

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
LABIOMEX**

**Utilización de un Bioreactor de Fibra Hueca para
Producción de Estreptoquinasa (SKC) en
*Streptococcus equisimilis***

Proyecto de Grado presentado por:

Reinaldo Alberto Guzmán Padilla

Ante la Ilustre Universidad de Los Andes como requisito para optar al Título de:

Licenciado en Biología

**Mérida, Venezuela
2005**



INFORME DEL JURADO NOMBRADO POR EL CONSEJO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES PARA CONSIDERAR EL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DEL BACHILLER:

REINALDO ALBERTO GUZMÁN PADILLA

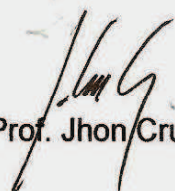
En Mérida a los (Dieciséis) 16 días del mes de marzo de 2005, a las 10:45 a.m. se reunieron los Profesores: Jhon Cruz (Tutor), Juan Puig Pons y Marco Bastidas V., miembros del jurado nombrado por el Consejo de la Facultad de Ciencias, para revisar el Trabajo Especial de Grado sobre el tema: **“Utilización de un Bioreactor de Fibra Hueca (HFBR) para la producción de estreptoquinasa en *Streptococcus equisimilis*”**, presentado por el Bachiller Guzmán Padilla Reinaldo Alberto, titular de la cédula de identidad N° V- 6.020.484, para optar al título de:

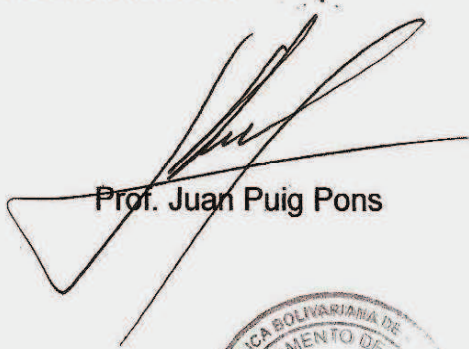
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

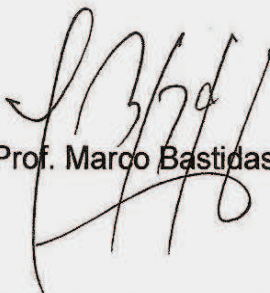
En la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes. Acto seguido se procedió a oír la exposición que sobre el tema arriba mencionado realizó el Bachiller **GUZMAN PADILLA, REINALDO ALBERTO**.

Después del correspondiente interrogatorio, el Jurado procedió a deliberar sobre la calificación del trabajo sometido a su consideración.

Finalmente el Jurado lo declaró **APROBADO CON LA CALIFICACIÓN DE VEINTE PUNTOS (20) PUNTOS. Y RECOMENDADO PARA SU PUBLICACIÓN.**


Prof. Jhon Cruz


Prof. Juan Puig Pons


Prof. Marco Bastidas V.



DEDICATORIA

A mis Padres, gracias por darme la vida, por sus enseñanzas, apoyo, ejemplo de responsabilidad y dedicación.

A mis Hermanos, Gerardo y Vivian, apoyo constante, este triunfo es suyo, permitieron que el camino fuese mas fácil.

A Yelitza, mi amada esposa, compañera invaluable, gracias por tu amor, cariño y apoyo constante , este es nuestro triunfo, al fin lo logramos.

A mis hijas Jennifer, Vanessa, Katherine Gabriela y a mi hijo Albert, ustedes son el motor que impulsa el avance hacia un nuevo camino.

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso

Al Profesor Juan Puig, gracias por darme la oportunidad de ingresar en LABIOMEX, permitirme trabajar y demostrarme a mi mismo que si se puede salir adelante.

Al Profesor Jhon Cruz, mas que mi tutor, mi hermano, mi apoyo en esta tesis, compañero en esta carrera que iniciamos juntos y que culmina con su ayuda, gracias por todo

A todos mis Profesores, aquellos que me enseñaron y que colaboraron en mi formación como profesional en el difícil arte de la investigación y a aquellos que comparten conmigo este momento tan importante para mi, gracias a ustedes

A todos mis Compañeros de Estudios, aquellos que comenzaron conmigo, a los compañeros que encontré en el camino, a los que desistieron, a los compañeros que ya culminaron, a los que pronto terminaran y a los que concluyen junto conmigo esta faena, gracias por toda su colaboración y espero haberles servido de ayuda en algún momento. Gracias totales

A los Amigos que me regalo la vida, aquellos que están en mi pensamiento y en mi corazón, ustedes saben quienes son y seria difícil poder nombrarlos a todos, sin olvidar a alguien, Gracias

Y a mis Compañeros en LABIOMEX, Juan Carlos (Mi Amigo y Técnico), Dorita (Mi Madre en el LAB), Arias (El Pana de Todos), Eucaris (La Jefa), gracias por compartir sus días con este servidor y compañero incondicional de ustedes, gracias miles por todos esos momentos, para mi serán inolvidables. Gracias por siempre

RESUMEN

Los sistemas de membrana de fibra hueca, contienen miles de fibras que simulan un sistema capilar vivo. Estos sistemas, se emplean en una variedad de campos: en la desalinización y purificación de agua, purificación de sangre, producción de proteínas terapéuticas y diagnósticas y la separación de mezclas soluble, etc. Una de sus aplicaciones más importantes es la de bio-reactor de fibra hueca (HFBR). Los HFBR pueden aumentar la relación superficie volumen. Convencionalmente el sistema está compuesto por un cartucho cilíndrico empacado densamente con fibras, fijadas en ambos extremos por un apoyo de epoxi. Los estreptococos suspendidos en el medio se introducen en el espacio extra-capilar (ECS) de las fibras, el medio circula por el espacio intra-capilar (ICS) suministrando nutrientes y metabolitos que atraviesan los poros de la fibra, para el crecimiento. Dependiendo del tamaño del poro, las proteínas secretadas por los estreptococos, permanecerán en el ECS en concentraciones muy altas o pasarán al medio diluyéndose en este. La estreptoquinasa, una proteína con aproximadamente 40.000 daltons de PM, permanecerá en el ECS de la fibra. Con la fermentación tradicional en batch, se obtuvo una producción de 25.000 U.I./ml, utilizando el HFBR se obtuvo una producción que varía entre 56.800 y 220.000 U.I./ml, siendo ambas superiores a las reportadas por otros investigadores en otros sistemas de producción.

ABSTRAT

The systems of membrane hollow fiber contain thousands of fibers that simulate the living capillary system. These systems are widely employed in a variety of fields: desalination and purification of water, blood purification, production of therapeutic and diagnostic proteins and separation of complex soluble mixtures, etc. One of their most important applications is a hollow fiber bio-reactor (HFBR). The HFBR can increase the relationship surface volume. Conventionally the system has a cylindrical cartridge packed densely with fibers, fixed in both ends by an epoxy support. Streptococcus suspended in medium are introduced into the cartridge outside the fibers (known as the extra-capillary space ECS), medium circulates through the center of each fiber (known as the intra-capillary space ICS) giving nutritious and metabolites that cross the pores of the fiber, for their growth. Depending of pore size, the proteins secreted by the streptococcus, will remain in the ECS in very high concentrations or will pass to the medium in order to be diluted. The streptokinase, protein with approximately 40,000 Daltons of molecular weight, they will remain in the ECS of a fiber. With the traditional fermentation in batch, a production of 25,000 U.I./ml was obtained, using the HFBR was obtained between 56,800 and 220,000 U.I./ml, being both superior to those reported by other investigators in other production systems.

INDICE

INTRODUCCION

- Procesos de membrana 6
 - Microfiltración 6
 - o Retención de partículas 9
 - o Características de flujo 10
 - o Otras características 10
 - o Características importantes de las membranas de pantalla 11
 - o Características importantes de las membranas de profundidad 11
 - Ultrafiltración 12
 - Nanofiltración 13
 - Osmosis reversa o inversa 14
- Materiales de membrana 15
- Diseños de modulo de membrana 17
 - Modulo de espiral enrollada 18
 - Modulo de fibra hueca 19
 - Modulo de flujo laminar 20
 - Modulo tubular 22
 - Modulo capilar 23
- Estreptoquinasa 30
 - Organización genética de la región estreptoquinasa 33
 - Secuencia del gen *skc* 35
 - Regulación en la producción de estreptoquinasa 37

HIPÓTESIS DE TRABAJO 39

OBJETIVOS 39

JUSTIFICACIÓN	40
MATERIALES REQUERIDOS	
▪ Material biológico	41
▪ Cartuchos de fibra hueca	41
▪ Material de vidrio	41
▪ Equipos	41
▪ Materiales varios y fungibles	41
▪ Reactivos	41
METODOLOGÍA A UTILIZAR	42
▪ Medios de cultivo	43
- Medio suplementado con peptonas	43
- Medio sólido agar sangre	44
- Medio caldo tioglicolato	44
- Inoculo de la cepa <i>Streptococcus equisimilis</i>	45
▪ Preparación del sistema de fermentación	
- Sistema computarizado	45
- Sistema mecánico	45
▪ Proceso de fermentación	46
▪ Determinaciones	
- Método para determinación del crecimiento	46
- Método de cuantificación de consumo de carbohidratos	47
o Método para determinación de Glucosa	47
o Método de determinación de Maltosa	47
- Métodos de cuantificación de Actividad Estreptoquinasa	
o Método de cuantificación con Azocaseína	48
o Método para la determinación de la Actividad SKC con un sustrato cromogénico	48

- Método de determinación de producción de SKC por
Actividad caseínolítica de la Plasmina 49
- Gráficos 49

RESULTADOS

- Fermentaciones
 - En Batch de 4 litros 51
 - En Fibra (ECS) de 10 litros 52
 - En Fibra (ECS) de 4 litros 53
 - En Fibra (ICS) de 4 litros 55
 - En Fibra (ECS) de 3 litros con dos cartuchos de fibra
conectados en serie 56
- Actividad específica
 - En Batch de 4 litros 57
 - En Fibra (ECS) de 10 litros 58
 - En Fibra (ECS) de 4 litros 59
 - En Fibra (ICS) de 4 litros 61
 - En Fibra (ECS) de 3 litros con dos cartuchos de fibra
conectados en serie 62
- Gráficas de barras comparativas
 - Crecimiento 63
 - Producción 63
 - Actividad Específica 64

DISCUSION 65

- Fermentaciones 67
 - En Batch 67
 - En Fibra Hueca 67

CONCLUSIONES 72

ESPECTATIVAS	73
BIBLIOGRAFÍA	74
ANEXOS	80
▪ Anexo 1 Purificación de Plasminogeno	81
▪ Anexo 2	
- Material de Vidrio	83
- Equipos	83
- Materiales varios y fungibles	84
- Reactivos	85
▪ Anexo 3	
- Preparación de Medio MSP	87
- Preparación de Medio Sólido Agar Sangre	88
- Preparación de Medio Caldo Tioglicolato	89
▪ Anexo 4 Sistema Computarizado	90
▪ Anexo 5 Método de Trinder	91
▪ Anexo 6 Método de Halos de Caseína	92
▪ Anexo 7 Abreviaciones	93
▪ Anexo 8 Lista de Materiales y Equipos de Fermentación	94

INTRODUCCIÓN

El rasgo principal que distingue a las separaciones de membrana de otras técnicas de separación es el uso de una fase adicional (la membrana). Esta fase adicional, dentro de cualquier sólido, líquido o gas, introduce una(s) interfase(s) entre las dos fases de volumen involucradas en la separación. La membrana puede ser neutra o cargada y porosa o no-porosa y actuar como una barrera selectivamente permeable.

Una membrana es una fase permeable o semi-permeable (polímero, inorgánico o metal) que restringe el movimiento de ciertos componentes. Como en todas las separaciones, se obtiene un producto libre de ciertos componentes y un segundo producto concentrado en otros componentes. La actuación de una membrana se define en términos de dos factores simples, flujo y retención o selectividad. El flujo o la proporción de la infiltración, es el volumen (masa o molar) de fluido que atraviesa la membrana por unidad de área de membrana unidad de tiempo.

La selectividad es una medida relativa a la tasa de filtración de diferentes componentes a través de la membrana. La retención es la fracción de soluto retenido por la membrana. Lo ideal es poseer una membrana con una alta selectividad o retención y con un alto flujo o permeabilidad, aunque típicamente intentar aumentar al máximo un factor siempre compromete una reducción en el otro. (Keith, S. 1998)

Se usan membranas para diferentes separaciones; la separación de mezclas de gases y vapores, líquidos miscibles (mezclas orgánicas y mezclas acuosas/ orgánicas) y el sólido/ líquido y dispersiones de líquido/ líquido y sólidos disueltos y solutos de líquidos.

Los usos principales de separaciones de membrana en la industria son:

- La microfiltración y submicrofiltración, clasificada según el tamaño de las partículas del líquido y gases (MF).
- La retención de macromoléculas y coloide de líquidos que contienen especies iónicas (UF).
- La separación de mezclas de líquidos miscible (PV).
- La separación selectiva de mezclas de gases y vapores y mezclas de gases (GP y VP).
- El transporte selectivo de especies sólo iónicas (ED).
- La retención completa, virtualmente de todo el material suspendido y disuelto, de agua u otros solventes (RO).

