrada [L]</b>	<b>Volumen de salida [L]</b>	<b>Duración</b>
C-1	200	20	60 [min]
HO-1	40	40	60 [min]
C-2	135	10,8	60 [min]
C-IA	126,7	86,7	3,5 [h]
UF	86,7	8,67	18,73 [min]
C-EM	8,67	8,67	3,72 [h]

## **5.7 ESTANQUES**

De acuerdo a lo expresado en el Capítulo 4 en *Pichia* se preparará medio de cultivo para un lote productivo, mientras que en el caso de *E. coli* se preparará medio de suficiente para dos lotes, es decir, en ambos casos se prepararán los medios una vez a la semana. Además, se considerará un factor de seguridad del 20% sobre el volumen de medio a preparar para el diseño del estanque.

El diseño se basa en determinadas relaciones geométricas, similar al caso de los fermentadores (ver Figura 5.8), tal como se aprecia en la Tabla 5.32 (Acevedo, 2002; Doran, 2013).

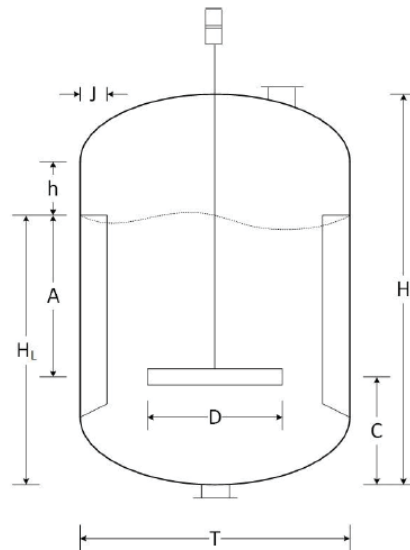


Figura 5.8: Esquema de diseño de mezcladores. (Doran, 1998)

Tabla 5.32: Relaciones recomendadas. (Doran, Bioprocess Engineering Principles, 2013) (Acevedo, 2002).

Razón	Valor
$h/H_L$	0,2
$H_L/T$	1
$J/T$	0,1
$C/T$	0,33
$A/D$	1,15
$D/T$	0,33

Luego, con la Ecuación 5.26 se determina el diámetro que debe tener el tanque.

$$V_{\text{útil}} = V_{\text{cilindro}} = \pi \cdot \frac{T^2}{4} \cdot H$$

Ecuación 5.26

Una vez determinado el diámetro del estanque, las demás dimensiones quedan determinadas de acuerdo a lo expresado en la Tabla 5.32.

### 5.7.1 Estanques de medio de cultivo

En la Tabla 5.33 se muestran los diseños de los estanques para *E. coli*, cuya numeración va desde el E-2 hasta el E-4. Los estanques de *Pichia* se muestran en la Tabla 5.34 y van desde el E-2 hasta el E-6.

Tabla 5.33: Dimensiones estanques de medio de cultivo y alimentación *E. coli*.

Parámetro	E-2	E-3	E-4
V [L]	118	175	23
T [m]	0,53	0,61	0,31
H <sub>L</sub> [m]	0,53	0,61	0,31
J [m]	0,05	0,06	0,03
C [m]	0,18	0,20	0,10
A [m]	0,20	0,23	0,12
D [m]	0,18	0,20	0,10
H [m]	0,53	0,61	0,31

Tabla 5.34: Dimensiones estanques de medio de cultivo y alimentación *P. pastoris*.

Parámetro	E-2	E-3	E-4	E-5	E-6
V [L]	200	1.023	161	3.491	3.491
T [m]	0,63	1,09	0,59	1,64	1,64
H <sub>L</sub> [m]	0,63	1,09	0,59	1,64	1,64
J [m]	0,06	0,11	0,06	0,16	0,16
C [m]	0,21	0,36	0,19	0,54	0,54
A [m]	0,24	0,41	0,22	0,62	0,62
D [m]	0,21	0,36	0,19	0,54	0,54
H [m]	0,63	1,09	0,59	1,64	1,64

### 5.7.2 Estanques de buffer

En esta sección se muestran los diseños de los estanques destinados a la preparación y almacenamiento de buffer, así como también aquellos en los que el buffer se mezcla con otra corriente. En la Tabla 5.35 se muestran los diseños de los estanques de *E. coli*, y en la Tabla 5.36 los de *P. pastoris*.

Tabla 5.35: Dimensiones estanques de buffer en *E. coli*.

Parámetro	E-5	E-6	E-7	E-8	E-10
V [L]	50	162	150	1.547	587
T [m]	0,40	0,59	0,58	1,25	0,91
H <sub>L</sub> [m]	0,40	0,59	0,58	1,25	0,91
J [m]	0,04	0,06	0,06	0,13	0,09
C [m]	0,13	0,19	0,19	0,41	0,30
A [m]	0,15	0,22	0,22	0,48	0,34
D [m]	0,13	0,19	0,19	0,41	0,30
H [m]	0,40	0,59	0,58	1,25	0,91

Tabla 5.36: Dimensiones estanques de buffer en *P. pastoris*.

Parámetro	E-7	E-8	E-9
V [L]	3.235	10.273	599
T [m]	1,60	2,36	0,91
HL [m]	1,60	2,36	0,91
J [m]	0,16	0,24	0,09
C [m]	0,53	0,78	0,30
A [m]	0,61	0,89	0,35
D [m]	0,53	0,78	0,30
H [m]	1,60	2,36	0,91

### 5.7.3 Estanques de retención y almacenamiento de agua

Por último, se detallan los estanques destinados a retención en diferentes partes del proceso, y también los estanques destinados a almacenamiento de agua tipo I. En la Tabla 5.37 se muestran las dimensiones de los estanques de *E. coli* y en la Tabla 5.38 los de *P. pastoris*.

Tabla 5.37: Dimensiones estanques de retención en *E. coli*.

Parámetro	E-9	E-11
V [L]	10	10
T [m]	0,23	0,23
HL [m]	0,23	0,23
J [m]	0,02	0,02
C [m]	0,08	0,08
A [m]	0,09	0,09
D [m]	0,08	0,08
H [m]	0,23	0,23

Tabla 5. 38: Dimensiones estanques de retención en *P. pastoris*.

Parámetro	E-9	E-10	E-12
V [L]	2.183	109	109
T [m]	1,41	0,52	0,52
HL [m]	1,41	0,52	0,52
J [m]	0,14	0,05	0,05
C [m]	0,46	0,17	0,17
A [m]	0,53	0,20	0,20
D [m]	0,46	0,17	0,17
H [m]	1,41	0,52	0,52

#### 5.7.4 Requerimientos de Agitación

Para asegurar un correcto y homogéneo mezclado de los compuestos en la solución, se debe proporcionar un sistema de agitación al tanque de mezcla. Para asegurar esto, se requiere que el régimen de mezcla sea turbulento (ver Ecuación 5.27).

$$Re = \frac{N_i \cdot D^2 \cdot \rho}{\mu}$$

Ecuación 5.27

Dónde,

Re: Número de Reynolds. Asumir  $10^4$  para asegurar un flujo turbulento.

$N_i$ : Velocidad de agitación, [rps].

D: Diámetro del impulsor, [m].

$\rho$ : Densidad del agua, 1000 [kg/m<sup>3</sup>].

$\mu$ : Viscosidad del agua,  $10^{-3}$  [kg/m/s].

Al asumir un Reynolds de  $10^4$  se puede despejar de la Ecuación 5.27 la velocidad mínima de agitación  $N_i$  que garantice un régimen de flujo turbulento en el estanque.

Por ejemplo, calculando la velocidad de agitación que debe tener el estanque E-2 de preparación de medio en *E. coli*, se tiene lo siguiente:

$$\frac{\mu \cdot Re}{\rho \cdot D^2} = N_i = \frac{0,001 \left[ \frac{kg}{m \cdot s} \right] \cdot 60 \left[ \frac{s}{min} \right] \cdot 10000}{1000 \left[ \frac{kg}{m^3} \right] \cdot 0,53^2} = 2,14 [rpm]$$

Luego, la potencia utilizada por el impulsor queda determinada por la Ecuación 5.28.

$$P = N_p \cdot \rho \cdot D^5 \cdot N_i^3$$

Ecuación 5.28

Dónde,

P: Potencia de agitación, [kW].

$N_p$ : Número de potencia para impulsor de paletas inclinadas 45°; 1,64.

Para el caso del estanque E-2 de más arriba, la potencia requerida sería 40 [W].

Al diseñar la potencia de agitación con estas ecuaciones es posible apreciar que cada estanque necesita pocas rpm para lograr un régimen de flujo turbulento, por ello es preferible establecer una velocidad de agitación fija para todos los estanques por igual. En este caso se optó por elegir 60 [rpm] en *E. coli*, y 27 [rpm] en *P. pastoris* como velocidad de agitación, con el objetivo de equiparar los consumos energéticos anuales, sin sacrificar calidad de mezclado. Con estas velocidades el flujo es turbulento en todos los estanques.

Por otro lado, el tiempo mínimo de mezcla, es decir, la cantidad de tiempo que debe agitarse la solución para que se produzca un mezclado homogéneo de los componentes, se puede determinar por medio de la Ecuación 5.29.



$$t_m = \frac{5,4}{N_i} \cdot \left(\frac{1}{N_p}\right)^{\frac{1}{3}} \cdot \left(\frac{T}{D}\right)^2$$

Ecuación 5.29

Continuando con el estanque E-2, pero a 60 rpm se tiene el siguiente tiempo de mezcla:

$$t_m = \left(\frac{5,4}{1 \left[\frac{1}{s}\right]}\right) \cdot \left(\frac{1}{1,64}\right)^{\frac{1}{3}} \cdot \left(\frac{0,53[m]}{0,18[m]}\right)^2 = 39,7 [s]$$

Esto significa que un tiempo de mezclado de 39,7 segundos sería suficiente, sin embargo, se ha optado por mantener el tiempo mínimo de mezcla en 1 minuto para los estanques que contemplen agitación.

Por lo tanto, las condiciones agitación y potencia de los estanques se resumen en la Tabla 5.39.

Tabla 5.39: Condiciones de agitación y potencia para los estanques de *E. coli* y *P. pastoris*.

Parámetro	Valor <i>E. coli</i>	Valor <i>P. pastoris</i>
Velocidad de Agitación	60 [rpm]	27 [rpm]
Potencia total	27,12 [kW]	68,46 [kW]
Tiempo de mezcla	1 [min]	1 [min]
Consumo anual	45,37 [kWh/año]	45,54 [kWh/año]

## 5.8 EQUIPOS AUXILIARES

### 5.8.1 Sistema de purificación de agua

La U.S. Pharmaceutical Convention (USP) es una organización que establece estándares de calidad, pureza, identidad, y potencia de medicamentos, ingredientes alimenticios y suplementos dietarios fabricados, distribuidos y consumidos en todo el mundo. En Estados Unidos la FDA es el organismo encargado de hacer cumplir los estándares que establece esta organización, los cuales son replicados en más de 140 países.

La USP establece tipos de agua con el objetivo de diferenciar características y tratamientos que se deben aplicar al agua potable dependiendo del uso que se le vaya a dar. En el caso de la industria farmacéutica se distinguen dos tipos de agua: el agua purificada (PW), y el agua altamente purificada (WFI). Según los estándares de la American Society for Testing and Materials (ASTM), otra organización que establece estándares, estas aguas entrarían en la denominación de Agua Tipo I (la WFI), y Agua Tipo II (la PW). El agua tipo I se utiliza como excipiente en la producción de inyectables y su preparación, mientras que el agua tipo II se utiliza para el lavado de equipos y preparación de soluciones buffer.

Con el objetivo de disponer de las cantidades necesarias de agua para el proceso productivo, existen en el mercado equipos capaces de producir estos tipos de agua. El sistema de purificación Milli-Q® Integral de Millipore (ver Figura 5.9) es capaz de producir hasta 2880 [L/d] de ambos tipos de agua.



Figura 5. 9: Sistema de purificación de agua Milli-Q® Integral

En el caso de *E. coli* es necesario disponer de aproximadamente 4000 litros de agua tipo I a la semana para producción de medios de cultivo, alimentación e inducción, y soluciones buffer. Por otro lado, el proceso de *P. pastoris* requiere cerca de 14.500 litros semanales de este mismo tipo de agua con la misma finalidad. Por esto, el equipo Milli-Q® resulta adecuado para los requerimientos de agua.

El almacenamiento de esta agua, en ambos procesos, se realiza en los estanques diseñados en la sección 5.7, los cuales no llevan agitación y llevan por nombre E-1 en los dos procesos productivos.

### 5.8.2 Caldera

El diseño de la caldera queda determinado por el flujo máximo de vapor que se necesita en el proceso de esterilización de los fermentadores. En el caso de ambos procesos los fermentadores que requieren del mayor flujo de vapor son los de producción. Por lo tanto, los requerimientos que deben tener las calderas asociadas a cada proceso se detallan en la Tabla 5.40.

Tabla 5.40: Diseño de calderas.

Parámetro	<i>P. pastoris</i>	<i>E. coli</i>
Capacidad caldera [kg/h]	34,2	6,0

Este equipo es necesario para generar el vapor requerido en los procesos de esterilización. Para generar calor es necesario un combustible, en este caso se opta por el Diesel N°6 de 12,6 °API. La cantidad de combustible requerido se puede calcular por la Ecuación 5.30.

$$C \cdot LHV = \frac{V \cdot (Cp_{agua_s} \cdot T_v - Cp_{agua} \cdot T_{agua_e} + \lambda_v)}{\eta}$$

Ecuación 5.30

Dónde;

C: masa de combustible requerida, [kg/h].

LHV: Poder calorífico interno del combustible, 41.552,5 [kJ/kg].

V: Masa de vapor que se requiere producir, [kg/h].

Cp<sub>agua<sub>s</sub></sub>: Capacidad calorífica del agua a la temperatura del vapor, 2,08 [kJ/kg°C].

Cp<sub>agua<sub>e</sub></sub>: Capacidad calorífica del agua a la temperatura de entrada, 4,180[kJ/kg°C]

$T_v$ : Temperatura del vapor de salida de la caldera, 121 [°C].

$T_{aguae}$ : Temperatura del agua a la entrada de la caldera, 21 [°C].

$\lambda_v$ : Calor latente de vaporización del agua a la temperatura del vapor, 2.200,5 [kJ/kg].

$\eta$ : Eficiencia de transmisión de calor de la caldera (92%).

Ejemplo de cálculo:

$$C \cdot 41.552,5 \left[ \frac{kJ}{kg} \right] = \frac{34,2 \left[ \frac{kg}{h} \right] \cdot \left( 2,08 \left[ \frac{kJ}{kg \cdot ^\circ C} \right] \cdot 121 [^\circ C] - 4,180 \left[ \frac{kJ}{kg \cdot ^\circ C} \right] \cdot 21 [^\circ C] + 2.200,5 \left[ \frac{kJ}{kg} \right] \right)}{0,92}$$

$$C = 2,12 \left[ \frac{kg}{h} \right]$$

La cantidad de combustible para cada caldera se detalla en la Tabla 5.41.

Tabla 5.41: Cantidad de combustible para calderas.

	Vapor [kg/h]	Combustible [kg/h]	Combustible [kg]	Combustible [kg/Año]
Proceso <i>P. pastoris</i>	34,2	2,1	4,77	243,27
Proceso <i>E. coli</i>	6	0,37	0,52	53,04

### 5.8.3 Bombas

Una de las partes más relevantes de un proceso es la correcta elección de las bombas, las cuales son las responsables de incrementar la energía mecánica sobre los fluidos, y con ello, ejercer las funciones de transporte del mismo en las distintas etapas del proceso. La elección de una bomba obedece a una serie de pasos que deben realizarse de modo que se pueda determinar la potencia que requiere tener el equipo para movilizar el fluido entre dos puntos claramente establecidos en el espacio.

Las bombas más comunes a nivel industrial son las centrifugas y las de desplazamiento positivo. Las primeras funcionan bajo el principio de otorgar energía al

fluido gracias a las altas velocidades de rotación que ejerce un motor eléctrico, mientras que las segundas aplican presión directamente sobre el fluido por medio de un pistón recíprocante (McCabe et al., 2007). En el presente proyecto se ha optado por utilizar bombas centrífugas debido a que la densidad del fluido es muy cercana a la del agua, y cumple con las características de un fluido newtoniano. Además, existe una amplia oferta de productos de este tipo diseñados exclusivamente para transporte de fluidos que requieran de altos estándares de higiene.

Antes de describir los pasos para el diseño de una bomba, hay que mencionar que tanto el proceso de *E. coli* como el de *P. pastoris*, debido a su alto grado de similitud en cuanto a etapas, requieren ambos de la misma cantidad de bombas y en las mismas etapas. Debido a que ciertos equipos incluyen bombas, no se considerará el diseño de éstas para los siguientes equipos: fermentadores, centrífugas, homogenizador, columnas cromatográficas, ultrafiltros. Por lo tanto, en ambos procesos, el diseño estará centrado en las bombas que transportan el fluido desde el equipo de purificación de agua hasta el estanque de almacenamiento de agua tipo I. Transporte de agua tipo I desde el estanque de almacenamiento hacia los estanques de preparación de medios de cultivo. Transporte de medios de cultivo desde sus estanques a través del microfiltro de esterilización hasta los otros estanques de almacenamiento de medios. Transporte de medios de cultivo desde sus estanques de almacenamiento hacia los fermentadores. Y por último, transporte de agua tipo I desde su estanque de almacenamiento hasta los fermentadores.

En la Tabla 5.42 se resume de una manera más clara y precisa el transporte que realiza cada bomba.

Tabla 5.42: Transporte de fluidos que realizan las bombas.

Bomba	<i>E. coli</i>		<i>P. pastoris</i>	
	Desde	Hasta	Desde	Hasta
B-1	W-1	E-1	W-1	E-1
B-2	E-1	E-2; E-3; E-4	W-1	E-2; E-3; E-4; E-5
B-3	E-2	FP1; FP2; FU	E-5	E-6
B-4	E-3; E-4	FU	E-2; E-3; E-4; E-6	FP1; FP2; FU
B-5	W-1	FP1; FP2; FU	W-1	FP1; FP2; FU

En cuanto al proceso de diseño, a continuación se describe en detalle, pero antes es necesario mencionar que algunas bombas, como por ejemplo B-2, que transporta el

fluido hacia más de un equipo, su diseño se consideró en base a la línea de tuberías que fuera más larga y que considerara más accesorios. De este modo, la determinación de potencia alcanza con creces para el resto de equipos a los cuales la bomba suministra fluido.

Continuando con el diseño de la bomba, en base al caudal previamente determinado de acuerdo a los requerimientos del proceso, se debe seleccionar un diámetro adecuado de cañería de acuerdo al Figura D.1 (ver apéndice D.1). En *E. coli*, debido a los bajos flujos que se requieren, la totalidad de las cañerías es de ¼', mientras que en *P. pastoris* sólo las bombas B-2, B-4, y B-5 están conectadas a ½' y el resto utiliza cañerías de ¼'.

El largo equivalente de cada accesorio se puede determinar de la Figura D.2 (ver apéndice D.1) conociendo el diámetro de la tubería. Los datos se resumen en la Tabla 5.43.

Tabla 5.43: Largos equivalentes para diferentes accesorios del proceso.

Accesorio	Largo equivalente [pie]	
	Tubería 1/4'	Tubería 1/2'
Codo 90°	2,5	3,5
Válvula de cierre	9,5	16
Racor en T	2	3

A continuación se detalla el ejemplo de cálculo para la bomba B-1 de *P. pastoris*.

En la Tabla 5.44 se encuentran los accesorios considerados en la línea de la bomba, así como también el largo total de la cañería.

Tabla 5.44: Accesorios y largo equivalente de B-1 en *P. pastoris*.

Accesorio	Cantidad	Largo equivalente [pie]
Codo 90°	3	7,5
Válvula de cierre	1	9,5
Racor en T	0	0
Tubería 1/4'	-	30,5
<b>Longitud equivalente total [pie]</b>		<b>47,5</b>

Luego, se determina la presión de descarga, según la Ecuación 5.31.

$$hd = P_2 - P_1$$

Ecuación 5.31

Dónde,

$P_1$ : Presión de salida en la línea de descarga, [atm].

$P_2$ : Presión de entrada en la línea de succión, [atm].

Se asume que los equipos y estanques desde los cuales se succiona fluido y hacia los cuales se descarga, están a la misma presión, y es presión atmosférica.

Luego, se debe determinar la altura geométrica ( $hg$ ), utilizando la Ecuación 5.32.

$$hg = Z_2 - Z_1$$

Ecuación 5.32

Dónde,

$Z_1$ : altura de succión, 0 [pie].

$Z_2$ : altura de descarga, 9,05 [pie].

Por lo que,

$$hg = 9,05 \text{ [pie]}$$

A continuación se determinan las pérdidas por fricción ( $h_{fu}$ ), utilizando para ello la Ecuación 5.33.

$$hfu = 0,002083 \cdot (\text{long. eq. total.}) \cdot \left(\frac{100}{C}\right)^{1,85} \cdot \left(\frac{GPM^{1,85}}{d_{in}^{4,8655}}\right) \cdot \rho$$

Ecuación 5.33

Dónde,

C = 100.

GMP: Flujo, 0,53 [gal/min].

$d_{in}$ : diámetro de tubería, 0,25 [pulg].

$\rho$ : densidad del fluido, 62,4 [lb/pie<sup>3</sup>].

Resultando,

$$hfu = 1620,62$$

Luego se obtienen las pérdidas en válvulas de control (hvc), según la Ecuación 5.34.

$$hvc = \left(\frac{\Delta P}{\rho}\right) \cdot \left(\frac{g}{g_c}\right)$$

Ecuación 5.34

Dónde,

$\Delta P$ : 1.

(g/g<sub>c</sub>): 1.



Resultando,

$$hvc = 0,0160 \text{ [pie]}$$

Luego, las pérdidas por fricción totales (hft) se determinan con la Ecuación 5.35.

$$hft = \frac{(hfu) \cdot (long.eq.total)}{100}$$

Ecuación 5.35

Resultando,

$$hft = 769,79 \text{ [pie]}$$

Luego se determina la Carga Dinámica Total (CDT) con la Ecuación 5.36.

$$CDT = hd + hg + hft + hvc$$

Ecuación 5.36

Obteniendo,

$$CDT = 778,86 \text{ [pie]}$$

Y finalmente, se determina la potencia de bombeo (HP) con la Ecuación 5.37

$$HP = \frac{(GPM) \cdot (CDT)(\gamma)}{(3690) \cdot (\eta)}$$

Ecuación 5.37

Dónde,

$\Gamma$ : 1.

$\eta$ : Eficiencia de la bomba, 0,6.

Dando como resultado una bomba de 0,17 [HP] capaz de transportar el agua desde el equipo W-1 hasta el estanque E-1.

El mismo procedimiento se repite para todas las demás bombas, y los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 5.45.

Tabla 5.45: Potencia requerida para las bombas de los procesos de *E. coli* y *P. pastoris*.