Los procesos de separación a través de membrana, se han vuelto una de las tecnologías emergentes que a sufrido un rápido crecimiento durante la década pasada. Esta tecnología tiene centrada la atención mundial, especialmente en el campo de la tecnología de separación una de las especialidades de la ingeniería química, con su importante actuación en comparación con la tecnología de separación convencional.

La tecnología de membrana, históricamente se desarrollo a partir de 1.748 cuando Abbe Nollet describe la difusión del agua de una solución concentrada a una solución diluida, desde 1.846 hasta 1.945 los avances fueron relativamente pocos pero significativos (Chwan Yee, F, 1.998), La noción de que la sal se podría quitar del agua de mar sin un cambio de fase, inspiró la imaginación del Dr. Sourirajan a finales de los años 50. La invención real de la membrana de la ósmosis reversa (RO) ocurrió en su laboratorio en UCLA alrededor de 1.960, logrando desalinizar agua exitosamente. (Así Sourirajan se podría llamar no solamente el "padre de la ósmosis reversa," sino también el iniciador de toda la tecnología de membrana del cruce de corrientes.) Comenzando así la edad dorada de la tecnología de membrana (1.960-1.980), este desarrollo estimulaba ambos intereses, tanto académico como comercial. Durante este periodo, el progreso significativo era hecho virtualmente en cada fase de tecnología de

membrana: aplicaciones, herramientas de investigación, procesos de formación de membranas, estructuras físicas y químicas, configuraciones y empaquetado. La comercialización completa de la tecnología de RO del cruce de corrientes y de su hermana, la ultrafiltración (UF), ocurrió en los tempranos años 70, las compañías alrededor del mundo se dispusieron a educar su base de clientes en la realidad técnica y en las aplicaciones potenciales de sus productos (Michaels, A 1.979).

En los años 80, los procesos de la membrana del cruce de corrientes se aceptaron bien en la industria y la medicina, y la salida al mercado sacudió a la industria y la competencia del precio fue inevitable en una característica de una tecnología madura. Hoy los centenares de procesos de fabricación, de tratamiento de desechos y de usos en la purificación del agua confían en la membrana de contra corriente para las separaciones rentables. A pesar de los avances significativos que se han hecho subsecuentemente fabricando membranas más permeables y de estructura durable, estas complejas membranas continúan llenando un lugar importante en los laboratorios.

Pueden usarse membranas para satisfacer muchos de los requisitos de la separación en los procesos de las industrias. Estas separaciones pueden ponerse en dos áreas generales; donde los materiales están presentes como varias fases y aquellos donde se disuelven las especies en una sola fase.

El transporte de las especies seleccionadas a través de la membrana se logra aplicando una fuerza externa por la membrana. Esto da una clasificación amplia de separaciones de la membrana, de la manera o mecanismo, como el material se transporta por una membrana. El flujo del material por una membrana se maneja cinéticamente, por la aplicación de cualquier método mecánico, químico, trabajo eléctrico o térmico. Los procesos importantes de membrana, junto con la clasificación general de las membranas usadas se presentan en la Tabla 1.

<i>Separación de la membrana</i>	<i>Tipo de membrana</i>	<i>Fuerza externa</i>	<i>Aplicaciones</i>
Microfiltración	Micro poros simétricos y asimétricos	Presión hidrostática	Clarificación, filtración estéril.
Ultrafiltración	Micro poros asimétricos	Presión hidrostática	Separación de macromoléculas de las soluciones
Nanofiltración	Asimétrico	Presión hidrostática	La separación de compuestos orgánicos pequeños y las sales seleccionadas de las soluciones
Ósmosis reversa o hiperfiltración	Asimétrico, compuesto por film homogéneo	Presión hidrostática	Separación de microsolutos y sales de las soluciones
Gas infiltración	Asimétrico o compuesto, homogéneos o polímero poroso	Presión hidrostática, gradiente de concentración	Separación de mezclas de gases
Diálisis	Micro poros simétricos	Gradiente de concentración	Separación de microsolutos y sales de las soluciones de las macromoléculas
Preevaporación	Asimétrico, compuesto no-poroso	Gradiente de concentración, presión del vapor	Separación de mezclas de líquidos volátiles
Infiltración de Vapor	Compuesto	Gradiente de concentración no-poroso	La separación de vapores volátiles de los gases y vapores
Destilación de la membrana	Micro poros	Temperatura	Separación de agua de los solutos no volátiles
Electrodiálisis	Intercambio del ion, homogéneo o polímero de micro poros	Potencial eléctrico	La separación de iones del agua y solutos no-iónico
Electrofiltración	Micro poros membrana cargada	Potencial eléctrico	soluciones de irrigación de sólidos suspendidos
Membranas líquidas	Micro poros, portador líquido	Concentración, reacción,	La separación de iones y solutos de las soluciones ácuosas

Tomada de: Keith, S. 1.998

Tabla 1 - Membrana de separación y materiales

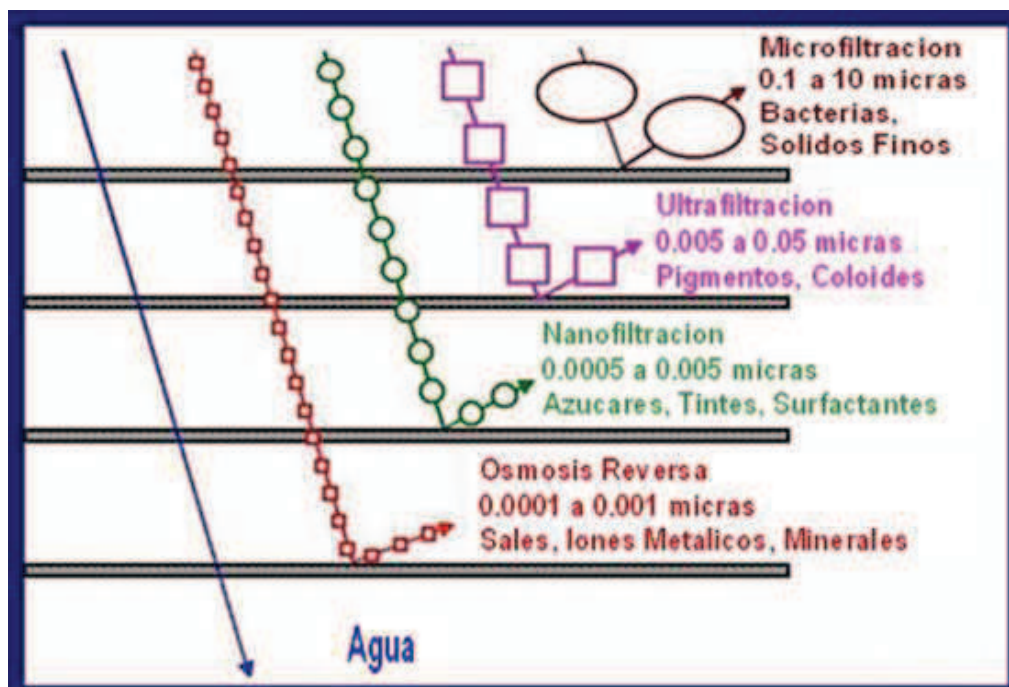
La fuerza externa es cualquiera presión, concentración, temperatura o potencial eléctrico. El uso de fuerza externa no es un método satisfactorio de clasificación porque pueden aplicarse aparentemente procesos diferentes a la membrana para la misma separación, por ejemplo la electrodiálisis, ósmosis reversa y pervaporación en la desalinización de agua.

De las aplicaciones, se prefiere, la clasificación en términos de sólidos suspendidos, coloides o solutos disueltos, etc., (Figura 1). Así las técnicas de microfiltración y ultrafiltración son empleadas en la categoría de separación sólida suspendida. Todos estos procesos usan membranas que son microporosas por naturaleza. Éstas son la forma más simple de membrana con respecto al modo de separación y consisten en una matriz sólida con poros definidos que van de 100 nm a 10 µm en tamaño. (Keith, S. 1.998)

Microfiltración (MF), en combinación con Ultrafiltración (UF), puede resolver casi cualquier problema de separación que involucre materiales de partículas y macromoléculas. Las mayores ventajas técnicas de estas filtraciones son que ellas se adaptan bien a los materiales sensibles a la temperatura y no se alteran químicamente como sucede con la precipitación y destilación.

Las filtraciones de membrana ofrecen simplicidad relativa de funcionamiento y bajos costos, comparados con otras técnicas, como separación por centrifugación, filtración de vacío y secado de rocío. Las áreas del mercado para la ultrafiltración están en las industrias de alimentos y lechera, biotecnología, purificación de agua y tratamiento de efluentes.

El último de éstos es un mercado en vías de desarrollo para las separaciones de membrana. La porción del mercado más grande de separaciones de membrana es sostenida por la microfiltración y se usa para la clarificación y la filtración estéril en una amplia gama de industrias incluyendo alimentos y bioquímico. Los sistemas típicos consisten en cartuchos donde las membranas ofrecen capacidades de filtración absolutas.



Tomada de: <http://www.ansto.gov.au/.../project/membranes.jpg>

Figura 1.

Procesos de Membrana

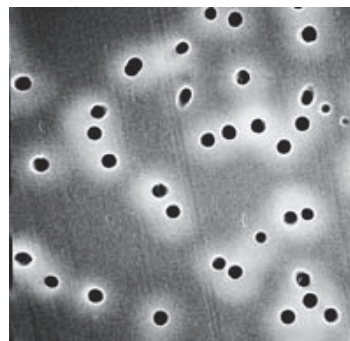
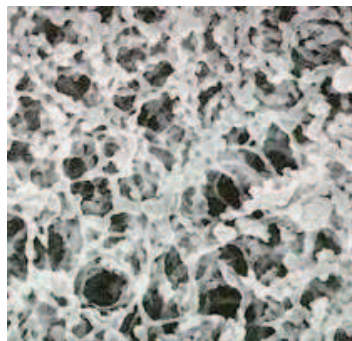
Microfiltración

La filtración es el proceso de quitar materia suspendida físicamente de un líquido o un gas, forzando al material a través de una barrera mecánica porosa, el filtro. Un gradiente de presión se conserva para mantener el flujo del fluido a través de los poros de la membrana. Esta presión puede originarse por gravitación, centrifugación, por presiones mecánicas, neumáticas o hidráulicas. El filtrado resultante, penetra o fluye a través del filtro, desprovisto del material suspendido, mayor que el tamaño del poro.

La acción del filtro facilita la extracción y el análisis del material separado del fluido o gas. Se define la eficacia del proceso de filtración como la habilidad de los medios de comunicación de distinguir entre las partículas de tamaños específicos diferentes. Es una función de las características de los medios de comunicación del filtro, propiedades del fluido o gas y las condiciones de operación.



Tomado de: Keith, S. 1.998



Tomada de: General Electric Co. 1.997

Figura 2 (a) Membrana de Profundidad. (b) Membrana de Pantalla.

Las membranas de microfiltración se pueden dividir en dos amplios grupos basados en la estructura del poro. Éstas son membranas con los poros del tipo tortuoso, de aquí en adelante llamados membranas o filtros de profundidad, y las membranas con los poros del tipo tubo, de aquí en adelante llamados membranas o filtros de pantalla. En la figura 2(a) se muestra una microfotografía electrónica de exploración de superficie de una membrana de profundidad típica, o poro tortuoso. Esta membrana tiene una superficie relativamente áspera donde aparecen muchas aberturas considerablemente más grandes que el tamaño clasificado del poro. (Keith, S. 1.998)

Las membranas de profundidad son sin embargo absolutas, dependiendo de la tortuosidad al azar de sus numerosas trayectorias de flujo para alcanzar su grado de tamaño de poro. Las membranas de profundidad están comercialmente disponibles en plata pura, PVC, PVDF, PTFE, varios compuestos celulósicos, nylon, polietersulfona, polipropileno y muchos otros materiales. (Keith, S. 1.998)

La mayoría de las membranas de profundidad son manufacturadas de varios materiales poliméricos usando una máquina de bastidor. El molde de las membranas con los ésteres celulósicos son posiblemente las membranas más extensamente usadas. Las membranas de esta estructura alto-porosa con su laberinto de poros interconectados asimétricos se recomiendan para las filtraciones generales de precisión, electroforesis, esterilización de líquidos, el cultivo de microorganismos y para muchas otras aplicaciones, su construcción más firme proporciona resultados de porosidad más altas, de flujo más alto y alta capacidad de retención. Estas características son muy deseables en sistemas de filtración de fluidos como aquellos usados en la industria electrónica y las industrias farmacéuticas.

En la figura 2(b), se muestra una microfotografía electrónica de exploración de superficie de una membrana de pantalla, o de poro capilar. Esta membrana tiene poros cilíndricos redondos casi perfectos, más o menos normal en la superficie de la membrana, incluso con dispersión al azar del poro sobre la superficie. Las membranas de pantalla son absolutas y están comercialmente disponibles en películas finas de policarbonato y de poliéster. Se prefieren en una variedad amplia de usos incluyendo microscopia electrónica óptica, quimiostasis, citología exfoliativa, análisis de partículas, análisis del aerosol, análisis gravimétricos y reología de la sangre.