	E. coli					P. pastoris				
	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5
N° codos	3	4	4	5	4	3	4	4	4	3
N° racor T	0	2	2	2	0	0	3	4	5	2
N° válvulas	1	1	2	1	1	1	1	3	2	1
L cañerías [pie]	33.80	17.40	14.10	47.90	53.20	30.50	42.70	27.20	85.30	102.00
L equivalente total [pie]	50.80	40.90	47.10	73.90	72.70	47.50	81.70	73.70	146.30	134.50
Flujo [gpm]	0.53	0.79	0.45	0.79	0.79	0.53	5.80	1.07	5.80	5.80
hg [pie]	4.92	2.30	2.30	6.90	6.90	9.05	5.58	5.58	9.84	9.84
hfu	1733.69	2920.99	1187.57	5277.78	5192.08	1620.62	7999.06	9223.67	14323.90	13168.59
hvc [pie]	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
hft [pie]	880.71	1194.69	559.35	3900.28	3774.64	769.79	6535.23	6797.85	20955.86	17711.75
CDT [pie]	885.65	1197.00	561.66	3907.20	3781.56	778.86	6540.83	6803.44	20965.72	17721.61
<b>Potencia bomba [HP]</b>	<b>0.20</b>	<b>0.40</b>	<b>0.11</b>	<b>1.30</b>	<b>0.95</b>	<b>0.17</b>	<b>0.69</b>	<b>0.72</b>	<b>4.41</b>	<b>3.73</b>

## 5.9 FORMULACIÓN Y ENVASADO

Antes de realizar la etapa de formulación y posterior envasado del producto, se deben llevar a cabo diversos test en muestras tomadas, donde se debe corroborar la conformidad del producto con sus especificaciones y requerimientos. Luego el producto se esteriliza por medio de filtros de 0,22  $\mu\text{g}$  debido a que éstos han probado ser efectivos en la producción de interferón alfa; luego el envasado se realiza mediante

equipos dosificadores altamente automatizados en ampollas de vidrio estériles. Para lograr una estabilidad de larga duración, los recipientes son llevados a un liofilizador.

El mantener el producto en un estado sólido retrasa las reacciones de degradación de las proteínas, debido a la disminución en el contenido de agua. No obstante, el someter a la proteína a procesos de liofilización puede desnaturalizarla, por ende, se necesita de excipientes encargados de otorgar una mayor estabilidad.

### 5.10 MICROFILTROS DE ESTERILIZACIÓN DE MEDIOS

Dadas las características inflamables que posee el metanol, es que se ha optado por esterilizar las soluciones de estos nutrientes mediante una etapa de microfiltración.

Los tamaños de poro son variados, sin embargo, un tamaño de poro mayor a 0,1  $\mu\text{m}$  podría permitir el paso de partículas virales provocando así la contaminación del medio.

Se ha optado por utilizar una cápsula de filtración con membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrofílico de 0,1  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. El modelo Durapore® Opticap XL marca Millipore es idóneo para la filtración de productos de la industria biofarmacéutica (Merck, Millipore, 2012).

Las cápsulas de microfiltración se venden en modelos XL2, XL4, XL5, XL10 las cuales poseen diferentes áreas de filtración. Se ha determinado utilizar el modelo XL4 en *P. pastoris*.

En la Tabla 5.46 se presentan las características de las cápsulas de filtración.

Tabla 5.46: Características de la cápsula de filtración Opticap® XL4 para *P.pastoris*.

Parámetro	Opticap®XL4
Membrana	PVDF Hidrofílico
Largo máximo [cm]	19,6
Diámetro [cm]	8,4
Área de filtración [m <sup>2</sup> ]	0,19

Para conocer el flujo adecuado, el fabricante dispone de gráficas de prueba donde se debe entrar con una caída de presión. Se utilizará una caída de presión promedio para las cápsulas que será de 0,5 bar. Luego, el flujo obtenido desde la gráfica (ver

Ápndice E.1) es 4 [L/min] para el modelo XL4 . Dados este flujo, el tiempo de esterilización para el medio de alimentación con metanol se resume en la Tabla 5.47.

Tabla 5.47: Tiempo de esterilización de soluciones de metanol en *P. pastoris*.

<b>Parámetro</b>	<b>Metanol</b>
Volumen [L]	1896,00
Flujo [L/min]	4,00
t [min]	178,06

### 5.11 CONSUMO ANUAL HÍDRICO Y ENERGÉTICO

La cantidad de agua en ambos procesos se resume en la Tabla 5.48 para ambos procesos.

Tabla 5.48: Consumo anual de agua.

<b>Uso</b>	<b>Volumen [m<sup>3</sup>/año]</b>	
	<b>E. coli</b>	<b>P. pastoris</b>
Buffer	190	557
Medio	11	142
Estanques y fermentadores	14	56
Enfriamiento y esterilización	155	8.432
<b>Total</b>	<b>371</b>	<b>9.187</b>

El consumo anual energético se resume en la Tabla 5.49 para *P. pastoris* y *E. coli*.

Tabla 5.49: Consumo anual energético.

Equipo	Consumo [kWh/año]	
	P. pastoris	E. coli
C-1	188,70	377,40
C-2	-	377,40
HO-1	-	561,00
C-IA	6.018,00	4.012,00
UF-1	23,46	7,43
C-EM	302,05	234,60
B-1	779,11	263,36
B-2	48,59	5,00
B-3	177,07	10,42
B-4	310,53	39,88
B-5	80,38	24,50
Agitación Fermentadores	543,45	74,29
Agitación Estanques	45,54	45,37
<b>Total [kWh/año]</b>	<b>8.516,88</b>	<b>6.032,65</b>

## 5.11 REFERENCIAS CAPÍTULO 5

Acevedo F. y J.C. Gentina. (2002) Cinética de Fermentaciones. En: F. Acevedo, J.C Gentina e Illanes. Fundamentos de Ingeniería Bioquímica. Pp: 91-168. Valparaíso.

Albistur, P. y Gajardo, J. (2005). Desarrollo de una estrategia escalable de producción de la proteína antigénica ChaPs de *Piscirickettsia salmonis* en cepas recombinantes de *Escherichia coli* BL21 DE3 Codon Plus. PUCV.

Amersham Biosciences. (2002). Handbooks from Amersham Biosciences. *Gel Filtration: Principles and Methods (18-1022-12)*.

Datar, R. and Rosén, C. (1987). Centrifugal Separation in the Recovery of Intracellular Protein from *E. coli*. *The Chemical Engineering Journal*, 34, pp.49-56.

Doran, P. (1998). Principios de ingeniería de los bioprocesos. Editorial ACRIBIA, S.A. pp: 229-411. Zaragoza, España.

Hao, Y., Chu, J., Wang, Y., Zhang, S. and Zhuang, Y. (2006). Expression and aggregation of recombinant human consensus interferon- $\alpha$  mutant by *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, (28), pp.905-909.

McCabe, W., Smith, J. and Harriott, P. (2007). Operaciones unitarias en ingeniería química. 7th ed. Ciudad de México: McGraw Hill, p.215.

- Merck Millipore. (2013). Data Sheet. *Milli-Q® Integral Water Purification Systems*.
- Merck Millipore. (2014). Data Sheet. *Pellicon® Filters and Holders*.
- Merck Millipore. (2015). Data Sheet. *IsoPak® Biochromatography Process Columns*.
- Merck Millipore. (2015). Data Sheet. *Sterilizing-grade Durapore® 0.1 µm and 0.22 µm Hydrophilic Filters*.
- Michel, B.J., Miller, S.A. (1962). Power requirements of gas–liquid agitated systems. *AIChE, J.* 1962; 8:262–7.
- Polson, A. (1950). The some aspects of diffusion in solution and a definition of a colloidal particle. *J. Phys. Chem.* 54 (5), pp 649-652.
- Shi, L., Wang, D., Chan, W. and Cheng, L. (2007). Efficient expression and purification of human interferon alpha2b in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, (54), pp.220-226.
- Tejeda A., Montesinos R.M., Guzmán R. (1995). *Bioseparaciones. Primera Edición.*, UNISON; Hermosillo, Sonora. México.
- Wu, D., Chu, J., Hao, Y. and Wang, Y. (2011). High efficient production of recombinant human consensus interferon mutant in high cell density culture of *Pichia pastoris* using two phases methanol control. *Process Biochemistry*, (46), pp.1663-1669.

## CAPÍTULO 6

### ADMINISTRACIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LA PLANTA

El objetivo de este capítulo es designar una estructura organizacional a la planta de producción. Esta estructura se concibe con el fin de poder administrar los diferentes tipos de recursos disponibles, bajo una operación armónica y coordinada entre las distintas áreas que realizan funciones técnicas, comerciales, financieras, contable, y de seguridad valiéndose de técnicas de planificación, organización, dirección, coordinación, y de control (Chiavenato, 2007) .

La Departamentalización de las unidades organizativas responde a las diferentes áreas que deben atenderse en una empresa. Estas unidades cumplen coordinadamente el rol de supervisar y controlar las actividades y funciones que se lleven a cabo en el proceso productivo, a fin de poder conseguir los objetivos propuestos.

El objetivo de este proyecto es disponer de un sistema de producción rBoIFN- $\alpha$  por medio de dos líneas celulares distintas, a fin de poder comparar e identificar la más rentable. Es por esto, que al diseñar una planta de producción de esta proteína, se debe considerar que son dos plantas distintas. En consecuencia, se describirá la estructura organizacional en una primera etapa de manera genérica para ambas plantas. Mientras que al final del capítulo, se detallarán la planificación de la producción y una propuesta de diseño de planta para cada proceso por separado.

#### 6.1 ORGANIZACIÓN DE LA PLANTA PRODUCTORA DE rBoIFN- $\alpha$

Como se trata de una planta de dimensiones pequeñas, puede resultar adecuado vender el proyecto a algún laboratorio farmacéutico ya establecido. El optar por este modelo de negocios, se traduciría en la necesidad de una estructura organizacional más sencilla. Si el proyecto se acopla a una industria existente, éste debe atenerse a la estructura administrativa de la empresa que decida incorporar el nuevo proceso. Por ello, no resultaría adecuado tener una gran cantidad de departamentos. Es adecuado para este proyecto adoptar la estructura organizacional propuesta por Müller y Gerding (2014), aunque se ha optado por incluir un área comercial, en caso de que la planta se construya de manera independiente.

El modelo de organización funcional propuesto (ver Figura 6.1) cuenta con una Administración General, encargada de la dirección global de la planta. Para ello dirige cuatro departamentos principales.

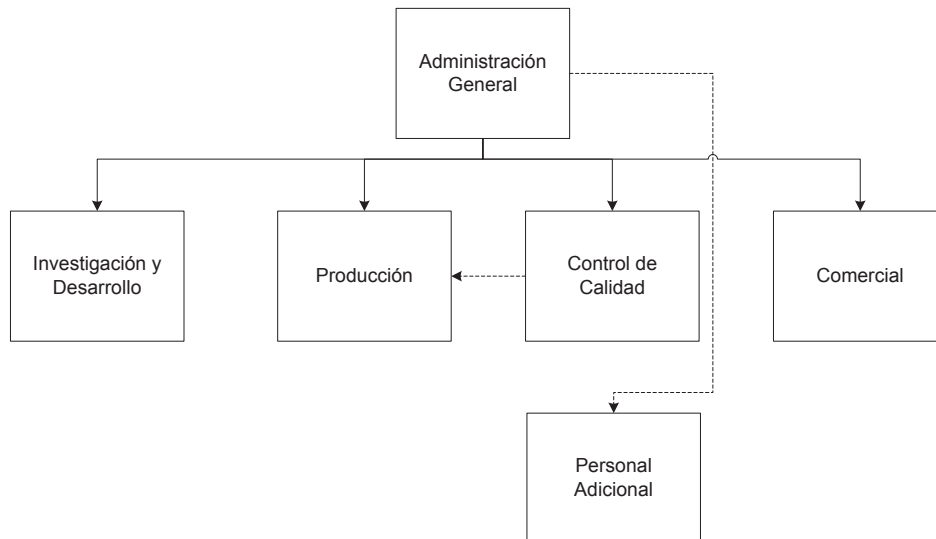


Figura 6.1: Estructura organizacional de la planta. Modelo propuesto por Müller y Gerding (2014). Modificado para la administración de una planta de fármacos veterinarios.

### 6.1.1 Descripción de las funciones de los Departamentos de la Planta

- **Administración General:** Esta sección, que está a la cabeza de la estructura organizacional de la planta, establece los objetivos a cumplir y la forma en cómo se deben alcanzar los mismos. Debe gestionar los diversos recursos disponibles (financieros, materia prima, equipos, personal), por medio de una correcta planificación que establezca las estrategias para alcanzar los objetivos. También debe ser responsable de la organización, es decir, cómo se repartirán las diversas funciones que en conjunto, apuntarán a cumplir los objetivos. Debe velar por el correcto funcionamiento y coordinación de todas las áreas a través de estrategias de control.

A cargo de esta sección debe estar un profesional con vastos conocimientos en el área de la ingeniería de procesos, y administración. Debe también formar parte de esta sección un abogado experto Derecho Corporativo, el cual asesorará a la directiva en todos los temas legales.



- **Comercial:** Esta área es la encargada del intercambio que se produce entre el productor y el consumidor. Debe considerar las estrategias necesarias para la distribución y promoción del producto, además debe resolver la introducción del interferón en el mercado, y para ello debe desarrollar estrategias de marketing y publicidad, y asignación de precios. Al estar en constante relación con el cliente, este departamento será el encargado de generar la retroalimentación con las demás áreas administrativas, conociendo las necesidades del mercado y las posibles mejoras que pudieran hacer más atractivo el producto, además de otorgar servicios de postventa a los clientes que pudieran requerirlos.
- **Producción:** Sección responsable de que se desarrolle correctamente el producto. Para ello debe planificar y programar las tareas de producción de acuerdo a las necesidades de la planta. Es un área técnica por lo que en la dirección de este departamento debe haber un profesional del área de bioprocesos, el cual debe estar familiarizado con las operaciones unitarias que se realizan en el proceso, además de la instalación, puesta en marcha y operación de la planta. Este departamento debe velar también por el correcto funcionamiento de los equipos, y de su mantención y limpieza cada vez que estos lo requieran, garantizando así un producto de la más alta calidad y seguridad.
- **Control de Calidad:** Área encargada de cumplir con los estándares nacionales e internacionales en materia de fármacos veterinarios. Para ello, elaborará ensayos periódicos al producto terminado y las distintas etapas del proceso productivo, con el objetivo de comprobar si éste cumple con las normativas respectivas de inocuidad. Para ello debe también ser responsable de un control del proceso en su totalidad, con el fin de asegurar la calidad y seguridad en cada una de las etapas del mismo, desde la recepción de la materia prima hasta el despacho del producto terminado, tratando de reducir al mínimo los riesgos de una posible contaminación o alteración del producto.
- **Investigación y Desarrollo:** Este departamento tiene por objetivo la optimización del proceso productivo. Debe ser capaz de detectar las posibles mejoras en las que se pudiera incurrir en las distintas etapas del proceso, como mejoras en el medio de cultivo, optimización parámetros en la producción, recuperación, y purificación del producto.

El profesional a cargo de este departamento debe tener sólidos conocimientos en el ámbito bioquímico y procesos productivos. Debe buscar estar siempre a la vanguardia en las tecnologías de producción de proteínas recombinantes, añadiendo un sello ingenieril, que tenga por objeto la optimización los distintos procesos productivos.

## 6.2 ORGANIZACIÓN DEL PERSONAL DE LA PLANTA

### 6.2.1 Cargos del área administrativa

Con respecto a las áreas administrativas que tiene la planta de producción, se establecen los puestos de trabajo y el perfil profesional que deben tener las personas responsables de cada sección. La Tabla 6.1 resume las secciones administrativas considerando los perfiles de los profesionales que la conforman.

Tabla 6.1: Cargos de trabajo por Departamento.

Sección	Cargo
Administración	Jefe de Planta
	Secretaria
	Contador Auditor
Producción	Jefe de Producción
	Jefe de Turno
	Operario de Planta
	Ingeniero Mecánico
Comercial	Jefe Sección Comercial
	Técnico Comercial
Control de Calidad	Supervisor de Calidad
	Analista Bioquímico
Investigación y Desarrollo	Jefe de Investigación
	Investigador
	Investigador Externo
Adicional	Personal de Aseo
	Técnico Industrial
	Prevencionista de Riesgos

### 6.2.2 Requerimientos de personal

El determinar la cantidad de personal que se necesitará en el proceso productivo de una depende de las labores que se vayan a realizar. Existen diversos modelos que son empleados, en su mayoría, para la determinación de personal en plantas productivas grandes. Esta planta farmacéutica no presenta volúmenes elevados de producción, por lo que la Ecuación 6.1, que representa el modelo de Wessel (1952), frecuentemente utilizado en pequeñas plantas de producción para estimar el número de horas hombre (Zomosa, 1983) asociándolo al volumen de producción diario, podría resultar de utilidad.

$$HH = 10,4 \cdot P^{0,25}$$

Ecuación 6.1

Dónde:

HH: horas hombre.

P: volumen de producción diario [kg/día].

Al reemplazar la producción diaria (aproximadamente 0,07 [kg/día]) en la Ecuación 6.1 se obtienen las horas hombre:

$$HH = 5,34$$

El número de operarios puede estimarse según la Ecuación 6.2.

$$N_o = \frac{HH \cdot n_e}{n_t \cdot t}$$

Ecuación 6.2

Dónde:

$N_o$ : número de operarios.

HH: horas hombre [hora hombre/día/etapa].

$n_e$ : número de etapas que involucran la producción; 5 etapas.

$n_t$ : número de turnos; 3 turnos.

t: tiempo de cada turno [h]; 9 [h].

El número de etapas que involucran el proceso completo tanto en *E. coli* como en *Pichia* son 5: Propagación, Producción, Recuperación, Purificación, Formulación. La cantidad de horas por turno son 8.

Reemplazando los valores en la Ecuación 6.2, se tiene lo siguiente:

$$N_o = \frac{5,34 \cdot 5}{3 \cdot 9} \cong 1 \text{ operario}$$

El resultado muestra que 1 operario sería suficiente. Esto no es posible realizarlo en la práctica, por lo que el número total de operarios se debe determinar en base a la planificación de las tareas de producción. En la Tabla 6.2 se detalla la cantidad de personal a contratar, considerando el perfil técnico que debe presentar cada funcionario para desempeñarse en las distintas tareas de producción.

Tabla 6.2: Puestos de trabajo y perfil técnico de acuerdo al cargo a ocupar.

<b>Cargo</b>	<b>Estudios</b>	<b>N° de Personas</b>
Jefe de Planta	Ingeniero Civil Bioquímico	1
Secretaria	Secretariado Ejecutivo Gerencial	1
Contador Auditor	Contador Auditor	1
Jefe de Producción	Ingeniero de Ejecución en Bioprocesos	1
Jefe de Turno	Ingeniero de Ejecución en Bioprocesos	4
Operario de Planta	Técnico Operador de Plantas Industriales	8
Supervisor de Mantenimiento	Ingeniero Mecánico	1
Jefe Comercial	Ingeniero Comercial	1
Asistente Comercial	Técnico Comercial	1
Supervisor de Calidad	Técnico Nivel Superior en Gestión y Control de Calidad	1
Analista Bioquímico	Bioquímico	1
Jefe de Investigación	Ingeniero Civil Bioquímico	1
Investigador	Bioquímico	1
Investigador Externo	Sujeto a Evaluación	1
Técnico de Mantenimiento	Técnico Mecánico Industrial	2
Encargado de Prevención	Técnico en Prevención de Riesgos	1
Personal Aseo	Personal de Aseo	1

### 6.2.3 Jerarquía de cargos

En esta sección se especifica la jerarquía en los cargos propuestos para el funcionamiento de la planta. El orden considera las funciones de acuerdo a su grado de responsabilidad en el proceso. En la Figura 6.2 se muestra el diagrama con la estructura jerárquica de los puestos de trabajo.

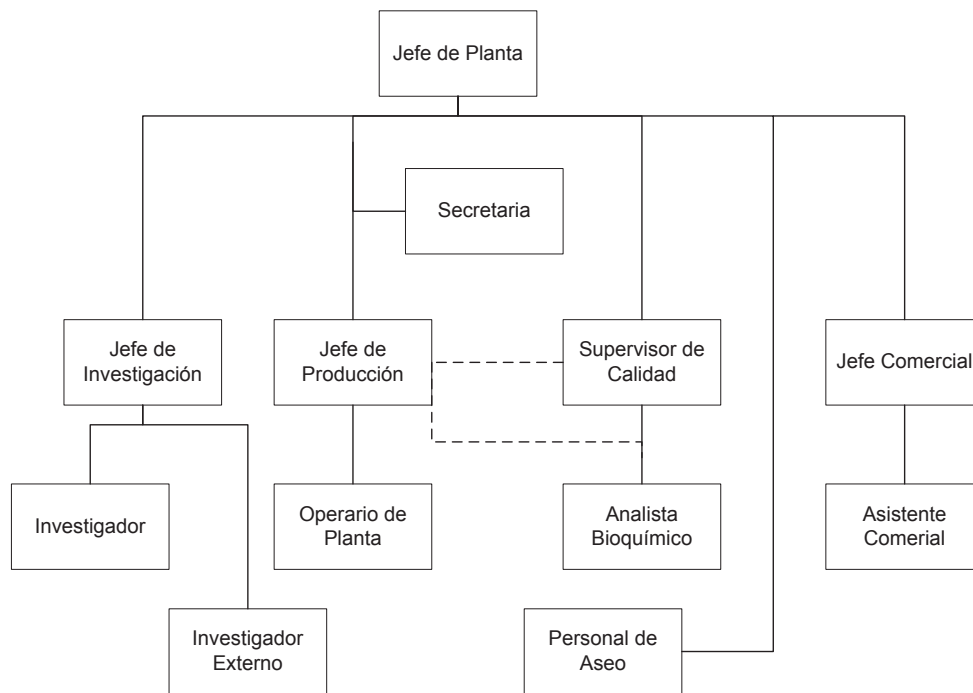


Figura 6. 2: Diagrama jerárquico de la planta.

#### 6.2.4 Jornadas de trabajo

Esta sección detalla las jornadas de trabajo que debe tener el personal en la planta, de modo que puedan ser atendidas las distintas tareas de producción oportunamente.

De acuerdo al Código del Trabajo, el Artículo 22 del Párrafo 1°, que fija la jornada de trabajo, establece que ésta no puede exceder un máximo de cuarenta y cinco horas semanales repartidas en un mínimo de cinco y un máximo de seis días, siendo 10 horas el límite diario de trabajo efectivo, sin considerar la hora de colación. Se excluyen de esta jornada a los gerentes, administradores, y a todo aquel que trabaje sin fiscalización superior inmediata.

La producción de rBo-IFN- $\alpha$  supone un proceso continuo durante las 24 horas del día, los 7 días a la semana, por lo que la planificación deberá ajustarse a turnos diarios que permitan mantener funcionarios atendiendo el proceso continuamente. Para ello, debe levantarse una solicitud en la Dirección del Trabajo para que sean considerados bajo el Artículo 38, inciso 2°, siendo excluidos así del descanso dominical.

En la Tabla 6.3 se muestran los tipos de jornada laboral que deben tener los distintos funcionarios de la planta productiva.

Tabla 6.3: Tipos de horario para cada cargo en la planta.

<b>Cargo</b>	<b>Tipo de Horario</b>
Jefe de Planta	Oficina
Secretaria	Oficina
Contador Auditor	Oficina
Jefe de Producción	Oficina
Jefe de Turno	Turno
Operario de Planta	Turno
Supervisor de Mantenición	Oficina
Jefe Comercial	Oficina
Asistente Comercial	Oficina
Supervisor de Calidad	Oficina
Analista Bioquímico	Oficina
Jefe de Investigación	Oficina
Investigador	Oficina
Investigador Externo	A convenir
Técnico de Mantenición	Turno
Encargado de Prevención	Oficina
Personal Aseo	Turno

La jorjada de oficina tiene un horario de Lunes a Viernes de 8:00 a 18:00 horas, mientras que el horario de turnos se especifica en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4: Horarios de cargos que operan por turnos.