Con la diferencia entre la membrana de pantalla y la membrana de profundidad, está claro que las características de los dos tipos de membranas permiten que cada una tenga ventajas significativas y desventajas. Para óptimos resultados, los usuarios de la membrana deben considerar todas las características de los dos tipos de membranas para seleccionar una (o ambas) a ser utilizada.

Retención de la Partícula

Las partículas se capturan directamente en la superficie de la membrana de pantalla. Sin embargo, las membranas de pantalla conservan con certeza solamente esas partículas del mismo tamaño o más grande que el tamaño del poro de la membrana. A excepción del impacto y de la inercia de difusión, la mayoría de las partículas más pequeñas que el paso del tamaño del poro pasan sin obstáculo a través de la membrana de pantalla.

La membrana de pantalla debe también ser seleccionada si el usuario desea una retención no específica baja (producción máxima de partículas o de proteínas en el líquido filtrado). Esto es importante, por ejemplo, cuando los virus se están separando de una solución de crecimiento y se desea la producción máxima de virus. La retención de proteínas en membranas de pantalla se ha encontrado que puede ser menos de 10%, que en las membranas de profundidad.

Con las membranas de profundidad, la mayoría de las partículas se capturan dentro de los intersticios de la membrana a excepción de partículas relativamente grandes. Puesto que las membranas de profundidad dependen de la tortuosidad de sus trayectorias de flujo para la captura, atraparán no solamente partículas del mismo tamaño o más grande que el tamaño clasificado del poro, pero también muchas partículas debajo de ese tamaño clasificado del poro.

Si el usuario desea la máxima retención de todas las partículas y/o de una alta capacidad de enlace, la membrana de profundidad debe ser seleccionada. La membrana de profundidad tiene una superficie disponible mucho más grande que la membrana de pantalla; por lo tanto tiene una capacidad mucho más grande de carga de partículas y muchos más sitios donde las proteínas y los virus pueden anclar.

Características del Flujo

Las membranas de pantalla no tienen ningún flujo lateral debido a sus poros capilares, por lo tanto son inadecuadas para la electroforesis y otros usos que requieren esta característica. Las membranas de profundidad tienen flujo de lateral excelente.

Los caudales para los dos tipos de membranas son en grosso modo equivalentes. Aunque la membrana de profundidad tiene más área abierta, la membrana de pantalla es más fina, 10 μm contra 50 a 120 μm .

Otras Características

Ambos tipos de membranas pueden ser esterilizados. Las temperaturas criogénicas tienen poco o nada de efecto en cualquier membrana. La membrana de pantalla es totalmente no higroscópica. Muchas membranas de profundidad absorben la humedad del aire y se deben secar antes de su uso, especialmente en algunos procedimientos analíticos críticos. Las membranas de pantalla y la de profundidad son generalmente hidrofílicas a excepción, las de PTFE y las de polipropileno que sean intrínsecamente hidrofóbicos. Ambos tipos de membranas se pueden hacer parcialmente o totalmente hidrofóbicos.

La resistencia química de las varias clases de membranas depende del material del cual son manufacturados. PTFE tiene la mejor resistencia química, seguida por PVDF, la plata, el poliéster, el policarbonato, y finalmente varios compuestos celulósicos.

Los tintes comunes no manchan ni decoloran las membranas de pantalla de policarbonato o de poliéster; sin embargo esto se debe considerar para las membranas fabricadas de compuestos celulósicos.

Características importantes de las membranas de pantalla.

- el tamaño y la estructura del poro bien definidas
- la retención del tamaño de la partícula se define agudamente
- ninguna migración de los medios
- superficie lisa, plana para SEM, TEM y análisis óptico.
- no higroscópico
- fino, conserva poco líquido
- absorción baja
- atascamiento no específico bajo (3-10 μ gramos/cm²)
- No se mancha
- fuerte
- en varias ocasiones autoclavable

Características importantes de las membranas de profundidad.

- área superficial grande
- alta capacidad de carga de suciedad
- vida larga
- ninguna migración de los medios.
- alta capacidad de enlace (100-250 μ gramos/cm²)
- características de manejo bueno
- en varias ocasiones autoclavable

La Microfiltración es empleada en la producción y las aplicaciones analíticas. Las aplicaciones tecnológicamente importantes se resumen como:

- eliminación de partículas en corrientes de líquido o gas para el químico, biológico, farmacéutico e industrias de alimentos.
- la clarificación y la filtración estéril de soluciones y líquidos sensibles al calor.
- la producción de agua pura en la industria de la electrónica.
- purificación del producto, filtración de gas, proceso de recuperación de solvente en la industria química.
- tratamiento de agua.

Ultrafiltración

Ultrafiltración es un proceso de membrana que es similar a la microfiltración en su funcionamiento, pero que usa membranas asimétricas para llevar a cabo la filtración “más firme”. La capa superior de la membrana tiene un tamaño de poro que está en un rango de $0,05 \mu\text{m}$ a $1 \mu\text{m}$. La ultrafiltración es un proceso de separación de partículas sumamente pequeñas y las moléculas disueltas de fluidos. La base primaria para la separación es el tamaño molecular, aunque los factores secundarios como forma de la molécula y carga pueden jugar un papel. Materiales que van de 1.000 a 1.000.000 de peso molecular son retenidos por las membranas de ultrafiltración mientras las sales y el agua la atraviesan.

Pueden usarse membranas de Ultrafiltración para purificar y recolectar ambos, el material fluido que pasa a través del filtro y el material retenido por el filtro. Materiales más pequeños que el tamaño del poro, pasan a través del filtro y así pueden ser eliminados (pirógenos), puede clarificar y puede separar los contaminantes de alto peso molecular. Materiales más grandes al tamaño del poro son retenidos por el filtro y pueden concentrarse o separarse de los contaminantes de bajo peso molecular.

Las membranas de Ultrafiltración a menudo se utilizan en forma de flujo tangencial de suministro, el material se elimina tangencialmente por aguas arriba de la superficie de filtración maximizándose por esta razón, el flujo y la vida del filtro. Estos sistemas ofrecen la ventaja de larga vida porque la membrana de ultrafiltración puede renovarse repetidamente con agentes de limpieza.

Nanofiltración

Nanofiltración es similar a RO y es un proceso de presión manejada aplicada en el área entre las capacidades de la separación de membranas de RO y membranas de UF que están en la separación de iones de solutos como moléculas pequeñas de azúcares. Sólo se han logrado recientemente éxito debido a desarrollos en películas delgadas de membranas no-celulosas.

Las membranas pueden ser formadas por polimerización interfacial de un sustrato poroso de polisulfona o polietersulfona. Generalmente esto abre las posibilidades particularmente para las mejoras de eficacia del proceso y la producción de nuevos productos en la industria alimenticia y de biotecnología. Los sistemas de Nanofiltración operan típicamente a presiones más bajas que RO (5 bar) pero las proporciones de rendimiento de flujo de agua son más altas aunque de una calidad diferente a RO.

Nanofiltración se usa cuando el rechazo alto del sodio, típico de RO, pero no se necesita ser eliminadas otras sales como Mg y Ca (iones divalentes). El peso molecular de separación de la membrana de NF está alrededor de 200. Los rechazos típicos son (5 bar, 2.000 ppm de soluto) 60% para NaCl, 80% para el bicarbonato de calcio y 98% para el sulfato de magnesio, glucosa y sacarosa.

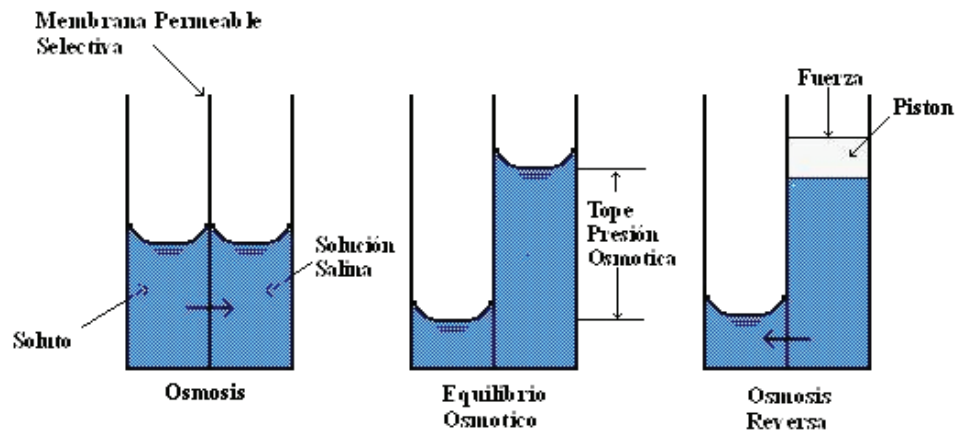
Ósmosis reversa o inversa

La ósmosis reversa es un proceso para quitar solutos de bajo peso molecular, ejem., las sales inorgánicas, las moléculas orgánicas pequeñas (glucosa) de un solvente, típicamente el agua. El proceso a veces es llamado hiperfiltración. El nombre ósmosis reversa implica, la inversión del proceso natural de ósmosis, por la aplicación de una presión en la solución más concentrada en contacto con la membrana.

Ósmosis reversa (RO) es un proceso de presión externa apuntado a la separación de solutos iónicos y macromoléculas de las venas acuosas. El método de extracción de sal disuelta es diferente a la microfiltración y no es justamente un proceso físico basado en la diferencia del tamaño de soluto y solvente. Las especies son de tamaño molecular similar y de un tamaño comparable a la amplia gama de espacios del poro en el polímero de la membrana de RO. El tamaño del poro de membrana es del orden de 10 nm y más baja.

Para visualizar el proceso de RO primero hay que considerar el proceso de ósmosis (Figura 3). La ósmosis ocurre cuando una membrana semi-permeable conveniente se usa para separar dos soluciones de igual volumen, una de agua y la otra una solución de sal diluida. Se transfiere agua, del lado del agua de la membrana al lado de la solución diluida hasta que se alcanza un punto de equilibrio osmótico con la presión hidrostática y presión osmótica generada del lado del soluto disuelto. Aplicando una presión del lado de la solución de sal diluida, el flujo de agua puede ser forzado a través de la membrana y si la presión excede la presión osmótica el flujo se invierte. Éste termino es ósmosis reversa o hiperfiltración en los que la concentración de sal es aumentada por el flujo de agua (solvente) de una solución más concentrada a una solución diluida. Las membranas de ósmosis reversas pueden separar todas las especies del soluto esencialmente, de la solución inorgánica y orgánica. El mecanismo de separación de especies es basado en procesos que relacionan el tamaño y la forma, carga iónica y sus interacciones con la propia membrana.

ILUSTRACION DE OSMOSIS



Tomado de: <http://www.cee.vt.edu/.../osmosis.html>

Figura 3

Materiales de Membrana

La membrana es claramente la parte más importante del proceso de la separación. La ciencia de materiales de membrana ha producido una amplia gama de materiales de estructura diferente y con maneras diferentes de funcionar (Tabla 2).

Generalmente estos materiales pueden ser clasificados en tres tipos:

- productos sintéticos; un inmenso número de polímeros y elastomómeros.
- productos naturales modificados; básicamente celulósicos.
- inorgánico, cerámico y metales.

<p><u>Productos naturales modificados</u> Acetato celulosa (celulosa-2-acetato, celulosa-2,5-diacetato, celulosa-3-acetato), celulosa acetobutirato, celulosa regenerada, nitrato celulosa</p>
<p><u>Productos sintéticos</u> Poliamida (Poliamida aromático, copoliamida, hidrazide poliamida), polibenzimidazole, polisulfona, polímeros de vinilo, polifuran, policarbonato, polietileno, el polipropileno, PVA, PAN, polieter sulfota, poliolefins, polihidantoin, (poliurea cíclico), sulphide del polifenilene, caucho de silicona, PTFE, PVDF, Nylon.</p>
<p><u>Misceláneos</u> Complejo polielectrolítico, vidrio poroso, óxido de grafito, ZrO_2-ácido poliacrílico, ZrO_2-carbón, Al_2O_3, SiC, metales (Pd, Ag, Acero Limpio, Al).</p>

Tomado de: Keith, S. 1.998

Tabla 2 – Materiales de Membranas

Un material de la membrana debe poseer muchas de las propiedades siguientes, con suerte para ser eficaces para la separación;

- resistencia química apropiada,
- estabilidad mecánica,
- estabilidad térmica,
- permeabilidad alta,
- selectividad alta o retención,
- el funcionamiento estable y el costo bajo.

Todas estas propiedades son evidentemente relativas en términos de procesos individuales y el respectivo capital y costo de operación. La resistencia química está más relacionada con la vida de operación de la membrana. Un deterioro gradual de la membrana puede ocurrir durante meses y años con quizás sólo una pérdida relativamente pequeña de selectividad.

Diseños de módulo de membrana.-

Los módulos de membrana están disponibles en cinco diseños básicos: espiral enrollada, fibra hueca, flujo laminar, tubular y capilar (Tabla 3). Debido a los requisitos de las separaciones de la membrana operando particulares individualidades y las aplicaciones a las que son sometidas, la opción de diseño del módulo está limitada.