<b>Cargo</b>	<b>Días</b>	<b>Horario</b>
Jefe Turno y Operario Planta	Lunes a Viernes	00:00 a 08:00
		08:00 a 16:00
		16:00 a 00:00
Jefe Turno y Operario Planta	Sábado	00:00 a 05:00
		05:00 a 10:00
		10:00 a 15:00
Jefe Turno y Operario Planta (Part Time)	Sábado	15:00 a 00:00
Jefe Turno y Operario Planta (Part Time)	Domingo	00:00 a 12:00
		12:00 a 00:00

La producción está planificada de tal manera que de Lunes a Viernes, durante el horario de 08:00 a 16:00 hrs trabajen 3 Operarios de Planta y 1 Jefe de Turno. Los Operarios de Planta trabajan bajo supervisión del Jefe de Turno y éste entrega reportes de producción directamente al Jefe de Producción. En los turnos de noche, es

decir, 00:00 a 08:00 y 16:00 a 00:00, trabajarán 2 Operarios de Planta y 1 Jefe de Turno, el cual deberá entregar los reportes al Jefe de Producción a las 08:00 hrs. del día siguiente.

Con el objetivo de cumplir las 45 horas semanales estipuladas en el Código del Trabajo, el mismo régimen se llevará a cabo el día Sábado, pero reduciendo a 5 horas la Jornada Laboral. Para los horarios Part Time, serán operarios contratados exclusivamente para trabajar los Sábados y Domingos, por lo que se requiere que estén trabajando al mismo tiempo 1 Operario de Planta y 1 supervisor directo que tendrá el cargo de Jefe de Turno, éste informará los reportes el día Lunes por la noche al dejar la planta.

### **6.3 PLANIFICACIÓN DE LAS TAREAS DE PRODUCCIÓN**

La producción anual de rBoIFN- $\alpha$  se ha planificado en base a 51 semanas productivas. Esto se traduce en 357 días de trabajo, que en la práctica pudieran resultar en menos.

La producción en *E. coli* se diferencia principalmente de la de *Pichia* en que este último proceso requiere más tiempo en su etapa de fermentaciones, por lo que en *Pichia* sólo se considera un lote semanal que se traduciría en 51 lotes anuales. *E. coli* por su parte considera 2 lotes productivos a la semana, lo que al año significarían 102.

Si bien la estructura administrativa de las plantas involucradas en este proyecto es similar que la diseñada por Müller y Gerding (2014), la envergadura de los procesos productivos que aquí se presentan es mayor que el de los autores citados, por lo que se traducirá en una mayor cantidad de operarios.

El plan de producción de cada planta productiva se estudiará por separado.

#### **6.3.1 Plan de producción en *Escherichia coli***

Con el objetivo de ordenar las tareas de producción, es que se puede utilizar el diagrama de Gantt. Es un recurso ampliamente utilizado en planificación, ya que establece el curso que deben seguir ordenadamente cada una de las actividades en un proceso, de modo que se visualice ordenadamente cada una de ellas. Es de fácil interpretación y resulta de bastante utilidad para poder ubicar en tiempo y espacio el proceso productivo.



Para comenzar a diseñar este diagrama, se toman las 5 etapas del proceso, y se divide la planilla en cierta unidad de tiempo. Para el caso de este proyecto se decidió programar la producción semanal y dividir esta en tres turnos donde el número 1 representa el turno de mañana, el 2 el turno de tarde, y el 3 el turno de noche.

Es relevante mencionar que el diseño de este proyecto, está pensado en la producción de 25 kilogramos de IFN, que es la proyección alcanzada en el décimo año del proyecto. Al diseñar de esta manera, se sobredimensiona la producción en los primeros años, pero es posible utilizar los mismos equipos y organización de la planta, ajustando levemente los volúmenes de trabajo.

El diagrama de Gantt con la planificación de la producción en *Escherichia coli* se muestra en la Figura 6.3.

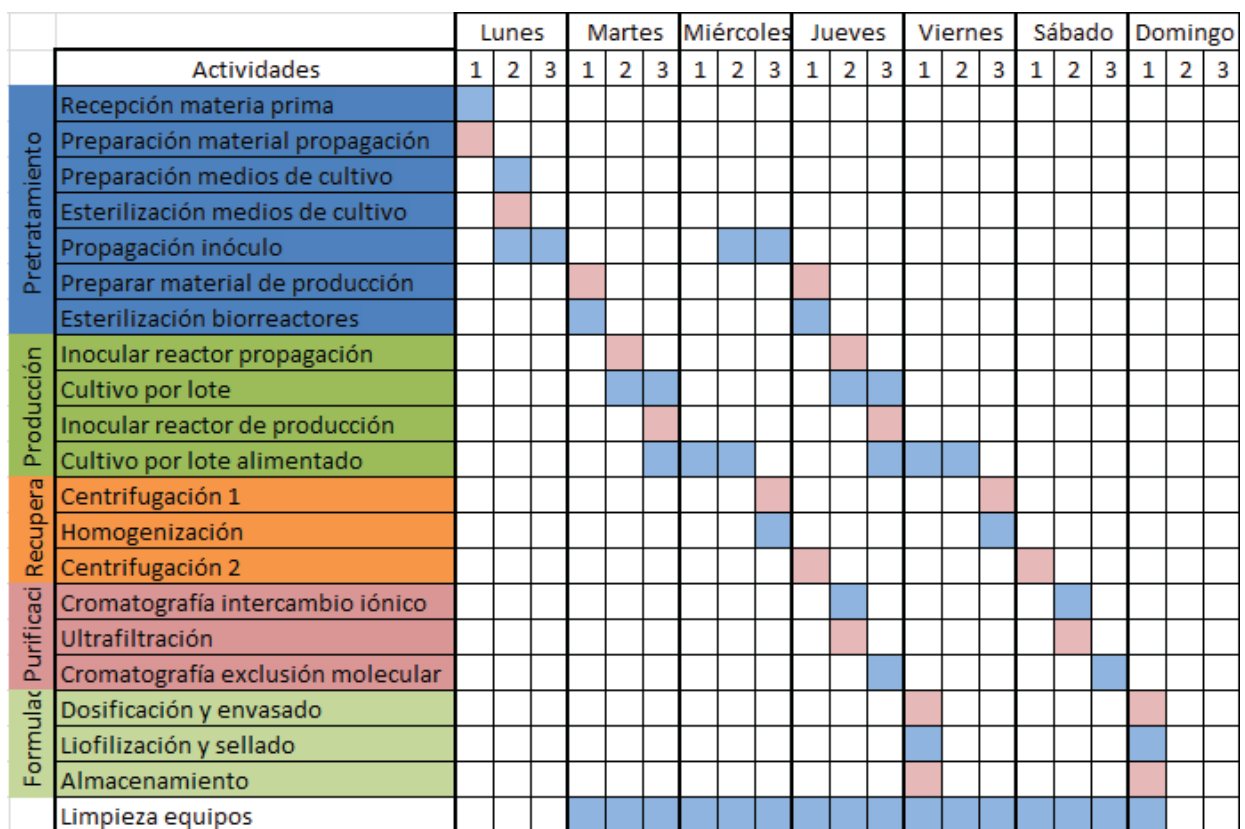


Figura 6.3: Carta Gantt del proceso en *E.coli*.

### 6.3.2 Plan de producción en *Pichia pastoris*.

El diagrama de Gantt en la planificación de la producción en *Pichia pastoris* se realizó de manera equivalente que en *E. coli*. Las divisiones de tiempo fueron las mismas, aunque la planificación varía, por razones inherentes al proceso.

El diagrama de Gantt para *Pichia* se muestra en la Figura 6.4.



Figura 6.4: Carta Gantt del proceso en *P. pastoris*.

## 6.4 ORGANIZACIÓN DE LA PLANTA

En esta sección se busca determinar el diseño de la planta. Esto incluye el posicionamiento de los equipos, así como también la distribución de las distintas áreas de la planta. La organización las instalaciones de una planta productiva del área farmacéutica debe estar pensada para minimizar el riesgo de cualquier tipo de contaminación.

El diseño de las instalaciones se ha realizado en base a las recomendaciones del Manual de Buenas Prácticas de Manufactura (Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme: Guide to Good Manufacturing Practice For Medical Products, 2009).

En cuanto a las instalaciones del área de producción, éstas deben establecerse de manera que sigan un orden lógico con respecto a las operaciones del proceso que requieran menores índices de limpieza. Esto también implica que los equipos deben estar dispuestos de manera ordenada para que así no induzcan a la confusión entre etapas del proceso.

Los laboratorios de control de calidad deben estar en un lugar a parte del área de producción, así como también los baños y camarines, que además deben estar alejados de las áreas de almacenamiento. Las oficinas y las rutas de libre acceso del personal administrativo no deben estar conectadas directamente con el área de producción.

#### **6.4.1 Diseño de las instalaciones**

La planta se dividirá en dos sectores principales, separados por un pasillo. Uno de ellos, será el área de producción. En este sector se encontrarán todas las áreas destinadas al proceso productivo, a la recepción de materia prima, y a la formulación y almacenamiento del producto terminado. En esta área se encontrarán también, aunque no conectados directamente al área de procesos, los laboratorios de control de calidad y de investigación y desarrollo.

El otro sector es el área administrativa, que estará al frente del área de producción y laboratorios, y contará con una recepción donde estará ubicada la secretaria. Avanzando por los pasillos estarán las oficinas administrativas. Cada área debe contar con baños y camarines para el personal.

En resumen, la planta debe contener las siguientes áreas:

- Hall de acceso y recepción (secretaría)
- Oficina Jefe de Planta
- Oficina Jefe de Producción
- Oficina Jefe de Investigación y Desarrollo
- Sala de reuniones
- Zona de recepción y almacenamiento de materia prima
- Sala de almacenamiento de materiales
- Sala de lavado de materiales
- Baños y camarines
- Sala de cultivos celulares

- Sala de preparación de medios, propagación, y producción
- Sala de purificación
- Sala de formulación final
- Sala de almacenamiento de producto
- Vías de evacuación
- Laboratorio de control de calidad
- Laboratorio de investigación y desarrollo

#### **6.4.2 Layout de la planta**

De acuerdo a lo descrito en la sección 6.4.1 la planta debe dividirse en dos: el área de producción, y el área administrativa.

La estimación de la superficie de las instalaciones se hizo en base al proyecto expuesto por Müller y Gerding (2014). En el proyecto, los autores consideraron que el área total ocupada por los equipos más relevantes del proceso correspondería a un 5% de la superficie que debiera tener la sección de producción, y en base a ese dato, proyectaron la superficie estimada de las demás instalaciones de la planta.

En la Tabla 6.5 se muestra la superficie utilizada por los equipos más relevantes del proceso productivo de *E. coli*.

Tabla 6.5: Superficie utilizada por los equipos del proceso en *E. coli*.

<b>Equipo</b>	<b>Ancho (W)</b>	<b>Prof. (D)</b>	<b>Área [m<sup>2</sup>]</b>
FP2	0,64	0,66	0,42
FU	2,06	1,42	2,93
C-1	0,80	1,50	1,20
HO-1	0,79	1,20	0,94
C-IA	1,04	0,64	0,67
UF-1	0,18	0,02	0,00
C-EM	0,80	0,80	0,64
E-1	1,47	1,47	2,16
E-2	0,42	0,42	0,18
E-3	0,61	0,61	0,37
E-4	0,31	0,31	0,09
E-5	0,40	0,40	0,16
E-6	0,59	0,59	0,35
E-7	0,58	0,58	0,33
E-8	1,25	1,25	1,57
E-9	0,23	0,23	0,05
E-10	0,91	0,91	0,82
E-11	0,23	0,23	0,05
<b>Área Total</b>			<b>12,94</b>

El área utilizada por los equipos es de 12,94 [m<sup>2</sup>] por lo que la superficie destinada a la sección de procesos debe ser 222 [m<sup>2</sup>]. En la Tabla 6.6 se muestra el porcentaje con respecto al área de procesos, y el área tentativa que debieran tener el resto de las instalaciones en la planta de *E. coli*.

Tabla 6.6: Dimensiones de las instalaciones de la planta de *E. coli*.

<b>Instalación</b>	<b>% de Área</b>	<b>Área estimada [m<sup>2</sup>]</b>
Planta de Procesos	100	222
Oficinas	25	55.5
Servicios	40	88.8
Estacionamientos	60	133.2
Laboratorios	60	133.2
Almacenamiento	25	55.5
Recepción de Camiones	100	222

Luego, tomando en consideración las estimaciones de la Tabla 6.6, se desarrolló una propuesta de planta, la cual se muestra en la Figura 6.4.

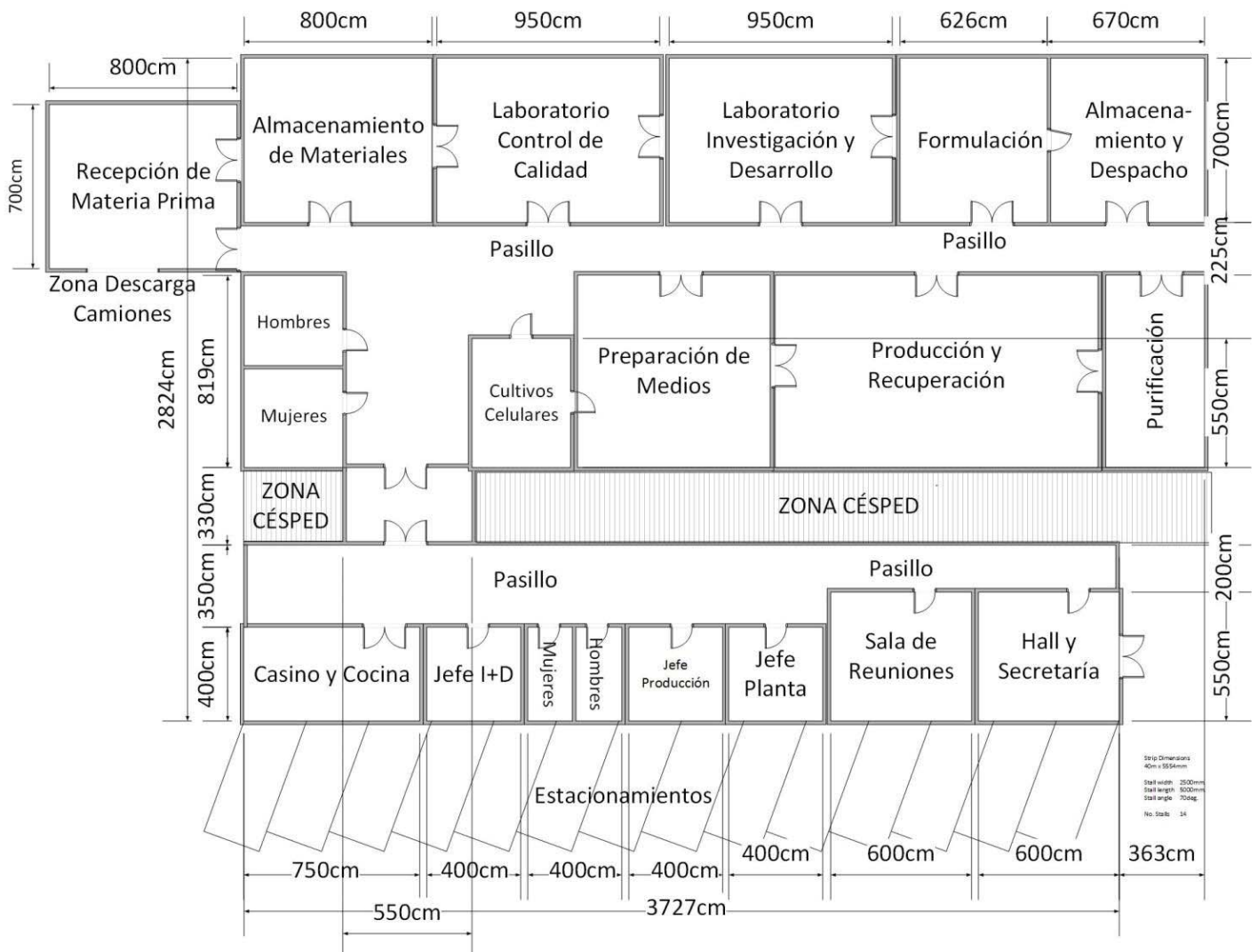


Figura 6. 5: Plano de Arquitectura de la planta de producción en *E. coli*.

Tomando en cuenta la propuesta de diseño, en el caso de *E. coli*, se requeriría un terreno de 3000 [m<sup>2</sup>] para desarrollar el proyecto, lo que se traduciría en un terreno de 60 x 50 [m]. Sin embargo, la propuesta es solo tentativa, y puede estar sujeta a modificaciones, dependiendo de la empresa que decida realizar el proyecto.

Para el caso de *Pichia* se considera el mismo modelo de planta, pero el aumento de superficie estaría considerada en relación al aumento de superficie que utilicen los

equipos. Con esto, en la Tabla 6.7, se detallan las dimensiones utilizadas por los equipos en el proceso de *P. pastoris*.

Tabla 6.7: Superficie utilizada por los equipos del proceso en *P. pastoris*.

<b>Equipo</b>	<b>Ancho (W)</b>	<b>Prof. (D)</b>	<b>Área [m<sup>2</sup>]</b>
FP1	0,64	0,66	0,42
FP2	1,60	1,24	1,98
FU	2,50	2,60	6,50
C-1	0,80	1,50	1,20
C-IA	1,00	1,00	1,00
UF-1	0,18	0,02	0,01
C-EM	1,00	1,00	1,00
E-1	2,76	2,76	7,60
E-2	0,63	0,63	0,40
E-3	1,09	1,09	1,19
E-4	0,59	0,59	0,35
E-5	1,64	1,64	2,70
E-6	1,64	1,64	2,70
E-7	1,60	1,60	2,57
E-8	2,36	2,36	5,55
E-9	1,41	1,41	1,98
E-10	0,52	0,52	0,27
E-11	0,91	0,91	0,83
E-12	0,52	0,52	0,27
<b>Área Total</b>			<b>38,53</b>

Considerando la misma condición que en *E. coli*, si el área utilizada por los equipos es el 5% del área de procesos, entonces en el caso de *Pichia* el área de procesos debe ser de 675 [m<sup>2</sup>]. Si las demás instalaciones quedan con las mismas dimensiones que en la planta de *E. coli*, la planta de *Pichia* necesitaría una superficie total de 3500 [m<sup>2</sup>].

## 6.5 REFERENCIAS CAPÍTULO 6

Chiavenato, I (2007). *Introducción a la Teoría General de la Administración*. Ciudad de México: McGraw-Hill.

Dirección del Trabajo: Gobierno de Chile. (2014). Código del Trabajo. Santiago, Chile.

Illanes, P. (1991). *La administración del sistema empresa: un enfoque integral de la administración de empresas*. Santiago: Leeds Impresores.

Müller, A. y Gerding, G. (2014). Evaluación de la factibilidad técnico-económica de una planta productora de rhBMP-2 producida en células CHO. PUCV.

Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme: Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products. (2009) (1st ed., pp. 11-14). Geneva. Recuperado el 31 de Mayo de 2017, de PIC/S: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s18619en/s18619en.pdf>.

Zomosa, A (1983). Evaluación Económica. En Manual de Proyectos en Ingeniería Química (págs. 405-408). Santiago: Universidad de Chile.



## CAPITULO 7

### EVALUACIÓN ECONÓMICA

Este capítulo tiene como objetivo realizar un análisis financiero para evaluar si es viable la implementación del proyecto. En esta etapa se estudia la factibilidad económica del proyecto, en primer lugar se definirá el capital de inversión, clasificados como capital fijo y capital de trabajo; luego se establecerán los costos de operación y venta del producto, organizados como costos de producción y gastos generales. Además se establecerá el ingreso anual en función de la venta de rBoIFN- $\alpha$  y finalmente se realizará la evaluación de la rentabilidad económica respecto al flujo de caja.

Cabe mencionar que la unidad monetaria utilizada en este capítulo será la unidad de fomento (UF), calculada en cada caso utilizando los indicadores económicos del día 5 de enero del año 2017, presentados en la Tabla 7.1.

Tabla 7. 1: Indicadores económicos utilizados. (Banco Central de Chile, 2017)

Indicador Económico	Valor [CLP]
Unidad de Fomento [UF]	26.660,25
Dólar Estadounidense [USD]	661

#### 7.1 CAPITAL DE INVERSIÓN O COSTOS DE CAPITAL (CC)

El costo de capital total (cc) es la suma del capital fijo (CF) junto con el capital de trabajo (CT). El primero comprende los bienes duraderos tales como edificios, maquinarias, instalaciones de diversos tipos y dinero disponible para el pago de salarios, entre otros; mientras que el segundo es el capital necesario para operar la planta.

Las inversiones efectuadas se pueden agrupar en tres tipos: activos fijos, nominales y capital de trabajo. Los primeros, son aquellos que se ocupan para los bienes tangibles que se utilizarán; suelen ser terrenos, las obras físicas, el equipamiento de la planta, los vehículos, la infraestructura de servicios de apoyos. Los activos nominales son todos aquellos que se realizan sobre los activos constituidos por los servicios o

derechos de adquisición, como los gastos de organización, las patentes, licencias y capacitación, entre otros.

Un punto importante a considerar es que, para efectos contables, los activos fijos, con la excepción de los terrenos, están sujetos a depreciación, la cual afectará al resultado de la evaluación por su efecto sobre el cálculo de impuestos. Los activos nominales son susceptibles a amortizar y también afectan indirectamente los flujos de cajas (Sapag & Sapag, 1991).

El costo de capital fijo se puede subdividir en costos directos e indirectos. Dentro de los costos directos se cuenta el costo de compra de equipos, el costo de su instalación, el costo de cañerías, sistemas eléctricos, edificios, mejoras de terreno, instalaciones de servicios y costo de terreno. Dentro de los costos indirectos se encuentra el costo de ingeniería y supervisión, costos de construcción, gastos legales, ganancia de la empresa constructora y gastos por contingencia.

#### **a) Costo del Terreno**

El costo de terreno a comprar es relativo. Existe una cantidad importante de factores que deben ser considerados al momento de cotizar un metro cuadrado de terreno. Generalmente, el costo de terreno varía según las condiciones de éste (por ejemplo, si el terreno tiene árboles, si está limpio, si tiene edificaciones, etc.), su ubicación (central, periférica, orilla de carretera, etc.) la factibilidad (acceso de agua, electricidad, fibra óptica), etc. (Guitart, 2014).

Anteriormente, en el Capítulo 2 se determinó que la localización de la planta sería en la Quinta Región. Sin embargo, la propuesta es solo tentativa, y puede estar sujeta a modificaciones, dependiendo que una empresa decida realizar el proyecto como se mencionó en el Capítulo 6. Considerando que los terrenos de las plantas sean independientes, las cotizaciones son según referencias relativas facilitadas por el subgerente de la empresa Kaufen Propiedades (ver Tabla 7.2).

Tabla 7.2: Referencias de cotizaciones de terrenos de Sub-gerente de Kaufen Propiedades.

Precio/Área [UF/m <sup>2</sup> ]	Área [m <sup>2</sup> ]
8	D
3,5	E
0,5	F
50-60	G
2-4	H

Dónde,

A: Laguna Verde, periférico sin factibilidad.

B: Villa Alemana, central, con factibilidad.

C: Quilpue, central, con factibilidad.

D: Viña del Mar, El Salto, orilla de carretera, con factibilidad.

E: Limache, esquina Palmiro Romano con Eastman, con factibilidad.

F: Olmué, Granizo, sin factibilidad.

G: Viña del Mar, sector Ponientes, con factibilidad.

H: Limache, orilla carretera, con factibilidad.

Analizando las opciones de terrenos en la Quinta Región, un lugar central de la comuna de Villa Alemana, Quilpué o Limache, con factibilidad tiene un precio que varía entre 2 – 4 [UF/m<sup>2</sup>]. Este valor es el que se considerará para los costos de un terreno de aproximadamente 3.000 y 3.500 [m<sup>2</sup>], área suficiente para albergar la planta de producción con *E. coli* y *P. pastoris* respectivamente, según el tamaño de los equipos y la complejidad del proceso. Por lo tanto, se estima que el costo del terreno será aproximadamente de 9.000 [UF] para la planta de producción con *E. coli* y 10.500 [UF] para la planta de producción con *P. pastoris*.