Generalmente la conveniencia de un diseño del módulo para un tipo particular de separación puede ser clasificada como sigue:

Espiral enrollada	RO	PV	GP	(UF)		
Fibra Hueca	RO	PV	GP			
Estructura flujo laminar	(RO)	PV		UF	ED	MF
Tubular	(RO)			UF		MF
Capilar				(UF)		(MF)

Tomada de: Keith, S. 1.998

Tabla 3

Esta clasificación se ha realizado debido a la variedad de requisitos de diseños como la necesidad para la fácil limpieza, altas densidades de cubierta, costo de funcionamiento eficaz y reemplazo de la membrana. También en diseño, los factores de las separaciones de líquido basado en las pérdidas friccionales, las propiedades hidrodinámicas y propiedades del material imponen los requisitos de diseño diferentes comparando las separaciones para gas o vapor. Así un diseño de módulo de flujo laminar para PV será bastante diferente al diseñado para ED.

Módulos de espiral enrollada.-

Los módulos de espiral enrollada (Figura 4) consisten en capas de membranas de hojas llanas, espaciadores y material poroso al flujo que penetra envuelto alrededor de un tubo colector central. La solución suministrada pasa axialmente a lo largo del emparedado en los cauces formados por los espaciadores. Este cauce es del orden de 1,0 mm de espesor y las velocidades de flujo cruzadas generalmente usadas fluyen por la estructura laminar, aunque el material espaciador puede actuar como un promotor de la turbulencia. La solución suministrada penetra a través de la membrana, la que radialmente es dirigida hacia el tubo colector central. El diámetro de este tubo es pequeño al aumentar al máximo las áreas específicas de la membrana, típicamente $600 \text{ m}^2\text{m}^{-3}$.

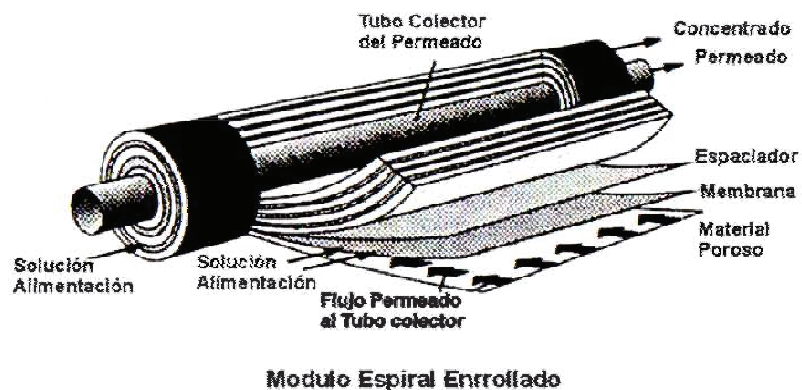


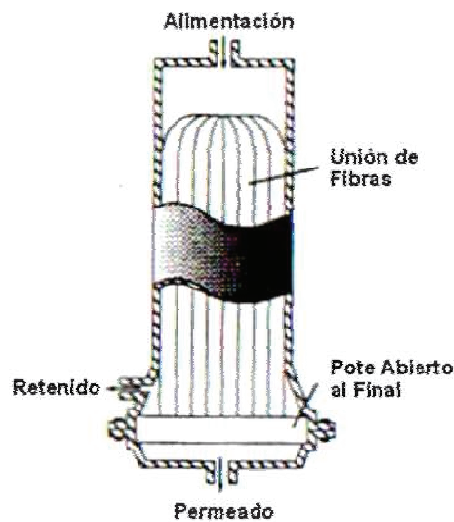
Imagen tomada de: Keith, S. 1.998

Figura 4.- Módulo de Espiral enrollada

Módulos de Fibra Hueca

Los módulos de fibra hueca ocupan una de las aplicaciones de membranas más grandes del rango que están en la desalinización por RO. Una unidad mostrada esquemáticamente (Figura 5) consiste en un bulto de fibras de membrana muy finas empacadas en un albergue cilíndrico de cáscara.

El diámetro externo de las fibras está en el rango de 80 a 200 μm y el espesor de la pared puede ser tan pequeño como 20 μm , aunque para diámetros más grandes, el espesor es mayor para resistir las diferencias de presión grandes en la membrana que pueden ser tan altas como 80 bar. Las fibras individuales se colocan en el módulo con los dos extremos abiertos arreglados para facilitar la penetración más fácil por la cabeza o parte superior del plato. El alimento es externo a las fibras, como es la superficie activa de la membrana, y el flujo penetra internamente a lo largo de las fibras.



Modulo Fibra Hueca

Imagen tomada de: Keith, S. 1.998

Figura 5.- Diseño del módulo de fibra hueca

Las densidades de condensación para los módulos de fibra pueden ser tan altas como $10.000 \text{ m}^2\text{m}^{-3}$. Una variedad de fabricantes es activo en este campo, particularmente para los módulos de RO, y los módulos de fibra de poliamida han tomado una posición predominante. Se fabrican otros módulos con membranas de triacetato de celulosa y sulfonados de polisulfona. Aunque adecuado para la desalinización y las aplicaciones similares estos materiales padecen una estabilidad limitada a los extremos de pH y temperatura, etc.

Modulo de flujo laminar

El módulo de flujo laminar que usa membranas en la forma de hojas llanas se ofrecen en principio en dos aplicaciones industriales, UF y ED. Debido a las diferentes fuerzas externas usadas en las separaciones, los planes individuales son algo diferentes y así son considerados por separado, siendo de particular interés los módulos de UF.

En módulos usados para UF, las hojas de la membrana se apilan una encima de la otra o una al lado de la otra. Las hojas están en la forma de discos redondos, hojas elípticas o platos rectangulares (Figura 6) y el diseño del equipo parece permutadores de calor de lámina o filtros laminares.

Hay una variedad de diseños de equipos industriales, pero todos ellos tienen los mismos componentes básicos, por ejemplo: membranas separadas por láminas alternantes porosas, de apoyo y los espaciadores por donde penetra el flujo de alimentación.

Las aplicaciones de los módulos de flujo laminar están en las mismas áreas como los módulos tubulares. Los canales de alimentación están a menudo a menos de 1 mm de separación y aunque son propensos a ser obstruidos son más fáciles de limpiar.

Los módulos típicos con membranas elípticas verticales y las membranas rectangulares verticales tienen áreas de 35 y 50 metros cuadrados, respectivamente y es caracterizado por el reemplazo de la membrana relativamente fácil. La productividad de éstos módulos de lamina son del orden de $80 \text{ m}^3 \text{d}^{-1} \text{m}^{-3}$. Para el laboratorio y aplicaciones de planta piloto existe una amplia gama de equipos que están actualmente disponibles en forma del plato.

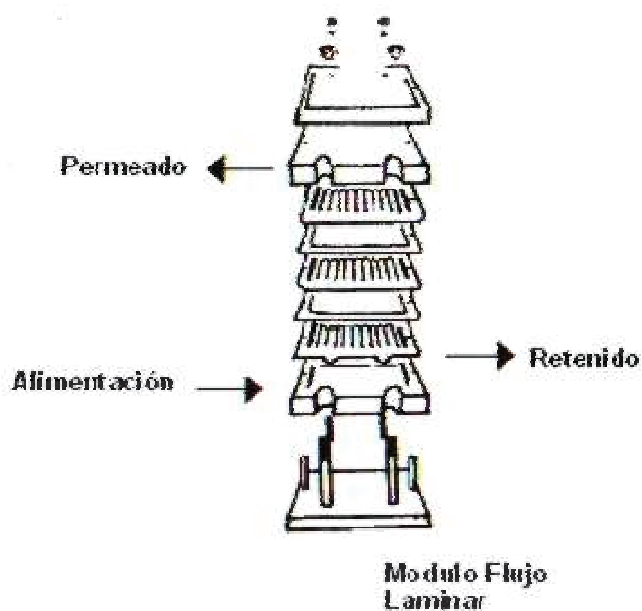


Imagen tomada de: Keith, S. 1.998

Figura 6 - Módulo de flujo laminar

Módulo tubular

El concepto básico de un módulo de membrana tubular es un tubo recto rodeado por una capa de soporte poroso y un tubo de soporte. La alimentación fluye internamente a lo largo del tubo y penetra la membrana en la capa de soporte poroso y pasa a través de los agujeros distribuidos convenientemente en el tubo de soporte. El módulo tubular típico se muestra esquemáticamente en la Figura 7. Los diámetros del tubo están en el rango de 1,2 a 2,4 cm y un cierto número de tubos están colocados en un alojamiento a presión para aumentar la productividad del módulo. Asemejándose a un radiador.

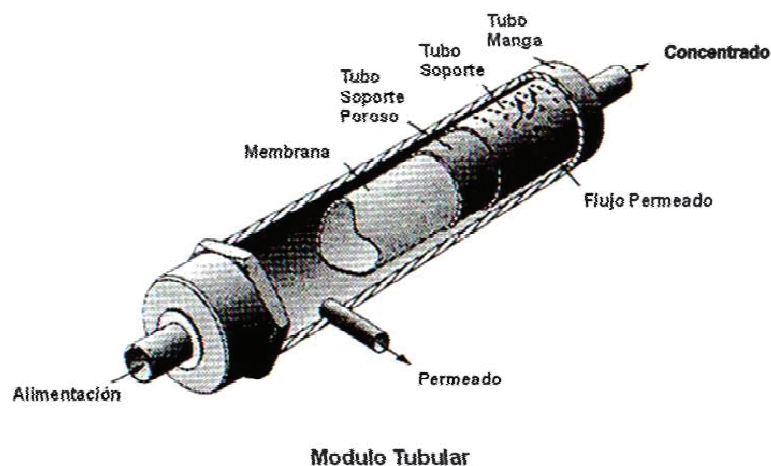


Imagen tomada de: Keith, S. 1.998

Figura 7.- Módulo de membrana Tubular

Las aplicaciones del principio de los módulos de membranas tubulares se utilizan con medios que no pueden ser pretratados para quitar coagulantes potenciales y cuando se requieren condiciones muy higiénicas. Los diámetros del tubo relativamente grandes permiten la limpieza in situ por métodos mecánicos. Debido al tamaño del tubo, el área específica de membrana es muchísimo más baja ($< 100 \text{ m}^2\text{m}^{-3}$) que en los módulos de fibra enrollada y así la productividad es un orden de magnitud mas baja, típicamente $100 \text{ m}^3\text{d}^{-1}\text{m}^{-3}$. Las aplicaciones del principio están en UF y MF.

Los desarrollos en materiales inorgánicos para membranas en forma tubular son de importancia particular en aplicaciones de UF. Ellas permiten condiciones agresivas de limpieza a ser usadas, ejem. esterilización por vapor.

Módulo capilar

El módulo capilar utiliza esencialmente un plan de fibra hueca, (Figura 8) las "fibras" que tiene diámetros mayores que aquellos utilizados para RO. Ellos son principalmente aplicados en UF donde muchas presiones transmembranales más bajas permiten el funcionamiento con un diámetro más grande y permite presurizar las fibras internamente. Así el flujo de alimentación circula dentro de la fibra, dando mejor control a la concentración de polarización.

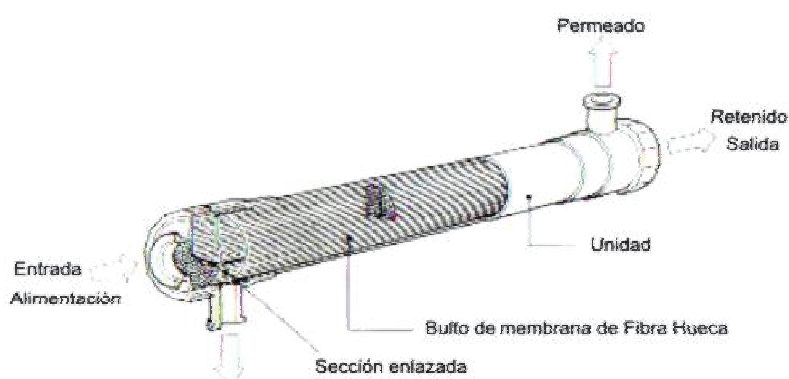
Los módulos vienen alojados en cáscaras de unos 0.8 a 1.0 m de diámetro y aproximadamente 1.0 m en longitud. Las densidades de empaquetamiento son un orden de magnitud mas baja que las unidades de RO (debido a un mayor diámetro) y se limitan las presiones transmembranales de 2 a 3 bar, aunque puede lograrse 10 bar en ciertas situaciones. Las Fibras están abiertas y fijadas en ambos extremos del tubo, por un apoyo o sello de epoxi. Las membranas capilares de Ultrafiltración están disponibles en una amplia gama de polisulfona, incluyendo polímeros, poliacrilonitrilo y poliolefinas tratados con cloro.

Diseños de Capilares para UF, como los módulos de RO, exige el pretratamiento del alimento para quitar partículas mayores que 50 μm de diámetro debido a una susceptibilidad a contaminarse por las mismas. Sin embargo pueden ser aliviados por un proceso físico llamado vaciado atrás. En este el flujo que penetra se invierte y desaloja el material que esta obstruyendo la superficie de la membrana. Este procedimiento se aplica, durante sólo unos minutos, a los intervalos señalados como regulares durante el funcionamiento para mantener índices de flujo dentro de un nivel requerido. Pueden usarse ocasionalmente otros fluidos como aire.