## **b) Costos de Capital Fijo Directo (CFD)**

### **Costos Equipos Instalados (CEI)**

Para desarrollar el análisis financiero es necesario contar con el valor de cada equipo, considerando su entrega e instalación de los mismos. Los costos de instalación

incluyen los costos asociados a montaje del equipo en la planta, mano de obra necesaria, construcción de cimientos soportes para el equipo y otros gastos generales. Estos datos pueden ser estimados de acuerdo a porcentajes típicos del costo inicial de cada equipo, y este último se puede obtener por medio de los siguientes métodos:

- Cotización directa: El proveedor entrega el valor real del equipo de acuerdo a las características especificadas del mismo.
- Estimaciones por relaciones bibliográficas: Existen diferentes ecuaciones y gráficos que relacionan precios de diversos equipos (Couper et al., 2012).

En muchos casos, los datos de costo disponibles por este método corresponden a otros años, y debido a que los precios pueden variar considerablemente, se pueden utilizar índices de costos que permitan actualizar dicho precio según la Ecuación 7.1 (Peters & Timmerhaus, 1991).

$$C_A = C_p \cdot \left( \frac{I_A}{I_p} \right)$$

Ecuación 7.1

Dónde,

$C_A$ : Costo del equipo en el año actual.

$C_p$ : Costo del equipo en el año que fue cotizado.

$I_A$ : Índice de precio del año actual.

$I_p$ : Índice de precio del año en que fue cotizado.

Los índices de precios anuales CEPCI utilizados en la determinación de costos actuales de los equipos desde el año 2008 se muestran en la Tabla 7.3.

Tabla 7.3: Índices CEPCI para determinación de costos de equipos.

<b>Años</b>	<b>CEPCI</b>
<b>2008</b>	575,4
<b>2009</b>	521,9
<b>2010</b>	550,8
<b>2011</b>	585,7
<b>2012</b>	584,6
<b>2013</b>	567,3
<b>2014</b>	576,1
<b>2015</b>	556,8
<b>2016</b>	541,7

- Escalamiento de costos, para lo cual se utilizó la Ecuación 7.2.

$$C_d = C_c \cdot \left( \frac{Cap_d}{Cap_c} \right)^c$$

Ecuación 7.2

Dónde,

$C_d$ : Costo del equipo desconocido.

$C_c$ : Costo del equipo conocido.

$Cap_d$ : Capacidad del equipo desconocido.

$Cap_c$ : Capacidad del equipo conocido.

$c$ : Factor de escala, 0.6 en general, 0.54 para evaporadores y 0.34 para bombas (Peters & Timeerhaus, 1991).

Para conocer el valor del equipo entregado (CEE) e instalado (CEI) se utilizan las Ecuaciones 7.3 y 7.4 respectivamente.

$$CEE = CE \cdot (1 + 0,1)$$

Ecuación 7.3

$$CEI = CEE \cdot F_i$$

Ecuación 7.4

Dónde,

CE: Costo del equipo.

Fi: Factor instalación que varía según el tipo de equipo.

Los factores de instalaciones de los equipos se muestran en la Tabla 7.4 (Peters y Timmeerhaus, 1991).

Tabla 7.4: Costos de instalación por equipo como porcentaje del costo equipo comprado.

Tipo de equipo	Costo de instalación %
Separador centrifugo	30
Filtros	65
Estanques C/A	80
Biorreactores	60
Estanque S/A	50
Bombas	40
Homogeneizador	30
Calderas	50
Equipo Ultrafiltración	40

### Línea Celular

Dentro del capital fijo directo se debe incluir el valor de la línea celular *E. coli* BL21-DE y GS115 que serán adquiridas en un inicio, propagada y almacenada en frío. Los costos de las cepas son 422 y 364 [USD] respectivamente. Como las cepas están genéticamente modificadas se opta por pagar un 1% de las utilidades al creador de la

línea celular. Esto también incluye que el creador de la cepa puede generar posteriormente una más eficiente y la línea celular comprada puede quedar obsoleta.

Los costos asociados a los equipos tanto en *P. pastoris* como en *E. coli* se detallan en las Tablas 7.5; 7.6; 7.7; y 7.8.

Tabla 7. 5: Costos de equipos para la producción de rBoIFN- $\alpha$  con *P. pastoris*Tabla 7.5: Costos de los Equipos para la Producción de rBoINF- $\alpha$  con *P. pastoris*

Etapa	Nomenclatura	Capacidad	Equipo	CE Neto [UF]	Cantidad	CEE [UF]	Fi	CEI [UF]
Esterilización	-	-	Microfiltro de 0,1 $\mu$ m	7,59	2	16,69	1,65	27,54
Agua	W-1	2.880 [L/d]	Equipo purificador de agua	697,39	1	767,12	3	2.301,37
	E-1	16.454 [L]	Estanque de agua tipo 1 <sup>1</sup>	381,80	1	419,98	1,8	755,97
Propagación	FP0	2 [L]	Biorreactor propagación 0	653,09	1	718,40	1,1	790,24
	FP1	15 [L]	Biorreactor propagación 1	2.187,82	1	2.406,60	1,6	3.850,56
	FP2	150 [L]	Biorreactor propagación 2	4.405,24	1	4.845,76	1,6	7.753,22
	FU	3.500 [L]	Biorreactor de producción	15.591,05	1	17.150,15	1,6	27.440,24
Producción	E-2	200 [L]	Estanque Medio de Cultivo (BSM) <sup>1</sup>	49,59	1	54,55	1,8	98,18
	E-3	1.023 [L]	Estanque Solución Trazas <sup>1</sup>	47,26	1	51,99	1,8	93,57
	E-4	161 [L]	Estanque Glicerol <sup>1</sup>	43,54	1	47,89	1,8	86,20
	E-5; E6	3.491 [L]	Estanque Metanol <sup>1</sup>	99,93	2	219,85	1,8	395,72
	C-1	4 [m <sup>2</sup> /h]	Centrifuga de discos	1.845,90	1	2.030,49	1,3	2.639,64
Recuperación y Purificación	C-IA	-	Columna cromatográfica D1000H900 <sup>2</sup>	3.550,41	1	3.905,45	1	3.905,45
	-	-	Consola eléctrica <sup>2</sup>	267,54	1	294,29	1	294,29
	-	-	Skid de proceso Talla 5 <sup>2</sup>	8.461,09	1	9.307,20	1,4	13.030,08
C-EM	-	-	Columna cromatográfica D1000H500 <sup>2</sup>	2.013	1	2.214,30	1	2.214,30
	-	-	Consola eléctrica <sup>2</sup>	238,34	1	262,17	1	262,17
-	-	-	Control de pH <sup>2</sup>	92,49	2	203,47	1	203,47



Tabla 7.6: Continuación costos de los equipos para la producción de rBoINF- $\alpha$  con *P. pastoris*Tabla 7.6: Continuación Costos de los Equipos para la Producción de rBoINF- $\alpha$  con *P. pastoris*

Etapas	Nomenclatura	Capacidad	Equipo	CE Neto [UF]	Cantidad	CEE [UF]	FI	CEI [UF]
	-	513,66 [L]	Medio C-IA Q. Sepharose fast flow	4.250,78	1	4.675,86	1	4.675,86
	-	199,5 [L]	Medio C-EM Superdex 75	2.410,10	1	2.651,11	1	2.651,11
	-	2,5 [m <sup>2</sup> ]	Membrana de ultrafiltración <sup>6</sup>	124,91	4	549,59	1	549,59
Recuperación	UF-1		Equipo ultrafiltración <sup>6</sup>	351,70	1	386,88	1,4	541,63
y Purificación	E-7	3.235 [L]	Estanque de buffer <sup>1</sup>	95,47	1	105,01	1,8	189,02
	E-8	10.273 [L]	Estanque de buffer <sup>1</sup>	190,96	1	210,06	1,8	378,10
	E-9	2.183 [L]	Estanque de retención <sup>1</sup>	75,40	1	82,94	1,8	149,29
	E-10	109 [L]	Estanque de retención <sup>1</sup>	34,45	1	37,90	1,8	68,21
	E-11	599 [L]	Estanque de buffer <sup>1</sup>	95,76	1	105,34	1,8	189,61
	E-12	108 [L]	Estanque de retención <sup>1</sup>	34,26	1	37,69	1,8	67,84
<b>Bombas</b>	B-1	0,33 [HP]	Bomba Centrífuga <sup>2</sup>	38,97	1	85,74	1,4	120,03
	B-4; B-5	5 [HP]	Bomba Centrífuga <sup>2</sup>	59,43	2	130,74	1,4	183,03
	B-2; B-3	2 [HP]	Bomba Centrífuga <sup>2</sup>	49,66	2	109,26	1,4	152,96
<b>Otros Equipos</b>	-		Autoclave <sup>5</sup>	719,32	1	791,25	1,1	870,38
	-		Caldera <sup>5</sup>	508,70	1	559,57	1,5	839,35
	-		Filtro de Aire <sup>4</sup>	73,42	6	484,57	1,65	799,54
			<b>Total</b>	-	-	<b>55.354,71</b>	-	<b>78.507,8</b>

Tabla 7.7: Costos de los equipos para la producción de rBoFN- $\alpha$  con *E. coli*Tabla 7.7: Costos de los Equipos para la Producción de rBoFN- $\alpha$  con *E. coli*

Etapa	Nomenclatura	Capacidad	Equipo	CE Neto [UF]	Cantidad	CEE [UF]	Fi	CEI [UF]
Esterilización	-	-	Microfiltro de 0,1 $\mu\text{m}$	7,59	2	16,69	1,65	27,54
Agua	W-1	2.880 [L/d]	Equipo purificador de agua	697,39	1	767,12	3	2.301,37
	E-1	2.500 [L]	Estanque de agua tipo 1 <sup>1</sup>	81,79	1	89,97	1,8	161,94
Propagación	FP-3	14 [L]	Biorreactor propagación 1	2.099	1	2.309,01	1,6	3.694,42
Producción	FU	200 [L]	Biorreactor de producción	5.235	1	5.758,71	1,6	9.213,93
	E-2	58 [L]	Estanque medio de cultivo <sup>1</sup>	23,59	1	25,95	1,8	46,72
	E-3	175 [L]	Estanque glicerol <sup>1</sup>	45,77	1	50,35	1,8	90,62
	E-4	23 [L]	Estanque lactosa <sup>1</sup>	13,55	1	14,90	1,8	26,82
C-1; C-2	1 [m <sup>2</sup> /h]		Centrifuga de discos	803,48	1	883,82	1,3	1.148,97
HO-1	80 [L/h]		Homogeneizador	33,01	1	36,31	1,3	47,20
C-1A	-		Columna cromatográfica D350H900 <sup>2</sup>	926,76	1	1.019,43	1	1.019,43
-	-		Consola eléctrica <sup>2</sup>	209,38	1	239,65	1,2	276,77
C-EM	-		Columna cromatográfica D800H500 <sup>2</sup>	1.416,89	1	1.558,58	1	1.558,58
-	-		Consola eléctrica <sup>2</sup>	238,61	1	262,47	1	314,96
-	-		Skid de proceso Talla 3 <sup>2</sup>	4.896,61	1	5.386,27	1,4	7.540,77
-	-		Control de pH <sup>2</sup>	92,49	2	203,47	1	203,47
-	62,99 [L]		Medio C-1A Q Sepharose fast flow	1.205,99	1	1.326,58	1	1.326,58
-	127,67 [L]		Medio C-EM Superdex 75	1.843,83	1	2.028,22	1	2.028,22
-	2,5 [m <sup>2</sup> ]		Membrana de ultrafiltración <sup>6</sup>	124,91	1	137,40	1	137,40

Tabla 7.8: Continuación costos de los equipos para la producción de rBoIFN- $\alpha$  con *E. coli*Tabla 7.8: Continuación Costos de los Equipos para la Producción de rBoIFN- $\alpha$  con *E. coli*

Etapa	Nomenclatura	Capacidad	Equipo	CE Neto [UF]	Cantidad	CEE [UF]	Fi	CEI [UF]
	UF-1	-	Equipo ultrafiltración <sup>6</sup>	153,09	1	168,40	1,4	237,76
	E-5	50 [L]	Estanque preparación buffer <sup>1</sup>	21,58	1	23,74	1,8	42,74
	E-6	162 [L]	Estanque preparación buffer <sup>1</sup>	43,70	1	48,07	1,8	86,52
Recuperación	E-7	150 [L]	Estanque preparación buffer <sup>1</sup>	41,73	1	45,90	1,8	82,62
y Purificación	E-8	1.547 [L]	Estanque preparación buffer <sup>1</sup>	60,57	1	66,63	1,8	119,93
	E-9; E-11	10 [L]	Estanque preparación buffer <sup>1</sup>	8,22	2	18,08	1,8	32,54
	E-10	587 [L]	Estanque preparación buffer <sup>1</sup>	94,61	1	104,07	1,8	187,33
Bombas	B-1; B-3	0,33 [HP]	Bombas Centrífugas <sup>3</sup>	38,97	2	77,94	1,4	109,12
	B-2; B-4; B-5	2 [HP]	Bombas Centrífugas <sup>3</sup>	49,66	3	148,98	1,4	208,58
	-	-	Filtro de Aire <sup>4</sup>	73,42	4	323,06	1,65	533,04
Otros Equipos	-	-	Caldera <sup>5</sup>	488,43	1	537,27	1,5	805,91
	-	-	Autoclave <sup>5</sup>	719,32	1	791,25	1,1	870,38
			<b>Total</b>	-	-	<b>24.482</b>	-	<b>34.511,97</b>

(1) Langpu Co. Ltda, China (Cotización, 2016)

(2) Verdot Ips2 (Cotización, 2016)

(3) BPH Pump &amp; Equipment, Inc (cotización, 2016)

(4) Filterpore, Chile (Valor actualizado de 2011)

(5) Cortes, 2014 (Valor actualizado 2011)

(6) Millipore Co. Ltda, USA (Valor actualizado 2014)

## Terreno

El costo del terreno es el único costo de capital que no está sujeto a depreciación, al contrario de los equipos u otros costos de capital, por lo general se considera aparte y no se sumará como costo de capital fijo directo.

## Acondicionamiento de terreno

Se refiere a los costos de nivelación del terreno, creación de caminos, veredas y cercado de la planta. Se considerará que es un 5% del costo del terreno (Peters et al., 2003).

## Edificaciones

Estos costos están referidos a los materiales, suministros y manos de obra necesaria para la construcción de los edificios relacionados con la planta. Se tomará un valor del 20% del costo de equipos entregados (Towler & Sinnott, 2008).

## Instrumentación y control, cañerías, instalaciones eléctricas

Se estima que estos costos son un porcentaje del costo entregado por cada equipo, este porcentaje depende de los materiales con los que se trabaja en la planta. En la Tabla 7.9 se muestran los porcentajes para plantas donde los equipos trabajan con material líquido.

Tabla 7.9: Porcentaje de costos entregado para el cálculo de costos por I&C, cañerías e instalaciones eléctricas (Towler G. y R.Sinnott, 2008).

Item	Porcentaje del costo entregado
Instrumentación y control	10%
Cañerías	40%
Instalaciones eléctricas	15%

## Instalación de servicios

Se considera como instalación de servicio a lo necesario para el suministro de combustible, agua, electricidad, así como también las instalaciones necesarias en la eliminación de residuos, los talleres, los casinos, etc.

Estos costos son cercanos al 25% del costo de los equipos entregados en una planta procesadora de líquidos (Peters & Timmeerhaus, 1991).

En la Tabla 7.10 se muestran los resultados obtenidos del total de costos de capital fijo directo.

Tabla 7.10: Resultados de los costos de capital fijo directo para proceso productivo con *P. pastoris* y *E. coli*.

Ítem	Costo <i>P. pastoris</i> [UF]	Costo <i>E. coli</i> [UF]
Equipos instalados	78.507,80	34.511,97
Acondicionamiento de terreno	525	450
Edificaciones	11.070,94	4.896,40
Instrumentación y control	5.535,47	2.448,19
Cañerías	22.141,89	9.792,79
Instalaciones eléctricas	8.303,21	3.672,29
Instalaciones de servicios	13.839	6.120,49
<b>Total Capital Fijo Directo</b>	<b>139.823</b>	<b>61.892,17</b>

#### b) Costos de Capital Fijo Indirectos (CFI)

Estos costos no están relacionados con la instalación, pero se requieren para el funcionamiento y la producción de la planta. Se incluyen en estos costos el trabajo de ingeniería y diseño, así como también los costos de oficina, contabilidad, viajes y comunicaciones.

##### Gastos legales

Son los costos necesarios para efectuar las gestiones legales de manera que la empresa cumpla con la legislación interna del país. Se estima que estos costos son aproximadamente un 2% de los costos de los equipos entregados (Peters et al., 2003).

##### Pago a contratistas

Se supone el pago a contratistas varía entre un 2 y un 8% del CFD (Peters & Timmeerhaus, 1991). Se tomará un valor promedio del 4%.

##### Contingencia

Estos costos se consideran para compensar eventos imprevistos, ya sean cambios en los precios, cambios en el diseño, paros de la planta, desastres naturales, etc. Se

considera que este valor varía entre un 5 y 15% del total del capital fijo directo (Peters & Timmeerhaus, 1991). Se tomará un valor promedio del 10%.

### Ingeniería y supervisión

Estos costos incluyen los costos de diseño en detalle y otros servicios de ingeniería requeridos para llevar a cabo el proyecto de la construcción de la planta. Se utilizará un valor del 30% de los costos de los equipos entregados (Towler & Sinnott, 2008).

Los gastos de Capital Fijo Indirecto se resumen en la Tabla 7.11.

Tabla 7.11: Resumen los Gastos de Capital Fijo Indirecto.

Ítem	Costo <i>P. pastoris</i> [UF]	Costo <i>E. coli</i> [UF]
Gastos legales	1.107,09	489,64
Pago a contratista	2.214,19	979,28
Contingencia	5.535,47	2.448,19
Ingeniería y supervisión	16.606,41	7.344,60
<b>Total capital fijo indirecto</b>	<b>25.463,72</b>	<b>11.261,72</b>

### c) Capital de Trabajo

El capital de trabajo de una planta industrial, consiste en la cantidad total de dinero invertido en: materias primas y suministros de existencia; productos terminados en stock y productos semi terminados en proceso de fabricación; cuentas por cobrar; gastos de operación tales como sueldos y compras de materias primas y por último, cuentas e impuestos por pagar (Peters & Timmeerhaus, 1991).

Por lo general en las plantas químicas se considera el costo inicial de capital de trabajo entre un 10 y un 20% del total del costo de capital fijo (Peters *et al.*, 2003). Se tomará un valor del promedio del 15% del capital del capital fijo.

### d) Capital de Inversión Total

Habiendo calculado el capital fijo total, y considerando que la sumatoria de dicho valor y el capital de trabajo corresponde al total de la inversión, se obtienen los valores de inversión finales. La Tabla 7.12 resume los costos del capital de inversión.

Tabla 7.12: Resumen del Capital Total de Inversión

Item	Costo <i>P. pastoris</i> [UF]	Costo <i>E. coli</i> [UF]
Capital fijo directo	139.923	61.892,17
Capital fijo indirecto	25.463	11.261,72
Capital de trabajo	8.303,21	3.672,3
Costo de terreno	10.500	9.000
<b>Capital Total de Inversión</b>	<b>173.689,36</b>	<b>76.826,19</b>

## 7.2 COSTO TOTAL DE PRODUCCIÓN (CP)

El costo de producción contempla el costo de las materias primas, mano de obra y otros gastos generales. Estos costos se subdividen generalmente en dos principales categorías: costos de manufactura, también llamados costos operacionales, y gastos generales. Para el presente proyecto estos costos serán calculados en base anual, ya que se considera como una de las mejores alternativas para realizar una evaluación económica. Este es uno de los factores de mayor influencia dentro del análisis económico y representa todos los egresos relativos a la operación en planta, venta de producto y administración, entre otros.

### 7.2.1 Costos de Manufactura

En los costos de manufactura se consideran el costo de las materias primas y la mano de obra, y otros suministros necesarios para el funcionamiento de la planta como agua, electricidad y combustible.

#### Materias Primas

El costo por concepto de materia prima es uno de los ítems más relevantes del costo de producción. Se considera como materia prima el costo del medio de cultivo, medio de alimentación, los reactivos necesarios para equilibrar, lavar y eluir la resina en las etapas cromatográficas. La línea celular no se considera en este caso como materia prima, ya que será adquirida en un comienzo y se llegará a un acuerdo de pagar un porcentaje de las ganancias al creador de la cepa.

Este inventario está en función del costo y volumen de las materias primas que es necesario tener en la planta para que esta esté siempre operando. Para calcular el inventario de materias primas, es necesario conocer la cantidad que se ocupará

durante el proceso, en base al programa de producción. Así se obtienen las cantidades según los balances de masa realizados en el Capítulo 4.

Debido a que los lotes de producción no varían considerablemente año a año, los costos de materias primas para la producción de la proteína de interés, se considera que la producción de la planta no crecerá anualmente. El resumen de los costos anuales de materias primas se muestra en la Tabla 7.13 para la producción con *P. pastoris*.

Tabla 7.13: Costos Materias Primas para la Producción de rBoIFN- $\alpha$  con *P. pastoris*.

Medio	Nutriente	Kg/Lote	Kg/año	Precio USD/kg	USD/ año	UF/año
BSM	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	26,81	1.367,54	81,69	11.720,53	2.769,44
	CaSO <sub>4</sub>	3,66	186,51	56,90	10.611,77	263,05
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,39	172,72	58,25	10.059,89	249,37
	KOH	15,16	773,15	18,38	14.211,53	352,29
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	17,88	912,11	45,39	41.396,89	1.026,19
	Glicerol	112,98	5.762,04	1,03	5.910,23	146,51
	Glucosa	1,43	72,80	3,89	283,01	7,02
Alimentación	Metanol	1.086,15	55.393,81	0,84	58.651,55	1.453,91
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	17,09	871,46	102,12	88.991,49	2.206,01
	NaI	0,23	11,62	180,98	2.102,82	52,13
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	8,54	435,73	67,32	29.334,23	727,17
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,57	29,05	209,53	6.086,58	150,88
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,06	2,9	24,74	71,85	1,78
	CoCl <sub>2</sub>	1,42	72,62	691,38	50.208,78	1.244,62
	ZnCl <sub>2</sub>	56,96	2.904,86	89,26	259.283,85	6.427,38
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	185,11	9.440,79	100,61	959.791,88	23.544,36
	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	0,57	29,05	34.130,11	991.431,11	24.576,55
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25,63	1.307,18	59,76	78.114,45	1.936,38	
					<b>Total</b>	<b>67.1135,02</b>



Tabla 7.14: Continuación Costo Materias Primas Fermentación para la producción de rBoIFN- $\alpha$  con *P. pastoris*

Medio	Nutriente	Kg/Lote	Kg/año	Precio USD/kg	USD/ año	UF/año
Cromatografía de Intercambio Iónico	Dilución					
	Tris-HCl	20,8	1.060,8	186,08	197.395,5	4.893,23
	NaCl	300,2	15.309,2	8,38	128.309,9	3.180,67
	Tris-HCl	81	4.128,5	186,08	768.229	19.043,67
	EDTA	3	153	96,82	14.813,9	367,22
	Sacarosa	513,7	26.196,2	23,52	616.263,4	15.276,53
	PMSF	1,8	91,3	8.282,90	756.146,4	18.744,09
Cromatografía de Exclusión Molecular	NaCl	5,3	267,75	11,58	3.100,6	76,86
	NaPO <sub>4</sub>	3,5	180,03	43,57	7.844	194,44
					<b>Total</b>	<b>61.776,65</b>

Tabla 7.15: Costos Materias Primas para la Producción de rBoIFN- $\alpha$  con *E. coli*.