El procedimiento también se usa para la microfiltración. Si el método físico o el método de la bola de espuma fallara entonces el recurso de la limpieza química puede ser necesaria. Los químicos adoptados varían de aplicación a aplicación y pueden desalojar o soltar el material que esta obstruyendo la membrana o lo disuelve, Claramente la solución de limpieza debe ser compatible con la membrana y no debe afectar la estabilidad y selectividad, las membranas de Ultrafiltración (y MF) son generalmente más resistente a químicos que las membranas de RO y a menudo pueden usarse con ácido diluido caliente o álcali. Frecuentemente las mezclas de surfactantes y agentes que secuestran se usan para quitar restos orgánicos y microbianos. También pueden usarse soluciones de esterilización como formaldehído.

Los procesos de limpieza químicos son recomendados por los fabricantes, las aplicaciones a menudo son bien investigadas. Las más nuevas aplicaciones del proceso exigirán una serie de pruebas para determinar el método más eficaz y más barato.

También se usan ahora módulos capilares en ciertas aplicaciones de MF y UF. Los tamaños de fibra tienden a ser algo mayor que aquellos para UF, empezando a aproximadamente 600 μm .



Modulo Capilar

Imagen tomada de: Keith, S. 1.998

Figura 8.- Módulo de membrana Capilar

Los dispositivos de membrana, capilares de fibra hueca se emplean extensamente en una variedad de campos, por ejemplo, en la desalinización y la purificación de agua por ósmosis inversa, la purificación de sangre por haemodialisis o haemofiltración, la producción de proteínas terapéuticas y diagnósticas, la separación del complejo de mezclas solubles, etc. Una de las aplicaciones más importantes es como reactor biológico separador, o bioreactor de fibra hueca (HFBRs), en que las células enteras o enzimas se inmovilizan y son bañadas con medios especialmente formulados con el propósito de obtener los productos bioquímicos (Rony 1.971, Knazek, *et al.* 1.972). Los primeros usos de los capilares de fibra hueca con esta capacidad se reportaron a principios de 1.970.

Con el tiempo, la inmovilización total de la célula ha llegado a ser generalmente preferida a la inmovilización de la enzima, debido a la eliminación de un paso costoso en la purificación de la enzima, a la estabilidad más grande de las enzimas intracelulares y a la habilidad de las células enteras de catalizar las vías metabólicas completas. Además, los cultivos de la célula de perfusión han ofrecido algunas ventajas importantes sobre los cultivos tradicionales en suspensión, como son la protección de las células al disminuir las tensiones, densidades más altas de la célula, reducción de exigencias en los medios y concentraciones aumentadas del producto (Piret y Cooney 1.990 a).

Todas estas características atractivas, además de un área de superficie de membrana grande por unidad de volumen del reactor y la disponibilidad y comodidad de la producción de membranas capilares de fibra hueca, últimamente pueden traducirse en la alta productividad y el bajo costo de los sistemas de HFBR. No es de sorprender por lo tanto, la demanda creciente para varias proteínas terapéuticas y diagnósticas, tal como erythropoyetina (EPO), hormona humana del crecimiento, los factores de coagulación de sangre, o anticuerpos monoclonales (MAbs), lo que ha estimulado el interés considerable en la producción comercial de dispositivos de fibra hueca.

Aunque la tecnología del ADN recombinante (Alberts, *et al.* 1.994) ha ofrecido la posibilidad de obtener algunos de estos productos genéticamente modificando las células de bacterias, plantas, insectos, o de levaduras (que crecen generalmente más rápido y requiere medios menos complejos), ha sido fundamental que la mayoría de las proteínas útiles se pueden obtener en una forma completamente funcional sólo usando las células de mamíferos (Belfort, 1.989). La opción de cultivar las células procariotas (por ejemplo, *E. coli*) en reactores de fibra hueca ha provocado gran interés. Inclusive el posible agotamiento del oxígeno debido a la muy alta especificidad (en otras palabras, por la célula) en las tasas de recepción de oxígeno (Piret y Cooney 1.990 a); la producción de endotoxinas, que puede causar la contaminación del producto, la ubicación intracelular del producto, que requiere su extracción del lisado; o el crecimiento potencial excesivo de la célula conduciendo al daño de la fibra (Inloes *et al.* 1.983).

Recientemente, la producción de anticuerpos monoclonales en HFBRs ha sido una alternativa cada vez más viable a la manera tradicional de obtener MAbs de tumores de ascites de ratones. Aunque la última tecnología pueda ser competitiva con el cultivo de la célula en términos del costo y de la concentración del producto, también sufre serias desventajas, tal como los asuntos éticos, los problemas prácticos con el manejo de gran número de animales en la producción a gran escala, el alto riesgo de la contaminación del producto por virus y anticuerpos extraños, y por las limitaciones a obtener anticuerpos humanos de roedores (Jackson, *et al.* 1.996). Por todas las razones anteriores, ha habido una rápida expansión de investigación en el campo de la célula mamífera en HFBRs en décadas recientes.

Numerosos diseños de HFBR se han propuesto (Tharakan *et al.* 1.986), pero la opción más convencional implica atrapar las células de mamíferos en el espacio extracapilar (ECS), o en el lado de la carcasa, de un cartucho cilíndrico densamente empacado con fibras huecas que se fijan en ambos extremos en un apoyo de epoxi (figura 9 y 10). El flujo de la recirculación del medio por el lumen de la fibra, o por el espacio intracapilar (ICS), permite el intercambio del oxígeno así como nutrientes y

metabolitos pequeños con el ECS, así proporcionando a las células condiciones fijas de crecimiento. El flujo de la recirculación del ICS es análogo al flujo de la sangre por capilares empotrados en el tejido, y la configuración entera mimetiza hasta cierto punto un sistema in vivo. Las dos regiones anulares, sin fibras en ambos extremos del cartucho son los múltiples de ECS; ellos son usados para introducir las células y el medio fresco en el ECS y para cosechar la proteína del producto.

El múltiple puede atrapar también algunas de las células y las proteínas, lo que puede complicar la operación del bioreactor. Dependiendo de las características de la membrana de ultrafiltración se puede retener la mayoría de las proteínas en el ECS, es posible concentrar el producto útil antes de cosechar, con lo cual reducir el gasto de la purificación subsiguiente aguas abajo.

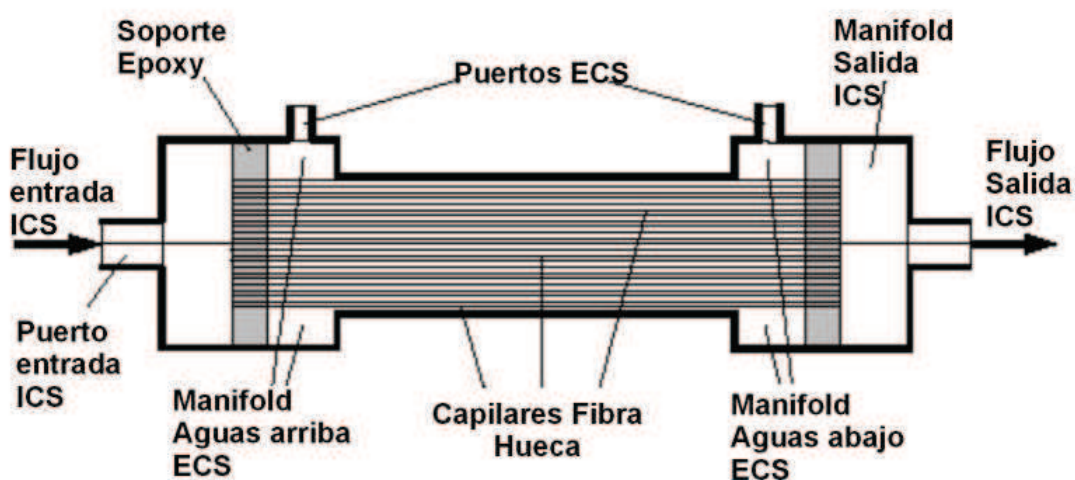


Imagen tomada de: Labecki, M., *et al* 1995

Figura 9. Sección Longitudinal de un cartucho capilar de fibra hueca típico.

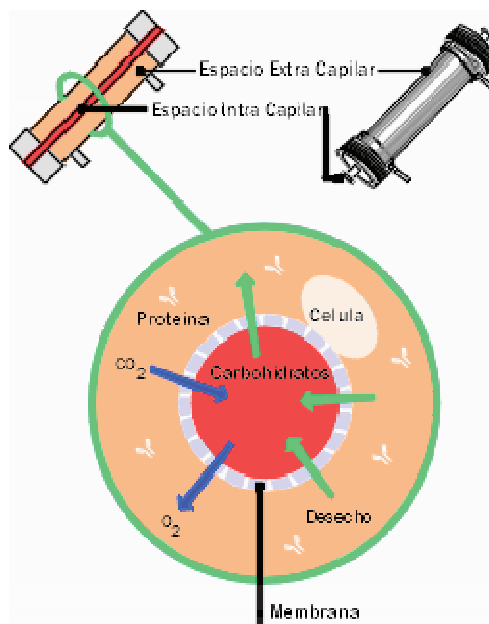


Imagen tomada de: http://www.ivss.de/.../prinzip_e1.gif

Figura 10. Sección Transversal de un capilar de fibra hueca típico.

Si los dos puertos de ECS del cartucho de HFBR mostrados en la figura permanecen cerrados durante el transcurso del cultivo, la configuración correspondiente del flujo se conoce como carcasa cerrada, en este caso, se presenta un declive de la presión axial en el ICS, en presencia de las membranas esto induce un flujo secundario en el ECS, lo cual también se conoce como flujo de Starling¹

Como una consecuencia, las células y las proteínas pueden ser conjuntamente llevadas río abajo a la parte del ECS (Piret y Cooney 1990b) Cual puede dirigir a heterogeneidades espaciales en el ambiente del crecimiento y de aquí en adelante empeoramiento del desempeño de bioreactor.

Las configuraciones del flujo con por lo menos un puerto de ECS abierto son llamadas carcasa abierta; la mayoría de operaciones de carcasa abierta, importantes en el cultivo de células en HFBR son inoculaciones o introducción del medio

¹ El fisiólogo inglés Ernest H. Starling, 1866-1927, estudió el intercambio de líquido análogo entre tejidos del cuerpo y vasos sanguíneos (Starling 1896).

conteniendo las células en el ECS, en cosechar o en la recolección del producto del ECS.

Inoculación y cosechar se llevaron a cabo típicamente contracorrientes y contra el flujo del bulto ICS, respectivamente, con ambos puertos ECS abiertos, aunque otras configuraciones pueden ser usadas también. Más información en lo biológico y las bases que dirigen el cultivo de la célula de HFBR, específicamente en los detalles de la operación de bioreactor y las fases diferentes del cultivo.

Las promesas y los desafíos del cultivo de la célula en HFBRs han alentado muchísimo los trabajos de modelado. Inicialmente el modelo HFBR incluyó generalmente la cinética de bajo peso molecular (bajo-MM) consumo de substrato y transporte convectivo en las membranas y en el ECS (Rony 1.971, Piret y Cooney 1.991). Muchos de los subsiguientes experimentos (Heifetz *et al.* 1.989, Piret y Cooney 1.990 b) así como también los estudios teóricos (Kleinstreuer y Agarwal 1.986) reconocieron la importancia del transporte convectivo del ECS en la operación de HFBR, Los modelos de cultivo celular (Brotherton y Chau, 1.996, Labecki, *et al.* 1.995) y análisis de crecimiento tanto en el ECS (Casciari, *et al.* 1.994, Chresand, *et al.* 1.988, Jáuregui, *et al.* 1.994, Luque, *et al.* 1.999, Sardoni y DiBiasio, 1.993) como en el ICS (Adema y Sinkey, 1.987), en células de mamíferos (Ku, *et al.* 1.981, Patkar, *et al.* 1.993, Piret, *et al.* 1.991) y en la producción de anticuerpos monoclonales (Altshuler, *et al.* 1.986, Evans y Miller, 1.988, Kurkela, *et al.* 1.993, Lowrey, *et al.* 1.994), así como algunos estudios realizados en los HFBR (Gramer y Poeschl, 1.998, Gramer, *et al.* 1.999).

Los modelos de investigación desarrollados más recientemente justificaron adicionalmente el efecto de la presión osmótica debido al rechazo de la proteína por las membranas, que era fundamental para influir por ser uno de los factores cruciales en la distribución de la proteína en el ECS (Patkar *et al.* 1.995, Labecki *et al.* 1.996, 1998, Koska *et al.* 1.997).

Estreptoquinasa

La Estreptoquinasa (SKC) es una de las proteínas precursoras de la terapia del tratamiento trombolítico, así como: el t-PA (activador tisular de plasminogeno), la uroquinasa y el APSAC, el descubrimiento de la SKC se remonta a los trabajos de Christensen en los años 40 (Christensen, 1.949) citado por Cruz, J (1.997), basado en el descubrimiento de Tillett y Garner (1.933) en el cual se reportaba la licuefacción rápida de coágulos de fibrina que presentan sobrenadantes de cultivos de estreptococos hemolíticos.