Medio	Nutriente	Kg/Lote	Kg/año	Precio USD/kg	USD/ año	UF/año
Medio de Cultivo	Glucosa	6,78	691,76	6,48	4.482,32	11,11
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,09	519,14	91,53	47.515,95	1.177,87
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,02	103,99	74,89	7.787,53	193,04
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,17	17,74	100,45	1.781,73	44,17
	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,24	24,25	28,53	691,74	17,15
	FeCl <sub>3</sub> *H <sub>2</sub> O	0,06	5,64	104,39	588,38	14,59
	ZnCl <sub>2</sub>	0,81	82,34	89,26	7.348,15	182,15
	CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	1,56	159,24	323,75	51.553,05	1.277,95
	CuCl <sub>2</sub>	3,28	334,23	182,30	60.020,15	1.510,37
	MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	2,38	242,81	67,32	16.346,31	405,21
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,98	99,55	209,53	20.858,16	517,05
	Ext. Levadura	0,96	98,32	122,24	12.018,02	297,91
Alimentación	Lactosa	2,812	286,82	116,49	33.412,18	828,25
	Glicerol	9,750	994,50	1,03	1020,08	25,29
<b>Total</b>					<b>6.602,11</b>	

Tabla 7.16: Continuación Costos Materias Primas para la Producción de rBoIFN- $\alpha$  con *E. coli*.

Medio	Nutriente	Kg/Lote	Kg/año 1	Precio USD/kg	USD/Año	UF/Año	
Cromatografía de Intercambio Iónico	Dilución	Tris-HCl	0,988	101,82	186,08	18.947,50	469,69
	Iónico	NaCl	36,77	3.750,72	8,38	31.435,65	779,26
		Tris-HCl	9,92	1.011,49	186,08	188.219,13	4.665,76
		EDTA	0,37	37,51	96,82	3.632,05	90,03
		Sacarosa	62,92	6.418	23,52	150.984,66	3.742,75
		PMSF	0,22	22,36	8.282,9	185.210,11	4.591,17
Cromatografía de Exclusión Molecular	Molecular	NaCl	4,29	437,23	11,58	5.063,27	125,51
		NaPO <sub>4</sub>	2,88	294,18	43,57	12.817,66	317,74
<b>Total</b>						<b>14.781,91</b>	

Tabla 7. 17: Costos Materias Primas para la Formulación de rBoIFN- $\alpha$  de *P. pastoris*

Compuesto	Kg/Lote	Kg/año	Precio USD/kg	USD/ año	UF/año
Glicina	86,27	4.399,66	83	365.151,74	9.051,73
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,92	505,96	59,37	30.040,75	744,68
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,37	120,99	132,28	16.016,16	397,02
<b>Total</b>					<b>10.193,44</b>

Tabla 7.18: Costos Materias Primas para la Formulación de rBoIFN- $\alpha$  de *E. coli*

Compuesto	Kg/Lote	Kg/año	Precio USD/kg	USD/ año	UF/año
Glicina	47,5	4.845	99,59	402.113,01	9.967,97
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,46	556,92	71,25	33.066,39	819,68
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,31	133,62	158,85	17.687,97	438,47
<b>Total</b>					<b>11.226,11</b>

**Mano de Obra**

El costo de mano de obra depende de la cantidad de operarios y personal que se requiere para el funcionamiento de la planta, los que se detallan en la Tabla 7.19. El número de operarios requeridos se basa en lo determinado en el Capítulo 6 de la organización de la planta. Para la determinación de estos valores se obtuvo un estimado del sueldo líquido para cada cargo por medio de una base de datos pública del Gobierno de Chile (Ministerio de Educación, Gobierno de Chile, 2016). Los meses pagados en el año son considerados como trece meses, correspondientes al año de trabajo y al mes de indemnización asociado a ese año de trabajo en caso de que el trabajador sea despedido.

Tabla 7.19: Costo de mano de obra para producción con *P. pastoris* y *E. coli*

Cargo	Perfil	N° personas	Sueldo Neto [CLP/mes]	Sueldo Bruto [CLP/mes]	Sueldo [UF/Año]
Jefe de Planta	Ingeniero Civil Bioquímico	1	2.500.000	3.000.000	1.462,9
Secretaría	Secretariado Ejecutivo Gerencial	1	500.000	600.000	292,6
Jefe de Producción	Ingeniero de Ejecución en Bioprocesos	1	1.200.000	1.440.000	702,2
Jefe de Turno	Ingeniero de Ejecución en Bioprocesos	4	800.000	960.000	1.872,5
Operario de Planta	Técnico Operador de Plantas Industriales	8	600.000	720.000	2.808,7
Supervisor de Calidad	Técnico Nivel Superior en Gestión y Control de Calidad	1	550.000	660.000	321,8
Analista Bioquímico	Bioquímico	1	700.000	840.000	409,6
Jefe de Investigación	Ingeniero Civil Bioquímico	1	1.200.000	1.440.000	702,2
Investigador	Bioquímico	1	1.000.000	1.200.000	585,1
Investigador Externo	Sujeto a evaluación	1	700.000	840.000	409,6
Personal de Aseo	Personal de Aseo	1	300.000	360.000	175,5
Contador Auditor	Contador Auditor	1	1.083.300	1.300.000	663,90
Jefe Comercial	Ingeniero Comercial	1	1.333.333	1.600.000	780,19
Asistente Comercial	Técnico Comercial	1	833.333	1.000.000	487,62
Supervisión de Mantenimiento	Ingeniero Mecánico	1	1.083.300	1.300.000	663,90
Técnico de Mantenimiento	Técnico Mecánico Industrial	2	750.00	900.000	877,71
Encargado de Prevención	Técnico en Prevención de Riesgos	1	1.083.300	1.300.000	663,90
<b>Total</b>				<b>13.789,8</b>	

## Suministros básicos

A partir de los balances de masa, balance de energía y diseño de los equipos, se presentan varios suministros que deben considerarse en la evaluación económica, entre los más importantes se encuentran el agua, la electricidad y el combustible.

- Agua

Las aguas de proceso consideradas en este ítem son las ocupadas en la disolución del medio de cultivo y de alimentación, diluciones, buffers, biorreactores y el agua para la generación de vapor y para enfriamiento. El precio aproximado del metro cúbico de agua es determinado según lo informado por Esval S.A., cuyo valor es de 0,53 [USD/m<sup>3</sup>], incluyendo el tratamiento de agua y el alcantarillado. En la Tabla 7.20 y 7.21 se indican los requerimientos necesarios y valores de las aguas de los proceso.

Tabla 7.20: Requerimientos hídricos en proceso productivo de rBoIFN- $\alpha$  con *P. pastoris*

Etapa	Nomenclatura	Tipo	Litros de Agua/Lote	Litros de Agua/Año
Preparación medio de cultivo	BMS	Agua tipo I	93,09	4.747,59
	PTM1	Agua tipo I	712,22	36.323,22
	Glicerol	Agua tipo I	86,35	4.403,85
	Metanol	Agua tipo I	1.895,23	96.656,73
Fermentación en biorreactores	FP1	Agua tipo I	9,81	500,31
	FP2	Agua tipo I	98,1	5.003,1
	FU	Agua tipo I	981	50.031
Recuperación y purificación	Buffer E-7	Agua tipo I	52	2.652
	Buffer C-IA	Agua tipo I	10.273	523.923
	Buffer C-EM	Agua tipo I	598,5	30.523,5
Enfriamiento	-	Agua tipo II	165.216,82	8.426.057,82
Esterilización	-	Agua tipo II	121,21	6.181,71
<b>Total</b>			<b>180.138,93</b>	<b>9.187.085,43</b>

Tabla 7.21: Requerimientos hídricos en proceso productivo de rBoIFN- $\alpha$  con *E. coli*

Etapa	Nomenclatura	Tipo	Litros de Agua/Lote	Litros de Agua/Año
<b>Preparación medio de cultivo</b>	Medio	Agua tipo I	34,94	3.563,88
	Glicerol	Agua tipo I	65	6.630
	Lactosa	Agua tipo I	7,6	775,2
<b>Fermentación en Biorreactores</b>	FP0	Agua tipo I	0,56	57,12
	FP1	Agua tipo I	0,84	85,68
	FP2	Agua tipo I	11,33	1.155,66
	FU	Agua tipo I	125	12.750
<b>Recuperación y Purificación</b>	E-5	Agua tipo I	20	2.040
	E-6	Agua tipo I	95	9.690
	E-7	Agua tipo I	2,5	255
	C-IA	Agua tipo I	1.258,83	128.400,66
	C-EM	Agua tipo I	489	49.878
<b>Enfriamiento</b>	-	Agua tipo II	1.466,15	149.547,3
<b>Esterilización</b>	-	Agua tipo II	57,18	5.832,36
<b>Total</b>			<b>3.635,2</b>	<b>370.790,4</b>

Tabla 7.22: Costos de Agua en el Proceso Productivo con *P. pastoris* y *E. coli*

	Consumo [m <sup>3</sup> /Año]	Precio [USD/m <sup>3</sup> ]	USD/Año	UF/Año
Proceso <i>P. pastoris</i>	9.187,09	0,53	4.869,16	0,18
Proceso <i>E. coli</i>	370,79	0,53	196,52	0,0073

- Electricidad

Por concepto de electricidad se consideran los consumos de los equipos determinados en el balance de energía y diseño de equipos. El precio de la electricidad se estimó en 0,13 [USD/kWh] según precios recientes (Chilectra, 2017). En la tabla 7.23 se detallan los requerimientos necesarios de cada ítem y el costo de estos.

Tabla 7.23: Requerimientos Energéticos en proceso Productivo de rBoIFN- $\alpha$  con *P. pastoris* y *E. coli*

Equipos	Consumo [kWh/año]	
	Proceso <i>P. pastoris</i>	Proceso <i>E. coli</i>
C-1	188,7	377,4
C-2	-	377,4
HO-1	-	561
C-IA	6.018	4.012
UF	23,46	7,43
C-EM	302,05	234,6
B-1	779,11	263,36
B-2	48,59	5,00
B-3	177,07	10,42
B-4	310,53	39,88
B-5	80,38	24,50
Agitación Fermentadores	543,45	74,29
Agitación Estanques	45,54	45,37
<b>Total [kWh/año]</b>	<b>8.516,88</b>	<b>6.032,65</b>

Tabla 7.24: Costos de Energía Eléctrica en el Proceso Productivo de rBoIFN- $\alpha$  con *P. pastoris* y *E. coli*

	Consumo [kWh/Año]	Precio [USD/kWh]	USD/Año	UF/Año
<b>Proceso <i>P. pastoris</i></b>	8.516,88	0,17	1.447,87	35,89
<b>Proceso <i>E. coli</i></b>	6.032,65	0,17	1.025,55	25,42

- Combustible

El costo por combustible se refiere principalmente al combustible necesario para el requerimiento de energía en la caldera. El combustible a utilizar es Diesel, distribuido en Chile por ENAP, cuyo valor mantiene un precio fluctuante de aproximadamente 472,48 [CLP/kg] (ENAP, 2017). El costo total de este suministro se detalla en la Tabla 7.27.



Tabla 7.25: Costo de combustible en el Proceso Productivo de rBoIFN- $\alpha$  con *P. pastoris* y *E. coli*.

	<b>Combustible</b> [kg/Año]	<b>Precio</b> [CLP/kg]	<b>UF/Año</b>
Proceso <i>P. pastoris</i>	288,81	472,48	5,12
Proceso <i>E. coli</i>	272,48	472,48	4,83

Dados los resultados, en la Tabla 7.26 se resumen los costos asociados a suministros básicos de agua, electricidad y combustible.

Tabla 7.26: Resumen de Costos de Suministros Básicos en el Proceso Productivo con *P. pastoris* y *E. coli*

<b>Ítem</b>	<b>Costo [UF/año]</b>	<b>Costo [UF/año]</b>
	<i>P. pastoris</i>	<i>E. coli</i>
Suministro de agua	120,72	4,87
Suministro de electricidad	35,89	25,42
Suministro de combustible	5,12	4,83
<b>Total</b>	<b>161,73</b>	<b>35,12</b>

### Mantenimiento y Reparaciones

El costo de mantención general de la planta se puede tomar como un 6% del Capital fijo de Inversión Total (Peters et al., 2003). El costo de mantenimiento y reparaciones tiene un valor de 9.923 [UF/año] para la producción de rBoIFN- $\alpha$  en *P. pastoris* y de 4.389 [UF/año] en *E. coli*.

### Suministros operacionales

Estos son suministros ocupado para mantener el proceso funcionando eficientemente. Ejemplo de estos artículos son lubricantes, test de productos químicos, productos de mantenimiento y otros suministros similares que no pueden ser considerados como materias primas o de mantenimiento y materiales de reparación. El costo anual de este tipo de suministro es de aproximadamente un 7% del costo total de mantenimiento y de reparaciones (Timmerhaus & West, 2003), equivalente a 694 [UF/año] para la producción de rBoIFN- $\alpha$  en *P. pastoris* y 307 [UF/año] para la producción de rBoIFN- $\alpha$  en *E. coli*.

## Costos de Laboratorio

La planta necesita disponer de un laboratorio tanto para un control de calidad de la materia prima y el producto, como para llevar a cabo la investigación y desarrollo de nuevas metodologías. Este costo se puede estimar de forma rápida como un 10 a 20% del costo de la mano de obra del departamento de producción (Peters & Timmerhaus, 1991).

Los costos de laboratorio tienen un valor de 856 [UF/año] para la producción de rBoIFN- $\alpha$  en *P. pastoris* y de 856 [UF/año] para la producción de rBoIFN- $\alpha$  en *E. coli*.

## Seguros

El seguro a la propiedad suele ser considerado como un gasto fijo no variable. Puede ser considerado como un 1% del capital fijo de inversión (Peters et al., 2003), cuyo valor corresponde a 1.653 [UF/año] para *P. pastoris* y 732 [UF/Año] para *E. coli*.

En la Tabla 7.27 se resumen los costos de manufactura para ambos procesos productivos.

Tabla 7.27: Resumen de Costos de Manufactura de la Planta

Ítem	Costo [UF/Año] <i>P. pastoris</i>	Costo [UF/Año] <i>E. coli</i>
Materias primas	139.105,11	32.610,13
Mano de Obra	13.789,82	13.789,82
Suministros básicos	162	35
Mantenimiento y reparaciones	9.923	4.389
Suministros operacionales	694	307
Laboratorio	856	856
Seguros	1.654	732
<b>Total Costos de Manufactura</b>	<b>166.184</b>	<b>52.718</b>

## 7.2.2 Gastos Generales

### Depreciación

El equipamiento, los inmuebles y otros materiales involucrados en una planta de manufactura presentan una disminución de su valor en el tiempo denominado depreciación, y la determinación de este valor es importante a la hora de considerar el

costo de los impuestos (Peters & Timmerhaus, 1991). Existen diversos métodos de cálculo de la depreciación, definidos según la vida útil y valor residual establecidos para cada uno de los bienes; una de estas metodologías muy utilizada en proyectos de ingeniería es la depreciación lineal que considera la diferencia del costo inicial y el valor residual dividido en la cantidad de años de la vida útil del bien, donde la maquinaria se deprecia a una tasa anual del 10% del capital invertido y los inmuebles a una tasa del 3% (Peters & Timmerhaus, 1991).

Sin embargo, el Servicio de Impuestos Internos (SII) de Chile ha fijado en la “Nueva Tabla de Vida Útil”, vigente desde 2003, que la depreciación para la maquinaria general tiene una vida útil de 15 años y se deprecia de forma acelerada en 5 años (Servicio de Impuestos Internos, 2003). Este tipo de depreciación se calcula de la misma forma que la depreciación lineal (Ecuación 7.5) pero dividiendo por la cantidad de años de depreciación.

$$d = \frac{V_o - V_R}{n}$$

Ecuación 7.5

Dónde,

d: Depreciación

$V_R$ : Valor residual

$V_o$ : Valor inicial

n: Periodo de depreciación

Se decidió considerar un valor residual equivalente al 10% del valor inicial. La depreciación no se presentará en esta sección sino que como parte del flujo de caja.

### **Gastos de Administración**

Estos costos son referidos a salarios de administradores, secretarías, contadores, costos de suministros y equipo de oficina como gastos de fotocopias, impresora, llamadas telefónicas, comunicaciones con el exterior, administrativas y otros artículos generales relacionados con las actividades administrativas. Este gasto varía entre el 15 al 25% del costo de la mano de obra del departamento de producción (Peters et al.,

2003). En este caso se tomará el 20%, resultado en 1.141 [UF/año] para la producción de rBoIFN- $\alpha$  en *P. pastoris* y en *E. coli*.

### Distribución y Marketing

Es necesario considerar los gastos involucrados en la venta de los productos, esto incluye, suministros y otros gastos para oficina de ventas. Los costos de distribución y marketing varían dependiendo del material producido; estos costos para la mayoría de las plantas de productos químicos o bioquímicos están en el rango del 2 al 20% del costo total de producción. Este valor se estima como el 11% del costo de manufactura (Towler & Sinnott, 2008), lo que equivale a 18.280,21 [UF/año] para la producción de rBoIFN- $\alpha$  en *P. pastoris* y de 5.799,03 [UF/año] para la producción de rBoIFN- $\alpha$  en *E. coli*.

### Investigación y desarrollo

Dado que la producción de la proteína rBoIFN- $\alpha$  en *E. coli* inducido por lactosa es un tema que aún no está totalmente desarrollado es necesario tener un equipo de investigación para el desarrollo de nuevas metodologías, por otro lado si bien comparativamente existen más estudios sobre producción de la proteína rBoIFN- $\alpha$  en *P. pastoris*, para ambos casos los procesos pueden ser optimizados.

Los costos para investigación y desarrollo se consideran entre un 2 - 5% de las ventas (Peters & Timmerhaus, 1991). Sin embargo, como el departamento de investigación y desarrollo cumple un rol importante en el rubro, se destinará un valor del 15% del costo de mano de obra a dicho departamento. Resultando en 254,54 [UF/año] para la producción de rBoIFN- $\alpha$  en *P. pastoris* y en *E. coli*.

En la Tabla 7.28 se resumen los costos generales de la planta.

Tabla 7.28: Resumen de costos generales de la planta

Ítem	Costo [UF/año]	
	<i>P. pastoris</i>	<i>E. coli</i>
Gasto de administración	1.141,02	1.141,02
Distribución y mercadeo	18.280,21	5.799,03
Investigación y desarrollo	254,54	254,54
<b>Total gastos generales</b>	<b>19.675,77</b>	<b>7.194,59</b>

### 7.3 INGRESOS

Para esta evaluación, los ingresos anuales corresponderán a las ventas realizadas de la proteína. Para determinar el precio de la proteína rBoIFN- $\alpha$ , se debe tener en cuenta que las plantas producen una proteína recombinante para uso farmacéutico veterinario, producto que actualmente no se encuentra en el mercado en el formato propuesto en este proyecto (adyuvante). Por lo que el valor se estima a partir de valores encontrados de proteína rBoIFN- $\alpha$  en el mercado pero para otras aplicaciones. Los precios de la proteína recombinante comercializada son similares y resultan en un valor promedio de aproximadamente 44,8 [USD/ $\mu$ g de rBoIFN- $\alpha$ ], a este precio la dosis mínima requerida para añadir como adyuvante a una vacuna alcanza valores muy elevados como para ser comercializado como fármaco veterinario, esto debido a que los precios encontrados son de IFN bovinos cuya finalidad es la aplicación en kits de elisa. Para poder fijar precios menores a los mencionados anteriormente se optó por buscar valores de interferones de otras especies, como por ejemplo, el interferón porcino (rPoIFN- $\alpha$ ), proteína que posee similares propiedades antivirales y antiproliferativas que el interferón BoIFN- $\alpha$ . El PoIFN- $\alpha$  recombinante se vende a \$370 [USD] las  $1 \times 10^5$  [UI], con esto, de acuerdo a la actividad del interferón por mg de proteína se obtiene un valor de 4,1 [USD/ $\mu$ g de IFN]; si bien este es un valor considerablemente menor al estimado a partir de los precios de rBoIFN- $\alpha$  (para kit de Elisa) encontrados en el mercado, aún sigue siendo un valor comercial alto, para el mercado objetivo al cual se apunta.

Con la finalidad de realizar el ejercicio para obtener la rentabilidad de ambos proyectos, el precio se estimará como un valor agregado al precio promedio de un set de vacunas aplicadas comunmente en bovinos en la industria pecuaria. En la Tabla 7.29 se presentan los precios de algunas de las vacunas más comunmente aplicadas en bovinos.

Tabla 7.29: Valores comerciales de vacunas para bovino

<b>Vacuna</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Precio [USD]/dosis</b>
<b>IBR-DVB</b>	Vacuna para la prevención de Rinotraqueítis Infecciosa y Diarrea Viral	0,502
<b>Viral Feed Lot</b>	Vacuna para la prevención de problemas respiratorios y oculares causados por virus y bacterias del Complejo Respiratorio Bovino	1,452
<b>Trivirus Neumovac Q</b>	Vacuna para la prevención de Rinotraqueitis Infecciosa, Diarrea Viral, Parainfluenza, Bronquitis Viral, Queratoconjuntivitis, Pasteurelosis y Haemofilus	1,248
<b>Neumoenteritis</b>	Vacuna elaborada con cepas de Escherichia coli, Salmonellas y Pasteurellas para la prevención de la Neumoenteritis de los terneros	1,087
<b>Airmix</b>	Vacuna contra IBR, DVB, PI3, ERSB, Pasteurelosis, Hemofilosis y Queratoconjuntivitis Infecciosa	0,915

(Mercosur, 2017).

Luego, el precio promedio resulta en 1,041 [USD]/vacuna, debido a la alta actividad y pureza de la proteína el valor agregado a la vacuna será fijado en un 20%, por lo que el precio resulta en 0,208 USD por dosis de rBoIFN- $\alpha$  agregada a una vacuna.

Para realizar el análisis de la rentabilidad, es necesario tener en cuenta la cantidad de producto formado. En la Tabla 7.30 se muestran los datos que fueron obtenidos en el Capítulo 4 de balance de masa.

Tabla 7.30: Resultados principales del balance de masa para la capacidad de la planta

Producto	Volumen de producción [g/año]
BolFN- $\alpha$ producido por <i>P. pastoris</i>	25.150,31
BolFN- $\alpha$ producido por <i>E. coli</i>	25.450

#### 7.4 FLUJO DE CAJA

La proyección del flujo de caja es un elemento muy importante al momento de analizar un proyecto, debido a que la evaluación del mismo se efectuará sobre los que se determina de ella (Sapag y Sapag, 2008).

Para desarrollar el flujo de caja se consideran como costos fijos: la mano de obra, los costos de mantenimiento y reparaciones, suministros de operación, costos de laboratorio, seguros, materia prima y suministros básicos. En primer lugar, la mano de obra se mantiene constante durante todos los años del estudio y cualquier reajuste económico ya es considerado por la unidad monetaria utilizada (UF); el resto de los costos se estiman relativamente constantes, ya que la planta comienza su puesta en marcha a un 100% de capacidad en ambos casos, utilizando la totalidad de sus equipos y capacidad administrativa, pudiendo asumir que no existirá una variación muy significativa de estos costos asociados.

Por otro lado, los costos variables se reducen a los costos de materias prima, específicamente en el downstream, ya que las resinas cromatográficas tienen un periodo útil de 2 años, por lo que cada dos años se debe comprar este material.

#### 7.5 RENTABILIDAD DEL PROYECTO

Para medir la rentabilidad del proyecto y poder conocer su flujo de caja, es necesario incorporar los efectos tributarios de la depreciación, impuesto, utilidades y pérdidas para analizar la rentabilidad del proyecto.