Tras los trabajos de Milstone y posteriormente de Christensen se descubrió la relación de activación que presentaba el plasminogeno (PLG) por la SKC. (Milstone, 1.941; Chirstensen, F. 1.945) citado por Cruz, J (1.997). La estreptoquinasa (SKC) es una exoproteína con un peso molecular de aproximadamente 45 kDa (Castellino, F. *et al.* 1.976) producida por estreptococos β -hemolíticos de una sola cadena de 414 amino ácidos. (Malke, H. 1.995).

Al unirse al plasminogeno (PLG) (un zimogeno), forma un complejo autocatalítico, el cual puede transformar el PLG en plasmina (PLM) forma activa de la proteína (Lottenberg, R. *et al.* 1992); esta es una serino proteasa que interviene en la diferenciación celular, la fibrinólisis y en el proceso metastásico de las células cancerosas (Mayer, M. 1990; Lovescio, C. *et al.* 1.987) la estreptoquinasa por si sola no posee actividad enzimática, solo es capaz de activar al PLG y transformarlo en PLM formando un complejo equimolar.

En los años 50' se demostró que trombos experimentales, inducidos en venas humanas, podían ser lisados por soluciones de SKC inyectadas por vía intravenosa (Johnson y Mc.Carty, 1.959). En 1.958 se inicio la aplicación de la SKC en pacientes con infarto al miocardio, por medio de cateterismo, en las dos primeras horas después de la aparición de los síntomas.

La SKC presenta la particularidad no solo de ser el primer trombolítico de aplicación médica, también ha demostrado su capacidad terapéutica después de más de 70 años de su descubrimiento por Tillet y Garner (1933). Los nuevos protocolos de aplicación y una rigurosa selección de los pacientes han aumentado la tasa de supervivencia en más de 50%, un año después del tratamiento (Werf, 1.991).

Además, la SKC ha demostrado ser un buen medicamento con un alto porcentaje de supervivencia, si es aplicado en un tiempo menor a las seis (6) horas de haberse presentado los primeros síntomas. La respuesta inmunológica expresada por el paciente contra la SKC es controlable a la hora de una emergencia cardiaca y se compensa con su eficiencia como activadora del PLG, siendo esta eliminada del torrente sanguíneo, después de 30 min. aproximadamente. (Bachmann, 1.995).

La SKC es una de muchas proteínas de estreptococos que intervienen en el mecanismo de patogenicidad. Todo microorganismo patogénico, necesita desplegar toda una serie de estrategias para invadir al organismo huésped y luego para contrarrestar la respuesta que el hospedero presente contra él.

En el caso de estreptococos se despliegan varias proteínas y péptidos que tienen como finalidad facilitar la invasión y la supervivencia de la bacteria, entre las que se encuentran:

La estreptolisina S (SLS) y la estreptolisina O (SLO), que son proteínas producidas por estreptococos de los grupos A, C y G. Las estreptolisinas son toxinas bacterianas, que provocan potentes daños a la membrana al formar canales a través del colesterol contenido en la membrana celular (Bhakdi, 1.985).

La SLS es la proteína responsable de la β -hemólisis detectada en medios sólidos de agar sangre.

La Hialuronidasa interviene en la invasión del huésped, siendo el sustrato de esta enzima el ácido hialurónico, el cual es uno de los componentes de la matriz que consolida muchos tejidos, la hialuronidasa facilita la diseminación bacteriana en los tejidos de las mucosas (Hyne y Ferretti, 1.989).

La proteínasa estreptococal (**PS**) es una exoproteína del tipo sulfidril proteínasa, similar a la papaína, esta enzima es secretada como un zimógeno de 42 KDa. La cual causa daño tisular, aun cuando su mecanismo no está muy claro (Liu y Elliott, 1971). La **PS** es un fuerte inmunógeno, representando una alta toxicidad para el hospedador (Todd, 1947).

Un grupo de proteínas de crucial importancia dentro de la toxicidad de estreptococos son las Toxinas Eritrogénicas (Dick y Dick, 1924), definidas como toda sustancia generada por estreptococos que causa reacciones en la piel en razón de su actividad biológica o naturaleza bioquímica.

Las toxinas eritrogénicas conocidas son: la toxina de Dick, la exotoxina pirogénica estreptococal, la toxina de la fiebre escarlatina, blastogenos y mitogenos. Por tanto las toxinas eritrogénicas causan una variedad de efectos biológicos como reacción epidérmica, pirogenicidad, mitogenicidad, alteraciones en la producción de anticuerpos y destrucción del retículo del endotelio, al igual que un aumento del shock endotoxico y cardiotoxicidad (Alof, 1.980; Ginsburg, 1.972; Watson, 1.970).

Una de las proteínas más estudiadas en estreptococos, en los últimos años es la familia de las proteínas **M**, la cual juega un papel primordial en la supervivencia de la bacteria ante el hospedero, su función esta relacionada con la capacidad de inhibir la fagocitosis por los polimorfonucleados y al mismo tiempo disminuir la capacidad de opsonización del suero (Pérez-Casal, 1.991).

El gen de la SKC se encuentra en una región lejana y distinta de cualquier gen relacionado con la patogenicidad, entre las particularidades de la SKC está el ser una de las proteínas más abundantes en estreptococo, ya que alcanza el 30% de las proteínas excretadas. Siendo la proteína de gran necesidad por parte de la bacteria para su desarrollo.

Organización Genética de la Región Estreptoquinasa:

El gen de la estreptoquinasa se encuentra dentro de un operon 8.931 pb de longitud que codifica para otras cinco proteínas (Mechold, 1993)

El gen **skc**, codifica para la estreptoquinasa que se transcribe en dirección contraria al gen **lrp**. Las regiones -35 del promotor 1 de **skc** y el promotor de **lrp** tienen orientaciones opuestas y están separadas por una región de ADN de 202 nucleótidos rica en regiones AT e intrínsecamente curvado (representado como B en la figura 11). Esta región está ubicada aguas arriba de los promotores del gen **skc** y es necesaria para la total expresión del mismo; se cree que esta región (conocida como USR) pueda contener un sitio de enlace para algún regulador positivo y ser una señal de reconocimiento del ADN durante el inicio de la transcripción (Gross, *et al.* 1.996).

El centro de la curvatura del USR está localizado dentro de una región repetida inversa con un tallo de 10 pb de longitud y un lazo de 4 nucleótidos. El USR se enlaza directamente a la polimerasa más o menos a 40 pb aguas abajo del centro curvado global (Gross, *et al.* 1.996).

El gen **lrp**, codifica para una proteína rica en leucina con un zipper de leucina en el C-terminal, denominada LRP y cuya función es desconocida.

Todas las cepas (estreptococos) que contienen el gen **skc** poseen también **Irp**, y aquellas que no poseen **skc** tampoco poseen **Irp**. Sin embargo, mutantes **Irp** obtenidos por mutagénesis de inserción de plásmidos aislados de H46A son viables y producen estreptoquinasa en cantidades similares al tipo salvaje, sin presentar otro fenotipo realmente diferente (Malke, *et al.* 1.995).

El gen **abc**, codifica para una proteína de transporte que enlaza ATP, la cual es homóloga a los transportadores de azúcares de bacterias gram positivas y gram negativas (Frank, *et al.* 1.995). El gen **dexB**, codifica una dextran-glucosidasa; además el gen **skc** transcribe en dirección convergente a la secuencia **ORF1** y al gen **rel**, que codifica para una proteína de 739 aminoácidos denominada **Rel** emparentada con **RelA** y **SpoT** de *E. coli*, codificadas por **relA** y **spoT** quienes participan en la síntesis y degradación de la polifosfato guanósina [(p)ppGpp] durante la respuesta regulatoria en carencia de aminoácidos y fuentes de carbono. Entre estas tres proteínas existe una homología de un 59 %.

ORGANIZACIÓN GENÉTICA DE LA REGIÓN SKC EN EL CROMOSOMA DE *S. equisimilis* H46A

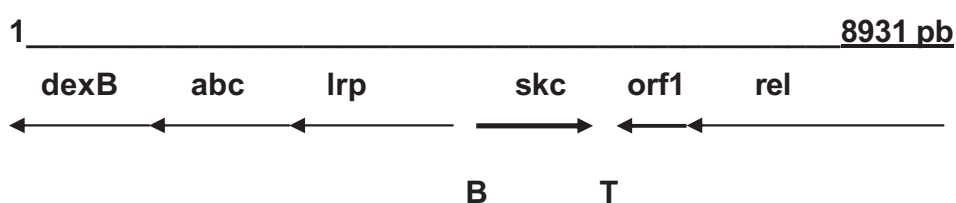


Figura.- 11

Las flechas simbolizan los genes y su orientación, **B** simboliza un locus de ADN con una curvatura (USR). **T** simboliza un terminador de la transcripción bidireccional (Malke, *et al.* 1.995)

Secuencia del Gen *skc*:

La secuencia presentada en la figura 12, consiste de 2.568 pb así como una larga región, con marco de lectura abierta, con 1.320 pb codificando para la pre-estreptoquinasa, el cual contiene el único sitio de corte HindIII (Malke y Ferretti, 1.984). La proteína deducida de esta secuencia con un sitio de iniciación ATG en posición 819-821 y una extensión de terminación con el codón TAA en posición 2.139-2.141, comprende una región de 440 aa. con un peso de 50.084 Daltons (Malke *et al.* 1.985).

Comenzando con el primer nucleótido del sitio Pst 1 en el extremo 5'. La secuencia de aa se muestra encima de la nucleotídica usando el código de una letra para designación de aa, el sitio de corte del péptido señal es señalado por una flecha curva (aa 26/27). La secuencia del promotor y SD están subrayadas. Aguas abajo del gen **skc** las secuencias palindromicas que se presumen un terminador de la transcripción son indicadas por flechas.

Aunque el precursor transitorio de la SKC no ha podido ser demostrado, es claro que esta proteína está precedida por una región peptídica hacia el N-terminal. La secuencia predicha de este péptido líder, la cual, comprende 26 aminoácidos, exhibe el típico diseño visto para otros péptidos señales en procariontes (Michaelis y Beckwith, 1982); este diseño está caracterizado por una región N-terminal cargada positivamente (Lys-2), inmediatamente seguido por una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos, un residuo serina seguido de un centro sin carga y localizado al lado de la región C-terminal de la señal, una glicina en el dominio hidrofóbico y un residuo alanina en el sitio de corte del péptido señal.

La secuencia de corte entre el péptido señal y la SKC madura (ala-ile) ha sido determinada por secuenciamiento nucleotídico y completada por secuenciamiento químico (Jackson y Tang, 1.982); dicha secuencia compromete a la alanina y a la isoleucina en la posición 272-275.

Regulación en la producción de SKC.

La producción de SKC esta regulada por represión catabólica. En un estudio realizado por Cruz, J. en 1.997, se demuestra que la glucosa reprime la producción de SKC, ya que, al agregar pulsos de glucosa a un cultivo de *S. equisimilis* crecido en maltosa, la síntesis de SKC se detiene. También comprueba que la maltosa no activa a la SKC, sugiriendo que su efecto regulador es más bien sobre la biosíntesis, que sobre la activación de un precursor inactivo. Señala además como buenos candidatos a inductor de la síntesis de SKC, entre otros, a péptidos resultados de la digestión enzimática por parte de la plasmina.

La existencia de un evento de represión catabólica por parte de la glucosa sobre la producción de estreptolisina S (SLS), exoproteína de estreptococos fue reportada por Taketo, *et al.* 1974.

Es de resaltar la existencia de múltiples receptores de superficie de estreptococos los cuales reaccionan específicamente con moléculas orgánicas, péptidos, el plasminogeno, la plasmina, la albúmina e inclusive con el fibrinogeno o la fibrina. La existencia de estos receptores sugiere la posibilidad de un evento de inducción de los operones patogénicos, por medio de una señal proveniente del huésped.

En una investigación realizada sobre 19 cepas de estreptococos y empleando diferentes medios se observo que la capacidad de la mayoría de las cepas para activar el plasminogeno depende del medio de cultivo, siendo mayor en los medios suplementados con hidrolizado de caseína. (Leigh, *et al.* 1.998)

Por las investigaciones realizadas se encontró que utilizando un caldo de péptidos dializados, con un tamaño menor a 10.000 daltons, producía un aumento en la producción de estreptolisina O (SLO), exoproteína de estreptococos (Taketo, 1.965) se encuentra también que suplementar los medios de cultivo con hidrolizado de caseína, incrementaba la habilidad del estreptococo para activar el plasminogeno (Leigh, *et al.*

1.998) se encuentra además un aumento en la producción de SKC, utilizando un medio suplementado con peptona de caseína.

La estreptoquinasa para ser administrada a un paciente debe tener el mayor grado de pureza posible, Es necesario producirla con la menor cantidad de proteínas acompañantes. Ellas entorpecen y complican el proceso de purificación, reduciendo el rendimiento y aumentando los costos. El mejor medio de cultivo para producir SKC se obtiene con peptona menores a 10.000 daltons, suplementado con glucosa-maltosa. (Torres, A. 2.000)

En el Laboratorio de Biología y Medicina Experimental se viene trabajando sobre la producción de SKC desde 1.989, y se han realizado diversos experimentos de optimización de los parámetros de crecimiento y producción de estreptoquinasa por *S. equisimilis*.

Una de las observaciones estuvo relacionada con la cinética de síntesis de la SKC, en la cual se podía notar que la mayor producción de la proteína se presentaba hacia la finalización de la fase exponencial, lo que coincidía con una drástica disminución de la glucosa en el medio de cultivo (Cruz, J. 1.991), otra observación de mucha importancia fue la de comprobar la existencia de un fenómeno de represión catabólica relacionada con la producción de la SKC (Cruz, J. 1.997).

El presente trabajo intenta establecer si es posible la producción de altos niveles de estreptoquinasa en un HFBR, para lo cual utilizaremos el medio MSP suplementado con glucosa y maltosa descrito por Cruz (1.991).

Hipótesis de Trabajo:

- Si se utiliza el Bioreactor de Fibra Hueca (HFBR) se podrá obtener un aumento en la producción de estreptoquinasa, comparada con la fermentación en Batch.

Objetivos:

- Estandarizar el uso del HFBR en la producción de estreptoquinasa.
- Obtener una alta producción de estreptoquinasa.

Justificación

El medio de cultivo idóneo para producir estreptoquinasa con miras a ser purificada, es el medio con peptonas de peso molecular menor a 10.000 daltons suplementado con Glucosa-Maltosa (Torres, A. 2000)

El sistema de fibra hueca es una alternativa para cultivar el estreptococo de forma segura ya que el confinamiento de las células en un sistema cerrado, permite reducir el volumen de cultivo, esto facilita la manipulación del sistema en las etapas posteriores (proceso de purificación)

La estreptoquinasa es el activador de plasminogeno, mas económico que se usa actualmente, mejorar su producción disminuirá el costo del producto, siendo mas accesible a los pacientes. Con esta investigación nos proponemos, utilizando el sistema de fibra hueca lograr un aumento en la producción de estreptoquinasa, además de buscar un posible medio alternativo de reducción de costos.

Materiales y Equipos Requeridos

- **Material Biológico:** *Streptococcus equisimilis*, bacteria gram positiva β -hemolítica del grupo serológico C (Cowan y Seel, 1965) cepa 9542 de ATCC.
- **Cartuchos de Fibra Hueca:** Acetato de Celulosa, Área de superficie 1,7 mts², coeficiente intercambio 8,3 ml /mm /hr., Volumen oscurecimiento 110 ml, modelo CA-170, (Baxter, 1.989)
- **Material de vidrio** (Ver Anexo 2)
- **Equipos** (Ver Anexos 2)
- **Materiales varios y fungibles** (Ver Anexo 2)
- **Reactivos** (Ver Anexo 2)

Metodología a utilizar:

- Medio de cultivo suplementado con peptonas.
- Medio sólido Agar Sangre.
- Medio Caldo Tioglicolato.
- Inóculos de la cepa *Streptococcus equisimilis*.
- Fermentación en Batch de 4 litros.
- Fermentaciones de 4 y 10 litros con bioreactor de fibra hueca.
- Medidas de Crecimiento.
- Medidas de Consumo de Carbohidratos (Glucosa y Maltosa).
- Producción de Estreptoquinasa.
- Métodos de Dosaje de la Estreptoquinasa.

Medio de Cultivo:

Medio Suplementado con Peptonas (MSP): El medio de cultivo utilizado en nuestros experimentos es un medio rico en peptonas de caseína, suplementado con vitaminas, nucleótidos, fuentes de carbono, sales y dos amortiguadores: fosfato y carbonato-bicarbonato. Este es una modificación del medio mínimo de Van De Rijn (1.980) al que se le sustituyeron los aminoácidos por peptonas (Cruz, 1.991; Torres, 2.000) (tabla 1). Preparación: (Anexo 3)

Grupo	Componente	(mg/ litro)
I	FeSO ₄ x 7H ₂ O	5
	Fe(NO ₃) ₂ x 9H ₂ O	1
	K ₂ HPO ₄	200
	KH ₂ PO ₄	1000
	MgSO ₄	700
	MnSO ₄	5
Grupo		
II	Pepticasa	27000
Grupo		
III	Ácido-p-aminobenzoico	0.2
	Biotina	0.2
	Ácido Fólico	0.8
	Niacinamida	1
	NADPH	2.5
	Pantotenato de calcio	2
	Pididoxal	1
	Piridoxamina	1
	Riboflavina	2
	Tiamina	1
Vitamina B-12	0.1	
Grupo		
IV	Glucosa	8000
	Maltosa	12000
Grupo		
V	Adenina	20
	Guanina	20
	Uracilo	20
Grupo		
VI	Cloruro de Calcio	10
	Acetato de sodio	4500
	L-Cisteina	500
	Bicarbonato de sodio	2500
	NaH ₂ PO ₄	3195
	Na ₂ HPO ₄	7350

Medio Sólido Agar Sangre:

El medio sólido agar sangre, es un medio rico para el cultivo y aislamiento de organismos patógenos (Difco, 1978) o microorganismos hemolíticos como en el caso de *S. equisimilis*.

Su composición es:

Componente	Cantidad
Sangre fresca	5%
Tryptosa	10,0 gr.
NaCl	5,0 gr.
Agar-agar	15,0 gr

Preparación del medio: (Anexos 3)

Medio Caldo Tioglicolato; Este medio se usa para la multiplicación de bacterias anaeróbicas estrictas facultativas y bacterias microaerofilas. Debido al contenido de sustancias reductoras, el tioglicolato de sodio y la cisteína.

Componente	Cantidad (gr/lit)
Peptona de caseína	15
Extracto de levadura	5
D(+) Glucosa	5.5
L(+) Cisteína	0.5
Cloruro de sodio	2.5
Tioglicolato de sodio	0.5
Resarsurina de sodio	0.001
Agar-Agar	0.75

Preparación del medio: (Anexos 3)

Inóculos de la Cepa *Streptococcus equisimilis*

Preparación del inóculo: El inóculo se prepara con un día de anticipación, cultivando una muestra de células frescas (2 a 3 colonias) crecidas en medio agar sangre o conservadas en frío (200 µl) en 100 ml de MSP con glucosa a 37 °C toda la noche.

Preparación del sistema de fermentación

En el anexo 8 se incluirá una lista detallada de todos los materiales necesarios que constituyen el sistema de fermentación.

Sistema computarizado

El proceso de fermentación es controlado a través de un software diseñado por CITEC-ULA; el sistema comprende sensores que controlan las variables: pH, temperatura, tiempo de fermentación; el sistema debe ser calibrado debidamente antes de iniciar el proceso. Se realiza una descripción detallada en el Anexo 4.

Sistema Mecánico

El fermentador se lava y se ensamblan todos los accesorios, los circuitos (mangueras y válvulas) que permiten la entrada y recirculación del medio, inóculo y solución básica para controlar el pH, el fermentador ensamblado se esteriliza en autoclave por 30 minutos a 120 °C.

Posteriormente se instalan al fermentador, en ambiente estéril, el sensor de temperatura (termocupla) y el electrodo de pH, la manta de calentamiento, el sistema de agitación, las bombas peristálticas para recircular el medio, agregar la solución básica,

agregar el inóculo del cultivo y el medio de cultivo (que se pasa a través de un filtro estéril al fermentador).

Finalmente el sistema se lleva a 37 °C y se procede a la inoculación para iniciar la fermentación.

Proceso de fermentación

El proceso de fermentación se inicia cuando se inocula el medio, los parámetros del cultivo son: pH 7,2, temperatura 37 °C y Densidad Óptica inicial mínima de 0,01, el sistema computarizado controla los parámetros y el tiempo de fermentación.

Los valores de absorbancia obtenidos son graficados versus el tiempo para seguir el proceso.

Se detiene la fermentación cuando la absorbancia ha alcanzado 5-6 unidades o cuando se observa una disminución en la pendiente, 10 a 12 horas después del inicio.

Determinación del Crecimiento

Después de inocular se toman muestras del cultivo cada 30 minutos, se determina la densidad óptica (D.O.) a 600nm, medidos en espectrofotómetro (Brock, T. 1.976), este valor se transforma en peso seco (mg/ml) mediante una curva de calibración y se grafica versus el tiempo.

Las muestras son centrifugadas a 12000 rpm para bajar las células y el sobrenadante es congelado para realizar las otras determinaciones.

Método de cuantificación de consumo de carbohidratos

Método para determinación de glucosa

Método enzimático para la determinación de glucosa en sangre, suministrado en un kit. (Qualitest)

Principio (Método de Trinder): Ver Anexo 5

Método para determinación de Maltosa

La Maltosa se determina utilizando la enzima maltasa; por definición una unidad de maltasa hidroliza 1 mM de maltosa transformándola en 2mM de Glucosa, esta glucosa esta determinada por el método enzimático para determinación de Glucosa en sangre. (Qualitest)

Se mezclan 20 μ l de muestra, 30 μ l de buffer fosfato a pH 6 y 30 μ l de maltasa a 0,02 U/ μ l, se incuba a 37 °C toda la noche, luego se toman 10 μ l de la mezcla para determinar la glucosa.

El valor obtenido se transforma en su equivalente en concentración de maltosa.

Métodos de cuantificación de la actividad estreptoquinasa

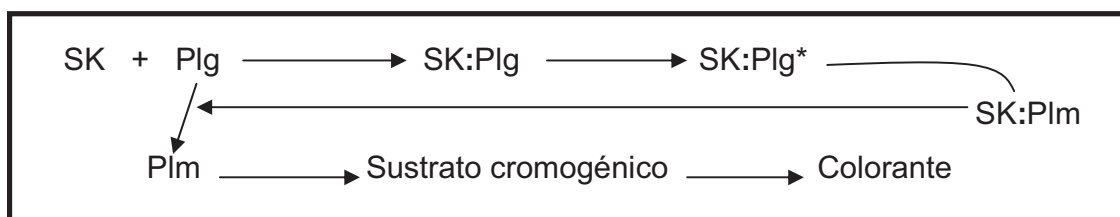
Método de cuantificación con Azocaseína.

Este método es una adaptación para la medida de microcantidades y lectura en placas de titulación de 96 pozos, propuesto por Beynon y Bond (1.990), citado por (Cruz, J. 1.997). El cual consiste en cuantificar la cantidad de producto coloreado producido por la acción de la Plasmina sobre azocaseína.

La mezcla de reacción contiene 25 μ l de Plasminogeno 20 η M, 50 μ l de Azocaseína al 1% y 40 μ l de buffer fosfato salino (PBS) a pH 7,4. se añaden 10 μ l de la muestra problema y se incuba por 15 min a 37 °C. La reacción se detiene con 125 μ l de TCA al 10%. Después de 10 min de centrifugación a 10000 rpm. Se revelan 200 μ l del sobrenadante con 50 μ l de hidróxido de sodio (NaOH 4 M) y se lee la densidad óptica a 455 nm. Los datos se comparan con una curva de calibración realizada con una dilución seriada 1/10 de estreptoquinasa.

Método para la determinación de la actividad estreptoquinasa con un sustrato cromogenico.

El Principio de este método se basa en el hecho que la estreptoquinasa forma un complejo 1:1 con el Plasminogeno (Plg), el cual cataliza la conversión del Plasminogeno libre a plasmina (Plm). La Plm generada hidroliza el sustrato D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilide. Liberando p-nitroanilide que absorbe la luz a 405 η m (Jackson, K. *et al.* 1.981)



En el ensayo se colocan, en una placa de microtitulación, la mezcla de reacción consistente de 10 μ l de muestra, 60 μ l de amortiguador (Tris 50 mM, pH 7,5) y 20 μ l de Plg (0,5 mg/ml), a esta mezcla, se agregan 10 μ l del sustrato (El sustrato preparado a una concentración de 5 mg/ml y luego mezclando 2 partes de la solución stock de Plm disuelta en agua a una concentración de 5 mg/ml con 3 partes de cloruro de sodio (NaCl), 1,77 M en buffer Tris- 0,032 M pH 7,5)

La placa de microtitulación se coloca en el elisometro, se mide densidad óptica a 405 nm por 10 minutos, los valores obtenidos se grafican para calcular el valor de actividad estreptoquinasa de la muestra.

Método de determinación de producción de estreptoquinasa por la actividad caseinolítica de la plasmina.

En una solución de Tris HCl 50 mM, Cloruro de Sodio (NaCl) 150 mM, 0,1% de Twin 80 y pH 7.4, se prepara Agarosa al 1% y se funde con una mezcla de leche descremada al 1% disuelta en la misma solución de Tris HCl 50 mM, conteniendo 10 mM de plasminogeno.

Se coloca en una placa (volumen de 30 ml) y se deja solidificar, luego se le abren huecos con un sacabocado de aproximadamente 2 mm de diámetro, se colocan las muestras (entre 10 y 20 μ l), se cubre la placa con papel plástico y se incuba a 37 °C por un periodo no menor de 12 horas. Transcurrido este tiempo se mide el halo de lisis y se extrapolan en la curva de calibración realizada en la misma placa.