En primer lugar es importante conocer el impuesto a la renta; dada la naturaleza del proyecto, el cual se presenta como una empresa de producción industrial, cae en el impuesto de primer categoría (impuesto a la renta) el cual se considera 24% sobre las utilidades devengadas (Servicio de Impuesto Internos, 2017).

El análisis de la rentabilidad del proyecto se realiza mediante indicadores financieros como TIR o VAN, conceptos que se desarrollarán más adelante en este capítulo. La tasa interna de retorno del proyecto (TIR) es un indicador de rentabilidad relativa, por

lo cual, cuando se hace una comparación de tasa de rentabilidad interna de dos proyectos no se tiene en cuenta la posible diferencia en las dimensiones de los mismos. Una gran inversión, con una TIR baja, puede tener un valor actual neto (VAN) superior a un proyecto con una inversión pequeña y una TIR elevada. Obtener una rentabilidad positiva quiere decir obtener mayores beneficios que la cantidad invertida para la obtención de los mismos (Riggs et al., 2002).

La tasa mínima atractiva de retorno (TRMA) es la cantidad obtenida como ganancia en relación a la cantidad original, constituye una tasa de retorno razonable establecida como base para determinar si una alternativa es económicamente viable (Riggs et al., 2002). Se propone un TRMA del 15% desde el punto de vista del inversionista.

El estudio de evaluación económica se realiza comúnmente usando como tiempo de operación los primeros diez años del proyecto, en el cual se considera una depreciación acelerada, según lo permite el servicio de impuestos internos.

La depreciación se aplica sólo para los inmuebles y los equipos (sin incluir los costos anexos del equipo) que se devalúan mediante el transcurso de los años por su utilización y antigüedad. Según lo que propone el Servicio de Impuestos Internos de Chile, el periodo usual de depreciación para equipos industriales en general es de 15 años y para las edificaciones de 30 años. La ley chilena también permite utilizar la depreciación acelerada correspondiente cada tres años para bienes inmuebles. Esta se calcula de acuerdo a la ecuación 7.6.

$$d = \frac{C_i - C_f}{\frac{n}{3}}$$

Ecuación 7.6

Dónde,

d: Depreciación acelerada, [UF].

C<sub>i</sub>: Costo inicial del bien, [UF].

C<sub>f</sub>: Costo final del bien o valor libro, para este proyecto se 10% del valor inicial, [UF].

n: Periodo de depreciación.



Los resultados para la depreciación en ambos procesos se detalla en la Tabla 7.31.

Tabla 7.31: Depreciación de los costos de edificación y equipos instalados.

Ítem	Valor [UF]		Duración [Años]	Años de Depreciación	Depreciación [UF/año]	
	<i>P. pastoris</i>	<i>E. coli</i>			<i>P. pastoris</i>	<i>E. coli</i>
Costo equipos	79.507,80	34.511,97	15	5	14.131,40	6.212,2
Costo edificación	11.070,94	4.896,4	30	10	996,4	440,68
<b>Total</b>					15.127,8	6.652,9

A partir de lo anterior expuesto, se presenta en la Tabla 7.32 y 7.33 el flujo de dinero del proyecto para cada proceso de producción.

Dónde,

D: Depreciación.

FAI: Flujo antes de impuesto = Ingreso – Costos.

FSI: Flujo sujeto a impuesto = FAI – D.

FDI: Flujo después de impuesto = FAI – Impuesto.

Tabla 7. 32: Flujo dinero [UF] durante los 10 primeros años de operación de la planta productora de rBofFN- $\alpha$  en *P. pastoris*.

Tabla 7.32: Flujo de dinero [UF] durante los 10 primeros años de operación de la planta productora de rBofFN- $\alpha$  en *P. pastoris*

Año	Ingresos [UF]	Inversión [UF]	Costos Fijo [UF]	Costos variables [UF]	FAI [UF]	Depreciación	FSI [UF]	Impuestos	FDI
0		-173.689,36			-173.689,36				-173.689,36
1	324.520,43	-	166.183,73	7.326,97	151.009,73	15.127,79	135.881,94	32.612	118.398,07
2	324.520,43	-	166.183,73	0,00	158.336,70	15.127,79	143.208,91	34.370	123.966,56
3	324.520,43	-	166.183,73	7.326,97	151.009,73	15.127,79	135.881,94	32.612	118.398,07
4	324.520,43	-	166.183,73	0,00	158.336,70	15.127,79	143.208,91	34.370	123.966,56
5	324.520,43	-	166.183,73	7.326,97	151.009,73	15.127,79	135.881,94	32.612	118.398,07
6	324.520,43	-	166.183,73	0,00	158.336,70	996,38	157.340,32	37.762	120.575,02
7	324.520,43	-	166.183,73	7.326,97	151.009,73	996,38	150.013,35	36.003	115.006,53
8	324.520,43	-	166.183,73	0,00	158.336,70	996,38	157.340,32	37.762	120.575,02
9	324.520,43	-	166.183,73	7.326,97	151.009,73	996,38	150.013,35	36.003	115.006,53
10	324.520,43	-	166.183,73	0,00	158.336,70	996,38	157.340,32	37.762	120.575,02

Tabla 7.33: Flujo de dinero [UF] durante los 10 primeros años de operación de la planta productora de rBofFN- $\alpha$  en *E. coli*.

Tabla 7.33: Flujo de dinero [UF] durante los 10 primeros años de operación de la planta productora de rBofFN- $\alpha$  en *E. coli*

Año	Ingresos [UF]	Inversión [UF]	Costos Fijo [UF]	Costos variables [UF]	FAI [UF]	Depreciación	FSI [UF]	Impuestos	FDI
0		-76.826,19			-76.826,19				-76.826,19
1	328.387,40	-	52.728,00	3.355	272.304,60	6.652,83	265.651,77	63.756	208.548,18
2	328.387,40	-	52.728,00	0	275.659,40	6.652,83	269.006,57	64.562	211.097,82
3	328.387,40	-	52.728,00	3.355	272.304,60	6.652,83	265.651,77	63.756	208.548,18
4	328.387,40	-	52.728,00	0	275.659,40	6.652,83	269.006,57	64.562	211.097,82
5	328.387,40	-	52.728,00	3.355	272.304,60	6.652,83	265.651,77	63.756	208.548,18
6	328.387,40	-	52.728,00	0	275.659,40	440,68	275.218,73	66.052	209.606,91
7	328.387,40	-	52.728,00	3.355	272.304,60	440,68	271.863,92	65.247	207.057,26
8	328.387,40	-	52.728,00	0	275.659,40	440,68	275.218,73	66.052	209.606,91
9	328.387,40	-	52.728,00	3.355	272.304,60	440,68	271.863,92	65.247	207.057,26
10	328.387,40	-	52.728,00	0	275.659,40	440,68	275.218,73	66.052	209.606,91

### 7.5.1 Rentabilidad del proyecto para la producción rBoIFN- $\alpha$ en *P. pastoris*.

Para los valores de la Tabla 7.32, el valor actual neto (VAN) del proyecto es de 427.869,36 [UF] para una TRMA del 15%, obteniéndose además una tasa interna de retorno (TIR) de 69%.

Además con este flujo de caja también se determina el *payback* o “plazo de recuperación”, el cual es menor a un año para este proyecto con las condiciones de precio de los productos y la TRMA propuesta. En la Figura 7.1 se ve representado lo expuesto.

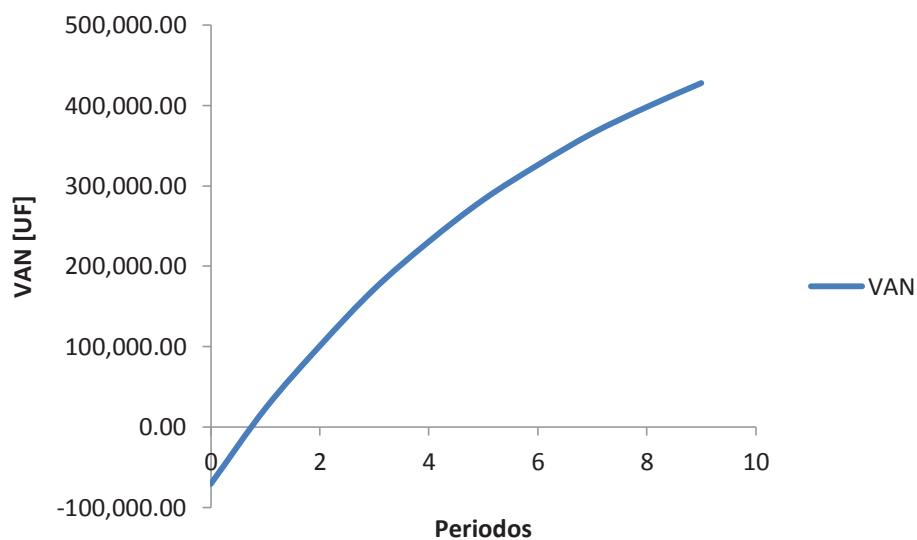


Figura 7.1: Payback del proyecto, producción de rBoIFN- $\alpha$  en *P. pastoris*

Otra forma de apreciar el análisis de este proyecto es la variación del valor actual neto (VAN) con respecto a la variación de la TRMA en un periodo de evaluación de 10 años, como se puede observar en la Figura 7.2.

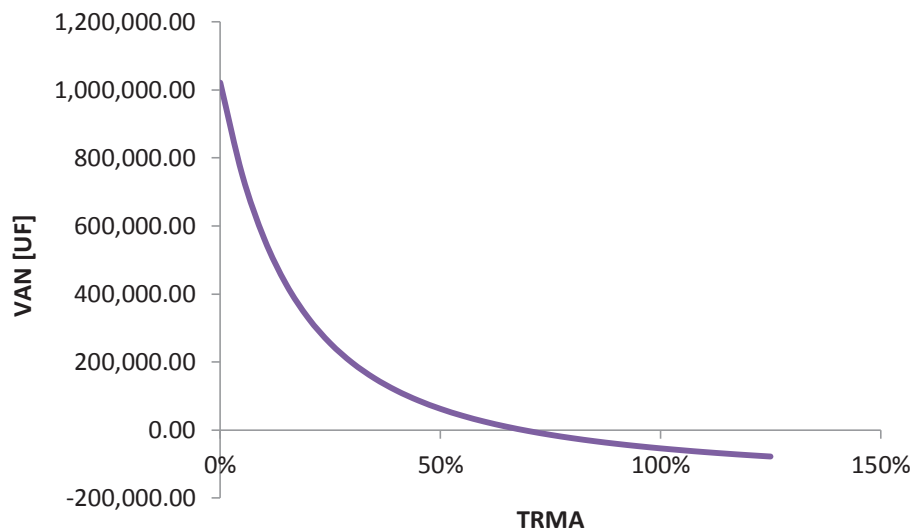


Figura 7.2: Variación del VAN con respecto a la TRMA, producción de rBoIFN- $\alpha$  en *P. pastoris*

En la Figura 7.2 se aprecia que el valor actual neto del proyecto tiene un valor positivo hasta que el TRMA alcanza un valor de 69%, el cual es un valor alto para la industria productora, por lo que sería un proyecto bastante atractivo para el inversionista.

Finalmente, se analiza el TIR del proyecto en un periodo de evaluación de diez años (ver Figura 7.3).

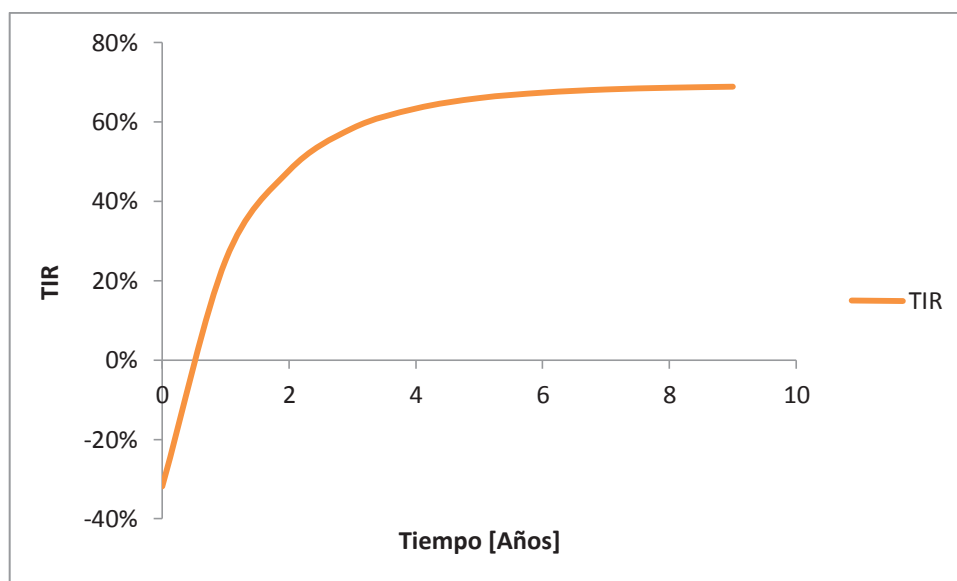


Figura 7.3: Análisis del TIR en el periodo de 10 años para la producción de rBoIFN- $\alpha$  en *P. pastoris*

En la Figura 7.3 se puede apreciar que la TIR a partir del primer año es mayor que la TRMA del proyecto, lo que significa que desde el primer año comienza a ser rentable, llegando a los 10 años a una TIR de 69%.

### 7.5.2 Rentabilidad del proyecto para la producción a rBoIFN- $\alpha$ en *E. coli*

De acuerdo a los valores de la Tabla 7.33, el valor actual neto (VAN) del proyecto es de 973.295,74 [UF] para un TRMA del 15%, además se obtuvo una TIR del 272%. Con estos resultados se puede determinar que la producción de rBoIFN- $\alpha$  resulta muy rentable. Además con estos flujos de caja el payback o “plazo de recuperación es de menos de 1 año con las condiciones de precio del producto y la TRMA propuesta.

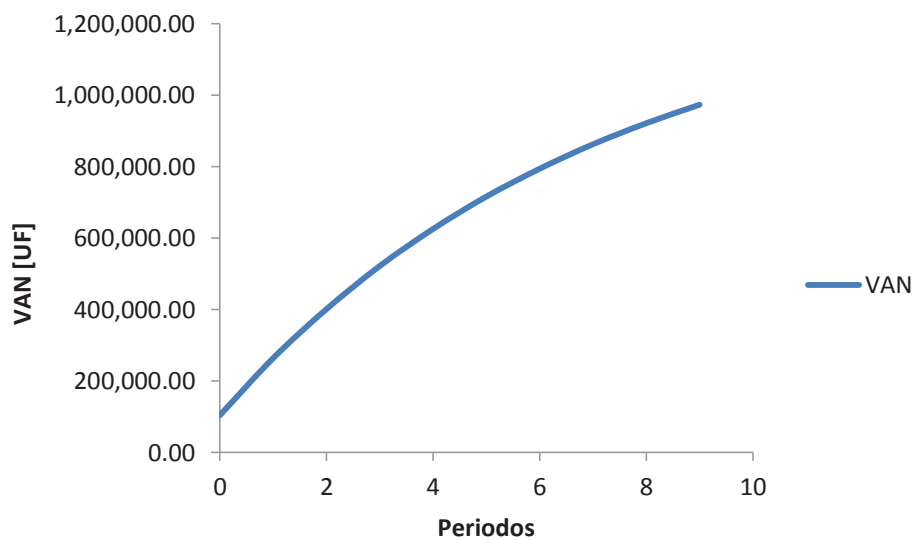


Figura 7.4: Payback del proyecto, producción de rBoIFN- $\alpha$  en *E. coli*

Otra forma de apreciar el análisis de este proyecto es la variación del valor actual neto (VAN) con respecto a la variación de la TRMA en un periodo de evaluación de 10 años, como se puede observar en la Figura 7.5.

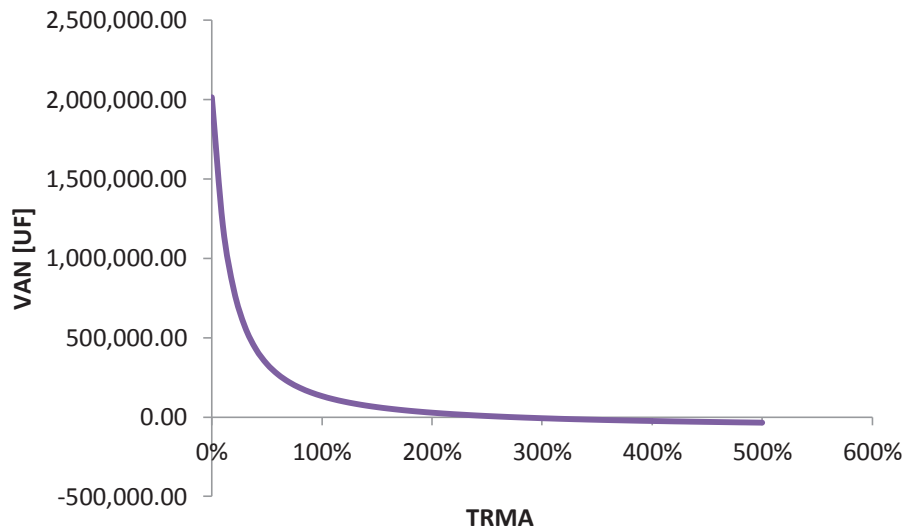


Figura 7.5: Variación del VAN con respecto a la TRMA, producción de rBoIFN- $\alpha$  en *E. coli*

En la Figura 7.5 se aprecia que el valor actual neto del proyecto tiene un valor positivo hasta que el TRMA alcanza un valor de 272%, el cual es un valor alto para la industria productora, por lo que sería un proyecto bastante atractivo para el inversionista.

Finalmente, se analiza el TIR del proyecto en un periodo de evaluación de diez años (ver Figura 7.6).

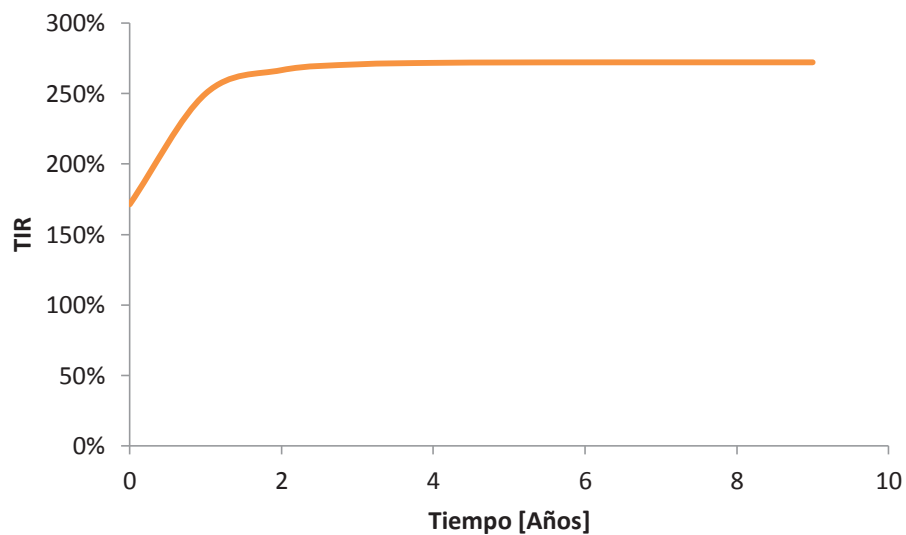


Figura 7.6: Análisis del TIR en el periodo de 10 años para la producción de rBoIFN- $\alpha$  en *E. coli*

En la Figura 7.6 se puede apreciar que la TIR a partir del primer año es mayor que la TRMA del proyecto, lo que significa que desde el primer año comienza a ser rentable, llegando a los 10 años a una TIR de 272%.

Finalmente, comparando los resultados del análisis de rentabilidad para ambos proyectos, lo primero que se puede determinar es que ambos proyectos a las condiciones determinadas resultan rentables. Al comparar los indicadores de rentabilidad calculados en este capítulo, tanto la TIR que resulta ser mayor a la TRMA propuesta y el VAN siendo mayor a 0 en ambos casos, ambos proyectos son aceptables.

Si comparamos ambos proyectos la TIR mayor se presenta en el proyecto de producción de rBoIFN- $\alpha$  en *E. coli* y al analizar los valores actuales netos (VAN) el mayor se da en el caso del proyecto de producción de rBoIFN- $\alpha$  en *E. coli*. Por lo tanto, tomando en cuenta los resultados para ambos indicadores, este el proyecto que presenta mayor rentabilidad y el cual debiese primar a la hora de elegir cual se podría llevar a cabo.

## 7.6 ANALISIS DE SENSIBILIDAD

En este punto se busca analizar cómo varían los indicadores económicos, seleccionados para evaluar la rentabilidad, en escenarios diferentes al presentado anteriormente. Por lo cual, se evaluará la variación en el precio de la materia prima y el precio de venta de la proteína de acuerdo a lo señalado anteriormente.

### 7.6.1 Análisis de sensibilidad para la alternativa de producción en *P. pastoris*

#### a) Variación en la materia prima: Medio BSM, PTM1 y Medio de Alimentación

Los distintos escenarios que serán evaluados se mueven dentro de un rango de costo desde un 50% menor al actual hasta un costo 50% mayor. En la Figura 7.7 se presentan los resultados, donde se observa un comportamiento lineal en el cambio de los indicadores VAN y TIR. Se puede apreciar que a pesar de los cambios en el costo de la materia prima, el proyecto sigue siendo rentable con un VAN mayor a 0 y la TIR sigue siendo mayor a la TRMA en el rango seleccionado; y solo con un aumento del costo de la materia prima a un 239% ocurriría un impacto real en el proyecto y éste dejaría de ser rentable.

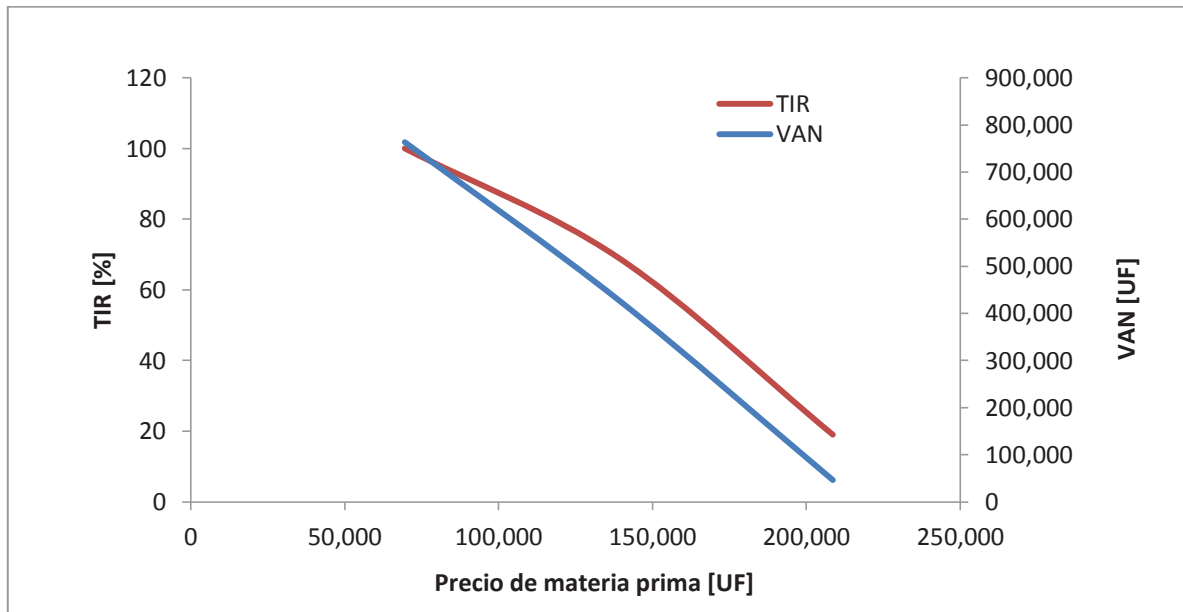


Figura 7. 7: Análisis de sensibilidad para una variación del 50% en el precio de la materia prima en proceso de producción con *P. pastoris*.

#### b) Variación Precio de Venta de rBoIFN- $\alpha$

Al igual que con la materia prima, el precio de la proteína recombinante es evaluado aumentando y disminuyendo su costo en un 50%. Los resultados se muestran en la Figura 7.8, donde se puede observar un comportamiento lineal de los indicadores. En este escenario, el proyecto resulta rentable hasta que el VAN comienza a ser negativo, esto ocurre cuando el precio de venta de la proteína es de alrededor de 0,139 [USD/dosis], por lo que a este precio ya no sería rentable utilizando valores de venta de la proteína iguales o menores al mencionado.



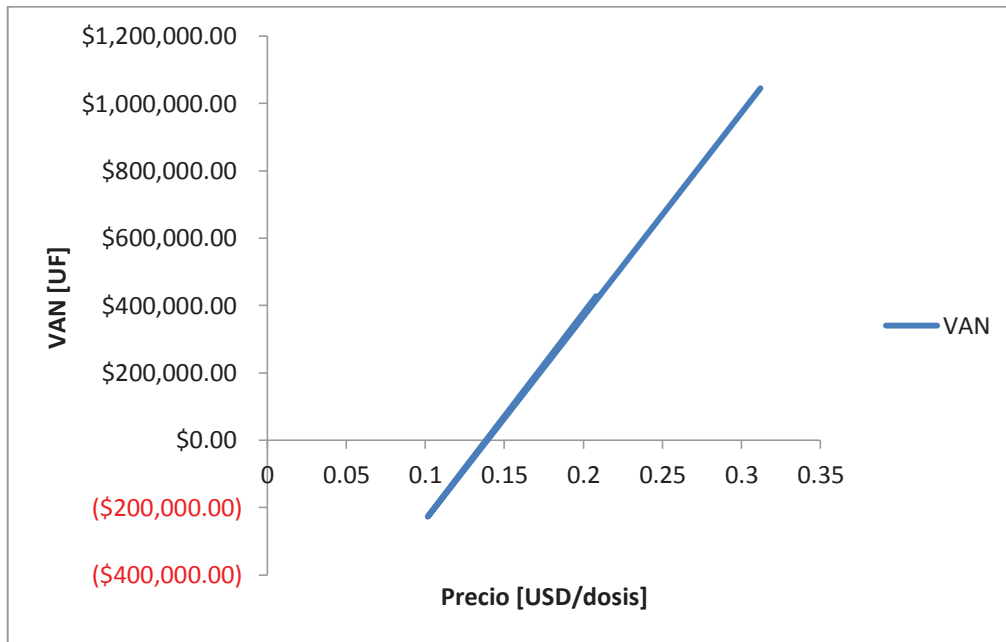


Figura 7. 8: Análisis de sensibilidad para una variación del 50% en el precio de venta de la proteína rBoIFN- $\alpha$  en proceso productivo con *P. pastoris*.

## 7.6.2 Análisis de sensibilidad para la alternativa de producción en *E. coli*

### a) Variación en la materia prima

Al igual que para *P. pastoris* se evalúan distintos escenarios que van desde un costo de materia prima un 50% menor al valor actual hasta un costo 50% mayor. En la Figura 7.9 se presentan los resultados, donde se observa un comportamiento lineal en el cambio de los indicadores VAN y TIR. Destacando que a pesar de los cambios en el costo de la materia prima, la TIR siguen siendo mayor a la TRMA en el rango seleccionado, por lo que el proyecto sigue siendo rentable y solo con un aumento del costo de la materia prima a un 804% se provocaría un impacto real en el proyecto, llevándolo a un VAN igual a cero.

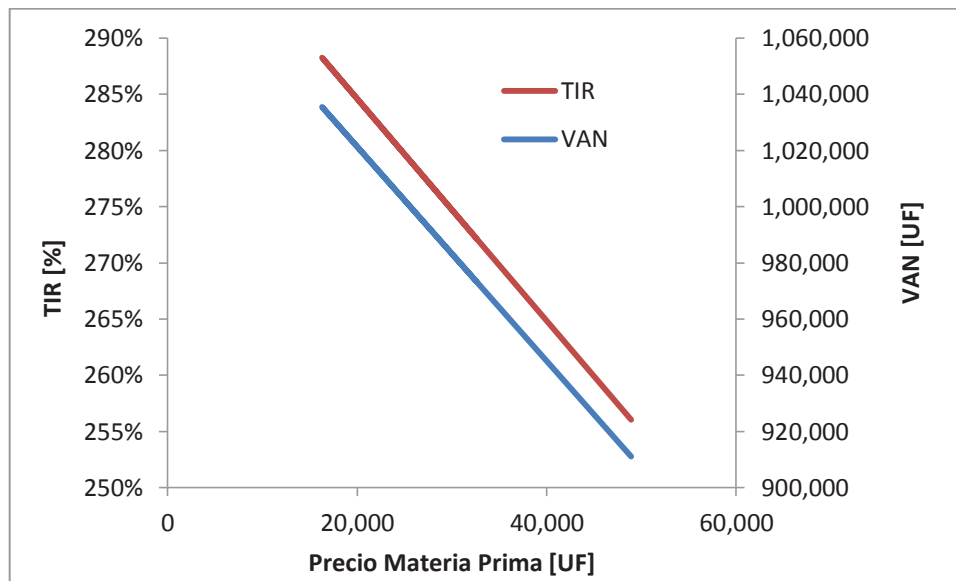


Figura 7.9: Análisis de sensibilidad para una variación del 50% en el precio de la materia prima en proceso de producción con *E.coli*.

#### b) Variación Precio de Venta de rBoIFN- $\alpha$

Del mismo modo que con la materia prima, el precio de la proteína es evaluado aumentando y disminuyendo su costo en un 50%. Los resultados se presentan en la Figura 7.10. Se puede apreciar que a pesar de los cambios en el precio de venta de la proteína, el proyecto sigue siendo rentable con un VAN mayor a 0 y la TIR sigue siendo mayor a la TRMA en el rango seleccionado; y solo con una disminución del precio a 0,05 [UDS/dosis] ocurriría un impacto real en el proyecto y éste dejaría de ser rentable.

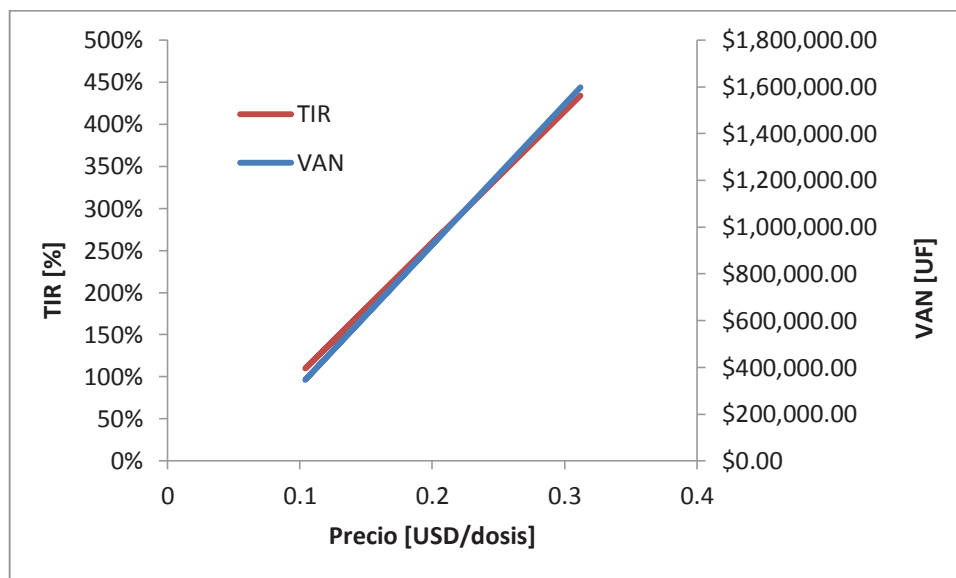


Figura 7.10: Análisis de sensibilidad para una variación del 50% en el precio de venta de la proteína rBoIFN- $\alpha$  en proceso productivo con *E. coli*.

## 7.7 REFERENCIAS CAPÍTULO 7

Banco Central de Chile. (Diciembre 2016). Indicadores Diarios. Obtenido de <http://si3.bcentral.cl/indicadores/secure/indicadoresdiarios.aspx>

Guitart, J. (diciembre 2014). Subgerente Kaufen Propiedades. *Cotización terrenos Quinta Region*.

Matche. Matche's Process Equipment Cost Estimates. In: Matche's Process Equipment Cost Estimates (on line). 15 October 2007. (cited 1 December 2015). Available from: <http://www.matche.com/EquipCost/>.

Peters M., K.Timmerhaus y R.West. (2003). Analysis of Costs Estimation. In: Plant Design and Economics for Chemical Engineers, 5 ed, .pp. 235-275. New York: McGraw-Hill.

Peters, M. S., y Timmerhaus, K. D. (1991). Plant Design and Economics for Chemical Engineers, McGraw-Hill. New York. Riggs, J., Bedworth, D., y Randhawa, S. (2002). Ingeniería Económica (Cuarta ed.). México, D.F: Alfaomega grupo editorial, S.A.

Sapag, N. y R. Sapag. 1991. Valorización económica de las variables técnicas. En: Preparación y Evaluación de Proyectos, N. Sapag y R. Sapag (Eds.). 2 ed.pp. 116-127. Ciudad de México: Mc. Graw

Towler G. y R.Sinnott. 2008. Costing and Project Evaluation. In: Chemical Engineering Design Principles, Practice and Economics of Plant and Process Design, pp. 297-392. California: Elsevier.

Ministerio de Educación, Gobierno de Chile, (2016). *Buscador de empleabilidad e ingresos: mifuturo.cl*. Obtenido de <http://mifuturo.cl>

Chilquinta Energía S.A., (2016). *Valor Tarifa – Chilquinta Energía*. Obtenido de <http://www.chilquinta.cl/mi-hogar/hogar/seccion/21/valor-tarifa.html>

ENAP. Tabla de Precios Paridad. En: Tabla de Precios Paridad (en línea). 3 de Diciembre del 2009. (Citado el 10 de Diciembre del 2016). Disponible desde: [http://www.enap.cl/comercial\\_relations/tabla\\_precios\\_paridad.php](http://www.enap.cl/comercial_relations/tabla_precios_paridad.php).

ESVAL (2016). Tarifas de Agua Potable y Alcantarillado. Obtenido de <http://portal.esval.cl/oficina-virtual/tarifas/>

Servicio de Impuestos Internos, (2003). *Nueva Tabla de Vida Útil de los bienes activos inmovilizados*. Obtenido de [http://www.sii.c/página/valores/bienes/tabla\\_vida\\_enero.htm](http://www.sii.c/página/valores/bienes/tabla_vida_enero.htm)

## CAPÍTULO 8

### DISCUSIONES

#### 8.1 DISCUSIONES

El uso de los interferones está ampliamente desarrollado en la medicina humana. Actualmente existen varios laboratorios que los producen bajo diferentes nombres, y su uso también es variado, aunque especialmente se producen como polvos inyectables para tratar ciertos tipos de cáncer y hepatitis. En medicina veterinaria su uso es más bien acotado, siendo el interferón  $\omega$  felino el que se comercializa como medicamento para tratar la leucemia en perros y gatos. Sin embargo, el carácter de mascota que tienen estos animales hace que este medicamento pueda ser rentable en el ámbito de la medicina veterinaria doméstica.

Situación a parte es la que se discute en este proyecto, ya que a pesar de su comprobada eficacia en el tratamiento de ciertas enfermedades, el tratamiento con interferones no resulta adecuado para su uso en la industria pecuaria, debido a los altos precios asociados a este producto. Específicamente el interferón alfa bovino, sólo existe como producto para ser comercializado como proteína en ensayos analíticos y su valor asciende a.

Numerosos estudios llevados a cabo en la década de 1980 comprobaron la efectividad del interferón alfa bovino en el tratamiento de enfermedades en bovinos una vez manifestadas en el animal, sin embargo, no se consiguió hacer de estos tratamientos un negocio rentable. La utilización del IFN- $\alpha$  bovino como adyuvante en el desarrollo de vacunas también fue estudiada, pero no exhaustivamente, por lo que la evidencia que existe al respecto es más bien limitada (Capítulo 2).

En este proyecto se plantea la opción de utilizar el IFN- $\alpha$  bovino como adyuvante para uso en vacunas destinadas a la prevención de enfermedades de tipo viral en el ganado bovino latinoamericano. Se analizaron las situaciones de Argentina, Colombia, Brasil, Paraguay, Uruguay y Chile, y se determinó bajo supuestos que el IFN- $\alpha$  bovino puede añadirse de manera rentable a las vacunas contra la rabia, diarrea viral bovina, fiebre aftosa, y Rinotraqueítis como adyuvante potenciando así el efecto de la vacuna sobre la respuesta inmune del animal. Sin embargo, no existen ensayos clínicos a la fecha que avalen el uso de interferón en cada una de estas vacunas, por lo que antes de pensar en abarcar un mercado tan grande como el latinoamericano, primero deben

hacerse pruebas a nivel local para ver el verdadero impacto económico y veterinario que pudiera tener el agregar rBoIFN- $\alpha$  como adyuvante.

## 8.2 CONCLUSIONES

A través de la evaluación técnica-económica se pudo determinar que la producción de la proteína rBoIFN- $\alpha$  es rentable a partir de ambos sistemas biológicos, *E. coli* y *P. pastoris*, teniendo en cuenta los indicadores económicos seleccionados (VAN y TIR) para un periodo de diez años.

Con ambos sistemas de producción se puede satisfacer la demanda determinada en el Capítulo 2 para el tratamiento preventivo de enfermedades virales en el ganado bovino.

Los factores que más afectan la rentabilidad del proyecto son, el precio de venta de la proteína rBoIFN- $\alpha$ , el precio de las materias primas y las resinas cromatográficas. Se estableció un precio de 0,208 [USD/dosis de rBoIFN- $\alpha$ ] para una dosis de 0,4 mg rBoIFN- $\alpha$ /vacuna, lo cual es razonable de acuerdo a lo expuesto en el punto 7.3 del Capítulo 7, generando un aumento de un 20% en el precio de cada vacuna. Con estas consideraciones el proceso productivo resulta rentable tanto para la producción de la proteína recombinante en *E. coli* como en *P. pastoris*. Sin embargo de acuerdo a los indicadores económico utilizados para evaluar la rentabilidad de los proyecto, el proyecto de producción más rentable es a partir del cultivo de células de *E. coli* alcanzando una TIR de 272%, que es mucho mayor a la tasa de retorno mínima aceptable (TRMA) de 15% dada por los inversionistas, y un VAN de 973.295,74 [UF] versus un TIR de 69% y un VAN de 427.869,36 [UF] en el caso de la producción a partir del cultivo celular de *P. pastoris*.

Si bien ambos proyectos resultan rentables, es importante destacar que de los procesos de producción y recuperación y sobre todo de purificación de la proteína recombinante, se obtiene un producto de alta pureza por lo que el precio con el cual se estimó comercializar el producto se encontraría subvalorado. Debido a esto, se podría afinar más aun el proceso downstream y obtener una proteína recombinante altamente purificada pudiendo ser utilizada en tratamientos para enfermedades virales en humanos, o acotar el proceso downstream disminuyendo la pureza del producto a un nivel que sea aceptado para el tratamiento en animales y así reducir los costos asociados a producción, purificación y formulación, lo cual permitiría reducir el valor

agregado por vacuna y obtener un precio de venta de rBoIFN- $\alpha$  menor para el mercado objetivo.

### 8.3 RECOMENDACIONES

Siendo la producción en el sistema biológico *Escherichia coli* la más rentable y la que menor inversión necesita, no está del todo estudiado el proceso a mayor escala de producción de rBoIFN- $\alpha$  a través de la inducción con lactosa de *E. coli*. En este proyecto se asumió una alta productividad, y un bajo porcentaje de proteína insoluble en base a estudios realizados por El-Baky y colaboradores (2015). Sin embargo, en *E. coli* es común que la síntesis de proteínas resulte en un agregado insoluble y de baja o nula actividad biológica, conocido como cuerpos de inclusión. En este proyecto se trabajó desde el supuesto de recuperar la mayor cantidad de proteína soluble una vez realizado el proceso de disrupción celular, por lo que no se tuvo que recuperar desde cuerpos de inclusión, reduciendo considerablemente el procesamiento downstream de la purificación de rBoIFN- $\alpha$ .

Otro aspecto relevante es que la mayoría de los parámetros utilizados en el diseño del proceso fueron extraídos desde una extensa revisión bibliográfica lo que comprometería la reproducibilidad de los procesos, esto debido a que se carece de estudios categóricos sobre la manera óptima y a escalas mayores para producir interferón recombinante bovino en *E. coli* y en *P. pastoris*, por lo que se sugieren mayores pruebas de laboratorio y a escala piloto, sobre todo en la producción de proteína recombinantes a partir de la inducción con lactosa en *E. coli*, la producción en *P. pastoris* a través de la inducción de metanol y en los métodos de purificación. Se recomienda estudiar la separación cromatográfica de los productos durante la purificación de la proteína de manera de asegurar efectivamente las purezas de las corrientes de salida durante el proceso y así tener un balance de masa más preciso.

En ambos proyectos los procesos downstream entregan un productor de una alta pureza, mayor al 97%, se recomienda determinar la pureza suficiente para ser suministrada en animales de lo cual se sabe que es menor a 97%, lo cual reduciría considerablemente los costos de producción y la inversión inicial, ya que al requerir un porcentaje de pureza menor la etapa de purificación podría ser más acotada, eliminando por ejemplo una cromatografía, etapa que encarecen notablemente el proceso.

## APÉNDICES



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	i
APÉNDICE A.....	1
A.1 CÁLCULOS PARA ESCALAMIENTO DE COLUMNAS CROMATOGRÁFICAS .	1
A.2 TEORÍA DISEÑO CROMATOGRAFÍA .....	2
A.3 RELACIONES Y ECUACIONES BÁSICAS .....	8
A.3.a Cálculo de la velocidad volumétrica [ml/min] a partir de velocidad lineal [cm/h] para las cromatografías .....	8
A.3.b Cálculo de la velocidad lineal [cm/h] a partir de la velocidad volumétrica [ml/min] para las cromatografías .....	8
APÉNDICE B.....	9
B.1 GRÁFICOS DE PRUEBAS DE DESEMPEÑO DE CASSETTES PELLICON®	2 9
APÉNDICE C.....	10
C.1 SISTEMA DE CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO .....	10
APÉNDICE D.....	11
D.1 GRÀFICO PARA SELECCIÒN DE TUERÍAS .....	11
APÉNDICE E.....	13
E.1 GRÁFICAS PARA MICROFILTROS OPTICAP® DE MILLIPORE .....	13

## APÉNDICE A

### A.1 CÁLCULOS PARA ESCALAMIENTO DE COLUMNAS CROMATOGRÁFICAS

#### Consideraciones de escalamiento

La idea básica de la ampliación es preservar la calidad de la separación alcanzada a pequeña escala. Muchos parámetros afectan el éxito del escalamiento, incluyendo la estabilidad de la resina (físico y químico), el producto, el equipo (distribuidor de flujo, colector de fracciones, calidad del empaque, diseño del sistema) y las condiciones de operación (carga del producto, gradiente de pendiente). Como consecuencia, la altura del lecho puede aumentarse siempre que el caudal en unidades de volúmenes de columna/tiempo y carga en g/volumen de columna se mantenga constante. Aumentar la longitud de la columna mediante este procedimiento resultará en igual o mejor separación

La flexibilidad en el escalamiento se puede lograr empleando un escalamiento volumétrico. Este principio se basa en la teoría de que el tiempo de residencia para la proteína de interés controla la separación y, por lo tanto, debe mantenerse constante durante el aumento de escala. Como consecuencia la altura de la cama puede ser incrementada mientras la velocidad lineal en [cm/h] se mantenga constante.

Al trabajar con incrementos del flujo se pueden mantener los perfiles de elución, es decir, se mantiene el modelo Gaussiano y se mantiene el número de platos y se aumenta proporcionalmente el volumen de alimentación y el volumen de la columna. Considerando que el subíndice “b” describe los parámetros a escala laboratorio y “l” los parámetros a gran escala, tenemos las Ecuaciones A1 y A2.

$$N_l = N_b$$

Ecuación A1

$$\frac{V_{feed,l}}{V_{column,l}} = \frac{V_{feed,b}}{V_{column,b}}$$

Ecuación A2

Dónde,

N: número de platos teóricos

$V_{feed}$ : volumen alimentado

$V_{column}$ : volumen de la columna

Para determinar el diámetro de la columna a mayor escala, la Ecuación A3 puede ser reescrita de la siguiente manera:

$$\frac{V_{feed,l}}{V_{feed,b}} = \frac{V_{column,l}}{V_{column,b}} = \left(\frac{L_l}{L_b}\right) \cdot \left(\frac{D_{c,l}^2}{D_{c,b}^2}\right)$$

Ecuación A3

Dónde,

L: largo de la columna

$D_c$ : diámetro de la columna

## A.2 TEORÍA DISEÑO CROMATOGRAFÍA

### Generalidades de diseño

Para diseñar las columnas cromatográficas, debido a la falta de datos respecto a la interacción específica de la proteína rBoIFN- $\alpha$  con los geles utilizados en el proceso de purificación, se asume que se trabaja en la porción lineal de la isoterma de Langmuir que relaciona la concentración de soluto que se une a la fase estacionaria con la concentración del mismo soluto en la fase móvil; y que existe un perfil Gaussiano en la cromatografía. De esta manera se trabajará para el diseño con la combinación de las teorías “de Platos” y “Cinética”, de acuerdo a sus respectivas ecuaciones (Belter et al., 1988).

Por otro lado, dados los datos que se tienen de la proteína y los geles se realizará el diseño en primera instancia de la cromatografía de intercambio aniónico y luego de exclusión molecular de acuerdo a las teorías combinadas.

Teoría Cinética:

Esta teoría considera una secuencia de etapas y el balance de cada etapa corresponde al siguiente (Belter et al., 1988):

$$\left[ \begin{array}{l} \text{Acumulación de soluto} \\ \text{en líquido y adsorbente} \end{array} \right] = \left[ \begin{array}{l} \text{Dispersión de soluto} \\ \text{Entrada - Salida} \end{array} \right] + \left[ \begin{array}{l} \text{Convección de Solutos} \\ \text{Entrada - Salida} \end{array} \right]$$

$$\varepsilon \frac{\partial y}{\partial t} + (1 - \varepsilon) \frac{\partial q}{\partial t} = E \frac{\partial^2 y}{\partial z^2} - v \frac{\partial y}{\partial z}$$

Ecuación A4

Dónde,

$\varepsilon$ : Fracción de vacío del lecho

$q$ : Concentración por volumen de soluto

$v$ : Velocidad superficial

$E$ : Coeficiente de dispersión

$y$ : Concentración en la solución

Dejando “ $q$ ” en función de “ $y$ ” y resolviendo la ecuación diferencial luego de algunos arreglos, se obtiene el largo, que queda definido por la Ecuación A5.

$$L = \int_0^L dz = \frac{v}{k \cdot a} \cdot \int_{y_A}^y \frac{dy}{(y - y^*)}$$

Ecuación A5

Con,

$$HTU = \frac{v}{k \cdot a}$$

Ecuación A6

$$NTU = \int_{y_A}^y \frac{dy}{(y - y^*)}$$

Ecuación A7

Dónde,

L: Largo de la columna [cm]

v: Velocidad superficial [cm/h]

k: Coeficiente de transferencia de masa [cm/h]

a: Área por unidad de volumen

y: concentración en solución [mg/ml]

y\*: Concentración en solución al equilibrio con la concentración en el adsorbente [mg/ml]

HTU: Altura de una unidad de transferencia [cm]

NTU: Número de unidades de transferencia

Por otro lado, para calcular “k” y “a” se utilizan las ecuaciones Ecuación A8 y Ecuación A9 respectivamente (Belter et al., 1988).

$$k_L = 1,17 \cdot v \cdot \left( \frac{d_p \cdot v \cdot \rho}{\mu} \right)^{-0,42} \cdot \left( \frac{\mu}{D \cdot \rho} \right)^{-0,67}$$

Ecuación A8

Dónde,

d<sub>p</sub>: Diámetro de partícula de gel [cm]

μ: Viscosidad dinámica de solución [g/m·s]

ρ: Densidad solución [g/ml]

D: Coeficiente de difusividad [cm<sup>2</sup>/s]

$$a = 6 \cdot \frac{(1 - \varepsilon)}{d_p}$$

Ecuación A9

Dónde,

$d_p$ : Diámetro de partícula de gel [cm]       $\varepsilon$ : Porosidad del lecho

### Teoría de Platos:

El modelo de platos teóricos es uno de los más usados en el análisis de la cromatografía por elución. Sin embargo, este modelo tiene sus limitaciones en lo que se refiere al diseño y escalamiento de columnas, por lo que su uso es cada vez más limitado.

En el desarrollo de platos teóricos se supone que la columna se comporta como una serie de etapas de equilibrio. Cada etapa puede visualizarse como un adsorbedor tipo tanque de volumen constante. El solvente fluye de un tanque hacia otro, mientras que el adsorbente permanece fijo en su tanque respectivo.

Esta teoría considera una secuencia de etapas y el balance de cada etapa corresponde al siguiente (Belter et al., 1988):

$$\left[ \begin{array}{c} \text{Acumulación de soluto} \\ \text{en líquido} \end{array} \right] + \left[ \begin{array}{c} \text{Acumulación de soluto} \\ \text{en adsorbente} \end{array} \right] = \left[ \begin{array}{c} \text{Entrada de} \\ \text{solutos} \end{array} \right] + \left[ \begin{array}{c} \text{Salida de} \\ \text{Solutos} \end{array} \right]$$

$$\varepsilon V_s \frac{dy_n}{dt} + (1 - \varepsilon) V_s \frac{dq_n}{dt} = H(y_{n-1} - y_n)$$

Ecuación A10

Dónde,

$\varepsilon$ : Fracción de volumen de líquido en la etapa

$V_s$ : Volumen de la etapa

$y_n$ : Concentración de soluto en el líquido de la etapa n

$q_n$ : Concentración de soluto en el adsorbente

H: flujo de solvente

Asumiendo la isoterma lineal y luego algunas modificaciones, la expresión de concentración corresponde a la Ecuación A11.

$$y = \frac{y_A}{\sqrt{2 \cdot \pi \cdot N}} \cdot \exp \left[ \frac{-\left(\frac{V}{V_0} - 1\right)^2}{\frac{2}{N}} \right]$$

Ecuación A11

Dónde,

y: Concentración de proteína en tiempo t [mg/ml]

$y_A$ : Concentración de proteína en la alimentación [mg/ml]

N: Número de platos

V: volumen del solvente al tiempo t [L]

$V_0$ : volumen de solvente en el pico del perfil cromatográfico [L]

Sin embargo, la relación entre volúmenes no se conoce, debido a que estos valores debiesen ser determinados experimentalmente, por lo que se opta asumir que V y  $V_0$  son iguales, lo cual significaría que el volumen de elución corresponde exactamente al volumen para alcanzar el pico del perfil cromatográfico. De ésta manera, la expresión de la exponencial de la Ecuación A11 sería nula reduciendo la expresión a la expresada en la Ecuación A12 lo que facilita el cálculo del número de platos.

$$y = \frac{y_A}{\sqrt{2\pi \cdot N}}$$

Ecuación A12

y: concentración de soluto en la solución en la etapa n

$y_0$ : concentración máxima de soluto a la salida de la columna

Reemplazando los valores según el balance de masa en la Ecuación A13 se puede despejar que el número de platos es:

$$N = \left(\frac{y_A}{y}\right)^2 \cdot \frac{1}{2\pi}$$

Ecuación A13

Por lo que, por medio de la teoría de Platos se puede determinar el número teórico de platos de la cromatografía (N) según la Ecuación A13. Sin embargo, debido a que no se cuenta con las concentraciones en solución al final de etapa, se utilizará otra fórmula para obtener (N).

El número de platos teóricos, también conocido como la eficiencia de la columna, el número de placas teóricas es un concepto matemático y se puede calcular usando la Ecuación A14. Los números de placas teóricas son medida indirecta del ancho de pico para un pico a un tiempo de retención específico.

$$N = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2$$

Ecuación A14

N: número de platos teóricos

$t_R$ : Tiempo de retención

$w_h$ : Ancho del pico a la mitad de la altura (en unidades de tiempo)

### Teoría Combinada

Al resultar un poco engorroso definir la concentración que podría estar al equilibrio ( $y^*$ ) resulta complejo determinar el valor de NTU según la teoría cinética. Como solución, la teoría combinada permite igualar el número de platos teóricos (N) al número de unidades de transferencia (NTU), entregando una ecuación que permita calcular el largo de una columna cromatográfica como se puede observar en la Ecuación A15.

$$L = HTU \cdot N$$

Ecuación A15



Utilizando las ecuaciones anteriores, se determina “N” bajo la teoría de platos desde el cromatograma y se asume que equivale al número de unidades de transferencia (NTU), así obtenido el valor de HTU por medio de la Ecuación A15, permite utilizar la teoría combinada para calcular el largo de la columna cromatográfica.

### A.3 RELACIONES Y ECUACIONES BÁSICAS

#### A.3.a Cálculo de la velocidad volumétrica [ml/min] a partir de velocidad lineal [cm/h] para las cromatografías

$$Q \left[ \frac{ml}{min} \right] = \frac{v \left[ \frac{cm}{h} \right]}{60 \left[ \frac{min}{h} \right]} \cdot \pi \frac{d^2}{4} [cm^2]$$

Ecuación A16

Q: velocidad volumétrica

v: velocidad lineal

d: diámetro interno de la columna

#### A.3.b Cálculo de la velocidad lineal [cm/h] a partir de la velocidad volumétrica [ml/min] para las cromatografías

$$v \left[ \frac{cm}{h} \right] = \frac{Q \left[ \frac{ml}{min} \right] \cdot 60}{\pi \frac{d^2}{4} [cm^2]}$$

Ecuación A17

## APÉNDICE B

### B.1 GRÁFICOS DE PRUEBAS DE DESEMPEÑO DE CASSETTES PELLICON® 2

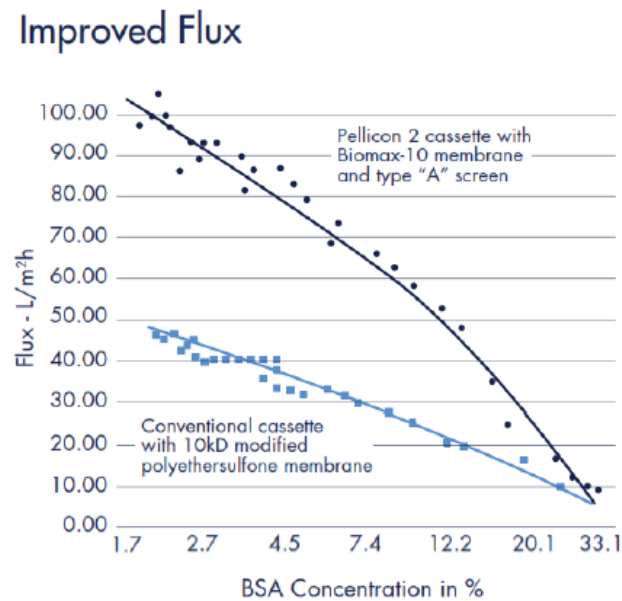


Figura B.1: Prueba de desempeño de filtros Pellicon® 2. Obtenido de Data Sheet Pellicon® 2 Filters and Holders de Millipore

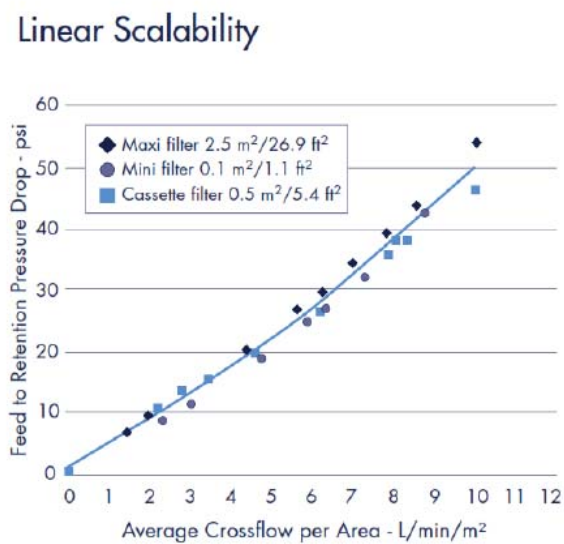


Figura B.1: Caída de presión de filtros Pellicon® 2 versus flujo promedio de solución 10% BSA. Obtenido de Data Sheet Pellicon® 2 Filters and Holders de Millipore

## APÉNDICE C

### C.1 SISTEMA DE CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Los sistemas se fabrican utilizando tubería sanitaria de 316 [L] de 5 "a 1", dependiendo del tamaño requerido del sistema, con flujo controlado utilizando lóbulo rotatorio, bombas peristálticas o de dosificación de diafragma.

Los componentes del Skid se alojan dentro de un marco que los protege. El marco, que está hecho de acero inoxidable con un diseño de construcción cerrado, también se utiliza para levantar el Skid. La superficie de trabajo del gabinete eléctrico está inclinada para mayor comodidad y visibilidad del sistema mientras el usuario está trabajando en la pantalla táctil.

En cada sistema, cada Skid de cromatografía Bio-Rad funciona sobre un rango predefinido de diámetros de columna y caudales de proceso. Es fácil seleccionar la categoría del Skid adecuado de la Tabla A.1 para sistemas de gradiente o isocráticos. Se puede apreciar en la tabla que los rangos de aplicación de las categorías de deslizamiento se superponen y, por lo tanto, es posible que uno o más Skid puedan manejar requisitos específicos, como se muestra en las tablas.

Se puede elegir un sistema de cromatografía de proceso, sabiendo que el equipo ha sido diseñado para ser flexible. Puede utilizarse para múltiples caudales y otros rangos de diámetros de columna.

		Column diameter (mm)										
		100	200	300	350	400	450	600	800	1,000	1,200	1,400
Linear speed (cm/h)	50		15,7	35,3	48	63	80	141	251	393	565	770
	75		23,6	53,0	72	94	119	212	377	589	848	1,155
	100		31,4	70,7	96	126	159	283	503	785	1,131	1,539
	125	9,8	39,3	88,4	120	157	199	353	628	982	1,414	1,924
	150	11,8	47,1	106,0	144	188	239	424	754	1,178	1,696	2,309
	175	13,7	55,0	123,7	168	220	278	495	880	1,374	1,979	2,694
	200	15,7	62,8	141,4	192	251	318	565	1,005	1,571	2,262	3,079
	225	17,7	70,7	159,0	216	283	358	636	1,131	1,767	2,545	3,464
	250	19,6	78,5	176,7	241	314	398	707	1,257	1,963	2,827	3,848
	275	21,6	88,4	194,4	265	346	447	778	1,382	2,160	3,110	4,233
	300	23,6	94,2	212,1	289	377	477	848	1,508	2,356	3,393	4,618
	325	25,5	102,1	229,7	313	408	517	919	1,634	2,553	3,676	5,003
	350	27,5	110,0	247,4	337	440	557	990	1,759	2,749	3,958	5,388
	400	31,4	125,7	282,7	385	503	636	1,131	2,011	3,142	4,524	
450	35,3	141,4	318,1	433	565	716	1,272	2,262	3,534	5,089		
500	39,3	157,1	353,4	481	628	795	1,414	2,513	3,927			
600	47,1	188,5	424,1	577	754	954	1,696	3,016	4,712			
700	55,0	219,9	494,8	672	880	1,113	1,979	3,519				

Tabla C.1: Compatibilidad de los Skid de procesos y los diámetros de columna, en sistemas con gradiente (Flujo, L/h).

		Column diameter (mm)										
		100	200	300	350	400	450	600	800	1,000	1,200	1,400
Linear speed (cm/h)	50		15,7	35,3	48	63	80	141	251	393	565	770
	75		23,6	53,0	72	94	119	212	377	589	848	1,155
	100	7,9	31,4	70,7	96	126	159	283	503	785	1,131	1,539
	125	9,8	39,3	88,4	120	157	199	353	628	982	1,414	1,924
	150	11,8	47,1	106,0	144	188	239	424	754	1,178	1,696	2,309
	175	13,7	55,0	123,7	168	220	278	495	880	1,374	1,979	2,694
	200	15,7	62,8	141,4	192	251	318	565	1,005	1,571	2,262	3,079
	225	17,7	70,7	159,0	216	283	358	636	1,131	1,767	2,545	3,464
	250	19,6	78,5	176,7	241	314	398	707	1,257	1,963	2,827	3,848
	275	21,6	88,4	194,4	265	346	347	778	1,382	2,160	3,110	4,233
	300	23,6	94,2	212,1	289	377	477	848	1,508	2,356	3,303	4,618
	325	25,5	102,1	229,7	313	408	517	919	1,634	2,553	3,676	5,003
	350	27,5	110,0	247,4	337	440	557	990	1,759	2,749	3,958	5,388
	400	31,4	125,7	282,7	385	503	636	1,131	2,011	3,142	4,524	
	450	35,3	141,4	318,1	433	565	716	1,272	2,262	3,534	5,089	
500	39,3	157,1	353,4	481	628	795	1,414	2,513	3,927			
600	47,1	188,5	424,1	577	754	954	1,696	3,016	4,712			
700	55,0	219,9	494,8	672	880	1,113	1,979	3,519				

	Process skid category 00
	Process skid category 01
	Process skid category 02
	Process skid category 03
	Process skid category 04
	Process skid category 05

Tabla C.2: Compatibilidad del Skid de proceso y el diámetro de columna. Sistemas isocráticos (flujo, L/h).

## APENDICE D

### D.1 GRÁFICO PARA SELECCIÓN DE TUBERÍAS

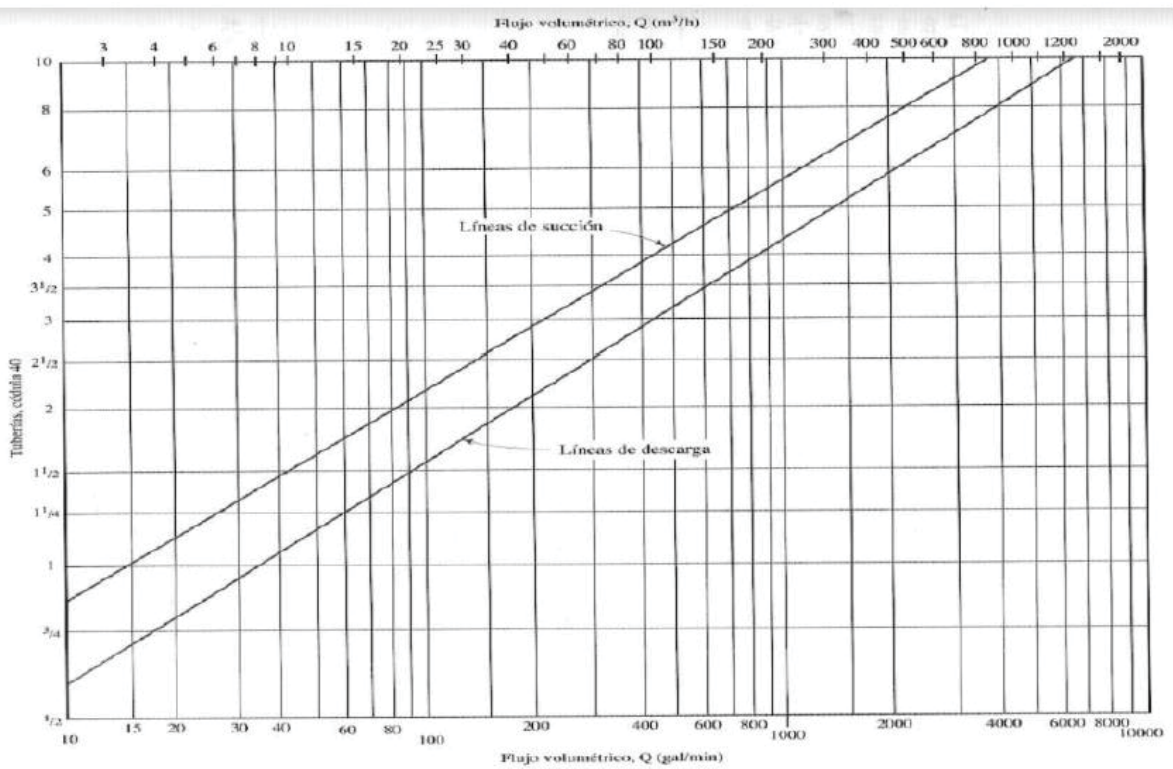


Figura D.1: Gráfica para selección de tuberías de acuerdo al caudal. (Mott, 2006).

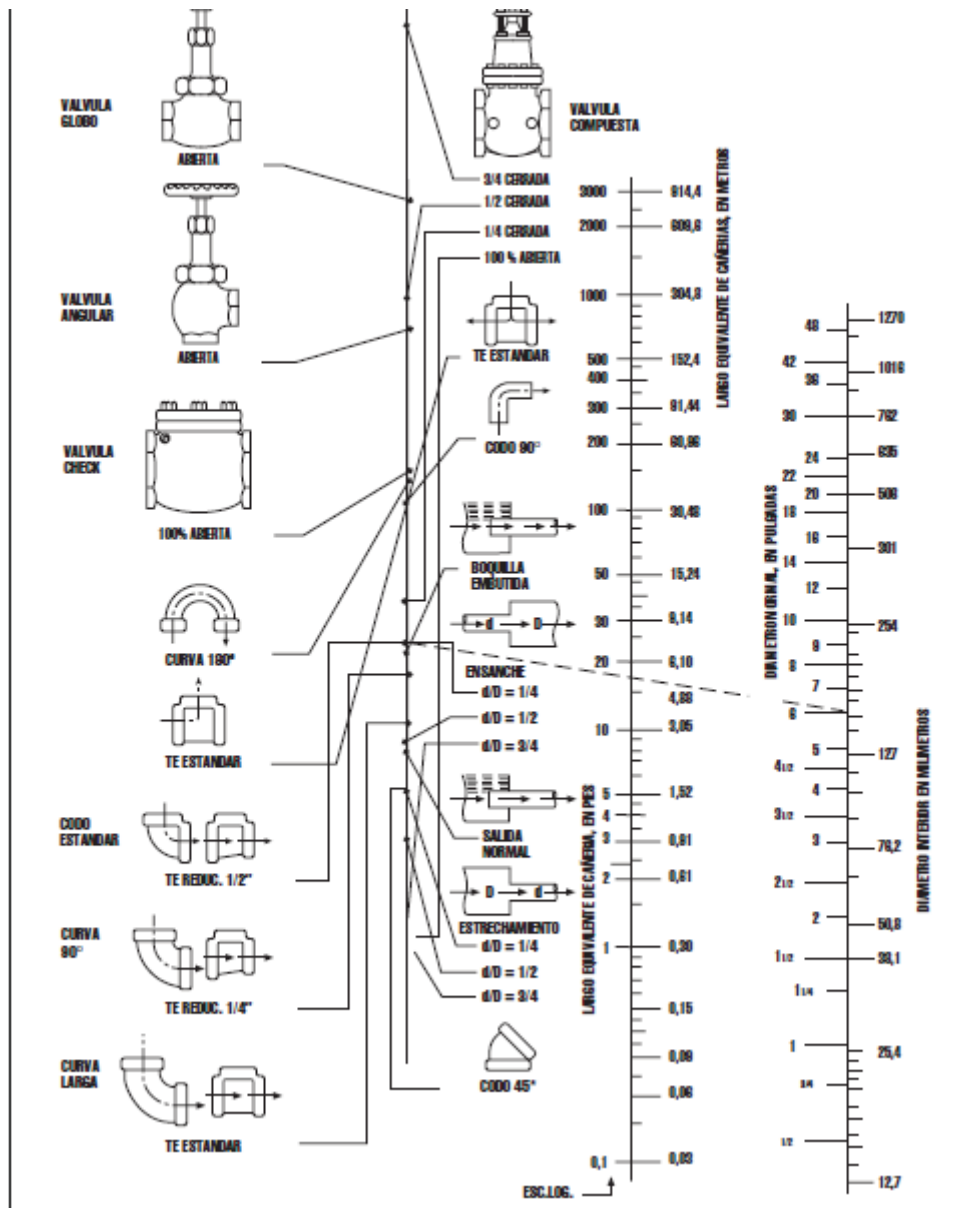
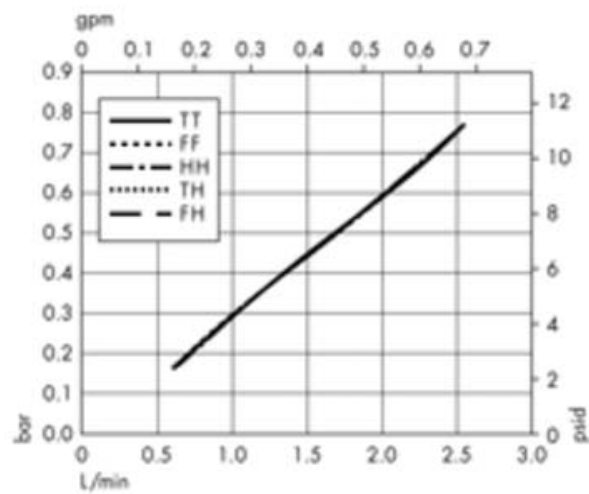


Figura D.2: Tabla para determinar el largo equivalente de accesorios.

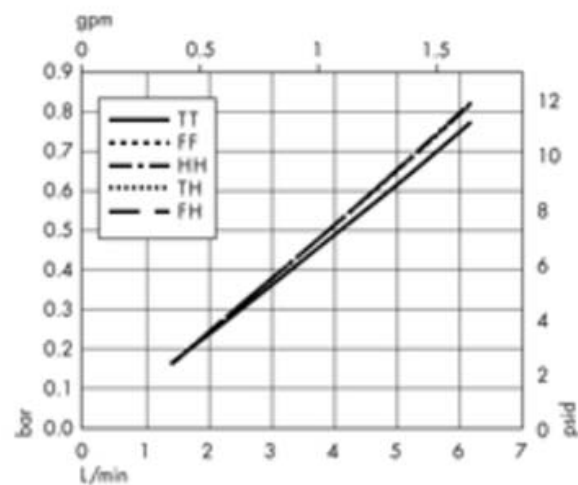
## APENDICE E

### E.1 GRÁFICAS PARA MICROFILTROS OPTICAP® DE MILLIPORE



Cápsulas Opticap XL 2 con membrana Durapore hidrófila de 0,1  $\mu\text{m}$

Figura E.1: Gráfica para determinar el flujo para microfiltro de esterilización Opticap® XL2.



Cápsulas Opticap XL 4 con membrana Durapore hidrófila de 0,1  $\mu\text{m}$

Figura E.2: Gráfica para determinar el flujo para microfiltro de esterilización Opticap® XL4.