Gráficos

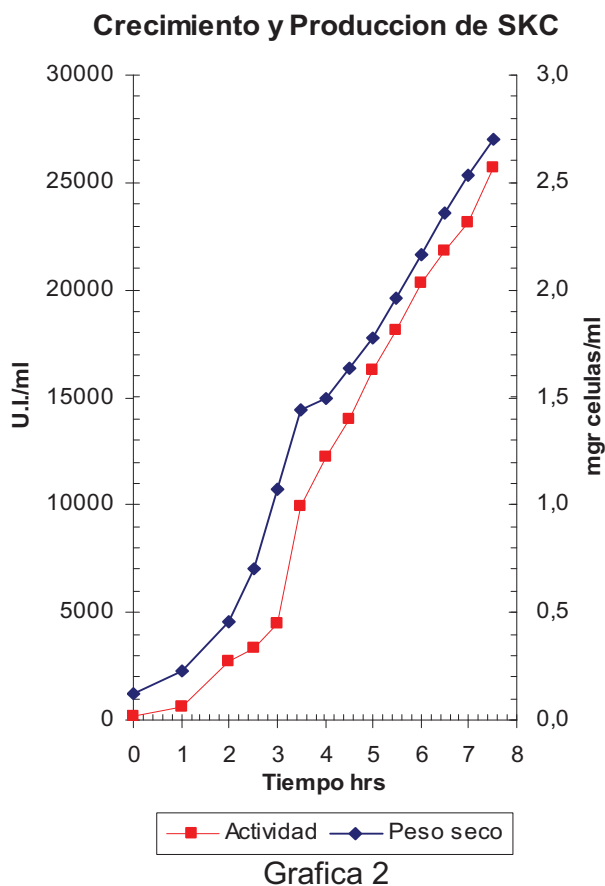
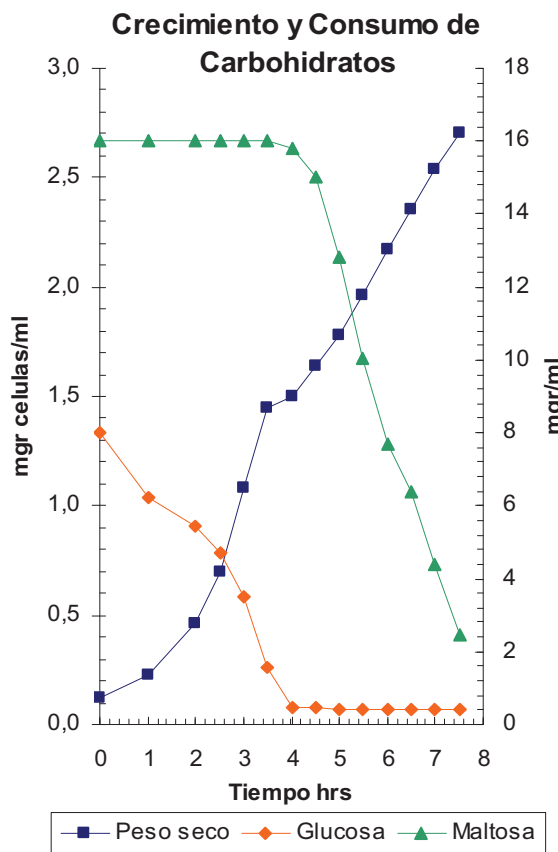
Se grafican peso seco y consumo de carbohidratos contra el tiempo de fermentación, para calcular la velocidad de crecimiento para cada uno de los carbohidratos.

Se grafican el peso seco y la actividad estreptoquinasa versus el tiempo de fermentación, para calcular la velocidad de crecimiento y la producción de estreptoquinasa.

La actividad específica (AE) es determinada graficando el peso seco (mg/ml) versus la actividad estreptoquinasa (U.I./ml) realizando una regresión lineal y calculando la pendiente de la recta, se calcula el valor de AE expresado en U.I./mg.

Resultados

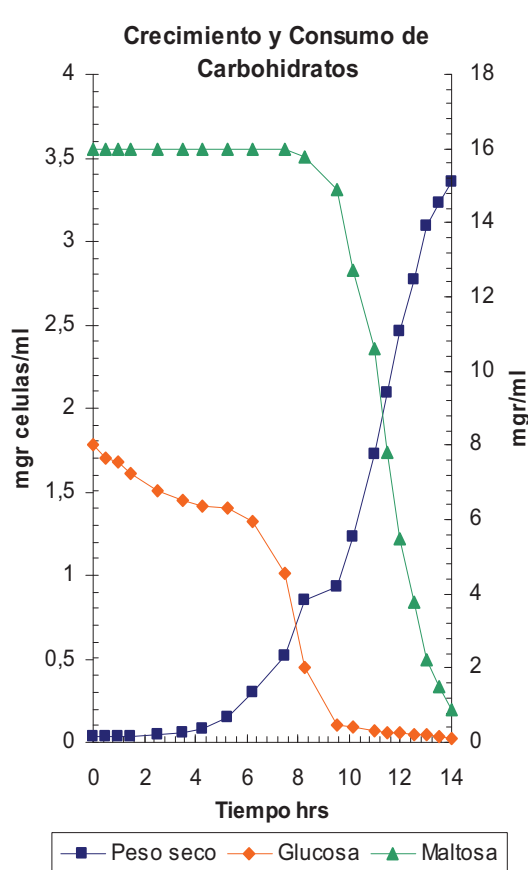
Fermentación de 4 litros de *S. equisimilis* en Batch.



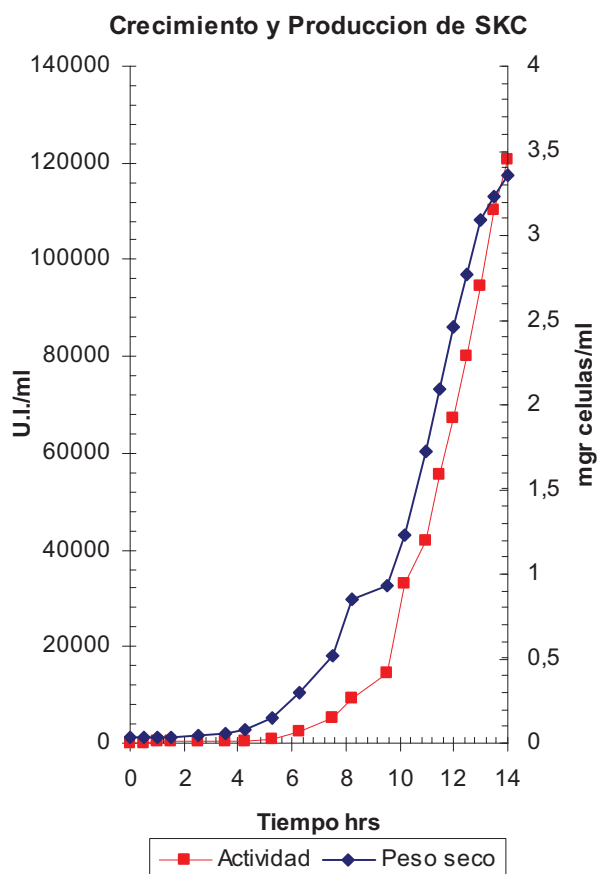
Grafica 1: se muestra la curva de crecimiento y las curvas de consumo de los carbohidratos, la curva de crecimiento presenta un punto de inflexión en la fase exponencial que coincide con el agotamiento de la glucosa y el comienzo del consumo de la maltosa. El valor máximo obtenido en peso seco es de 2,70 mg células/ml.

Grafica 2: se muestran las curvas de crecimiento y producción de SKC, la inflexión en la fase exponencial de la curva de crecimiento coincide con la inflexión en la curva de producción de SKC. El valor máximo de actividad es de 25.704 U.I./ml para esta fermentación.

Fermentación de 10 litros de *S. equisimilis* en Fibra hueca (ECS).



Gráfica 3

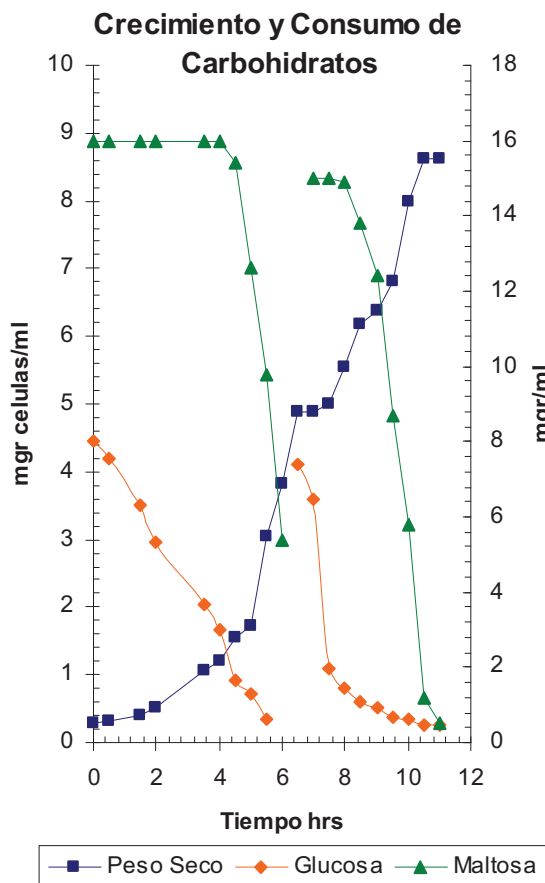


Gráfica 4

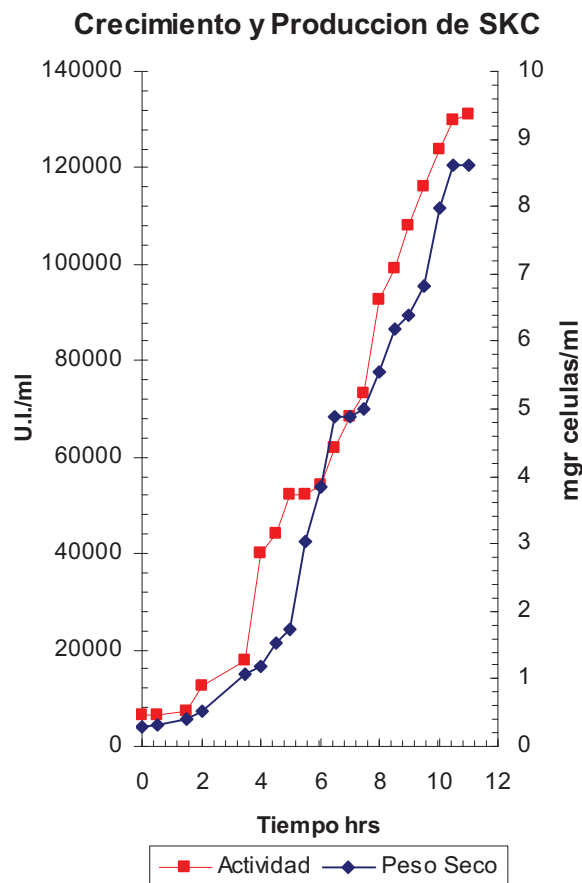
Gráfica 3: en la curva de crecimiento se observa una prolongada fase de latencia; presentándose un punto de inflexión en la fase exponencial, la cual coincide con el final del consumo de glucosa y el inicio del consumo de maltosa, finalmente en la curva se observan una disminución en el crecimiento, obteniéndose un valor máximo de 3,36 mg células/ml.

Gráfica 4: En la curva de producción se puede observar una inflexión o cambio de pendiente, que coincide con la inflexión en la curva de crecimiento, el valor máximo de producción SKC obtenido para esta fermentación es de 120.733 U.I./ml..

Fermentación de 4 litros de *S. equisimilis* en Fibra hueca (ECS).



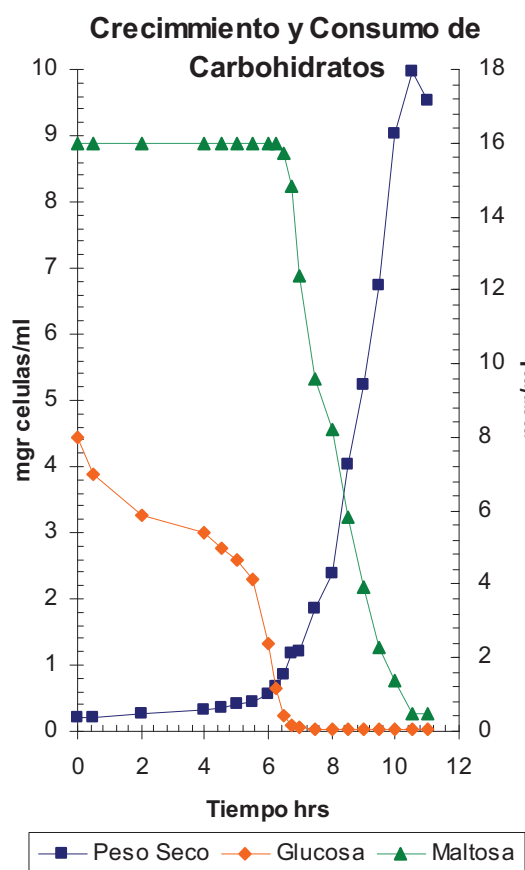
Gráfica 5



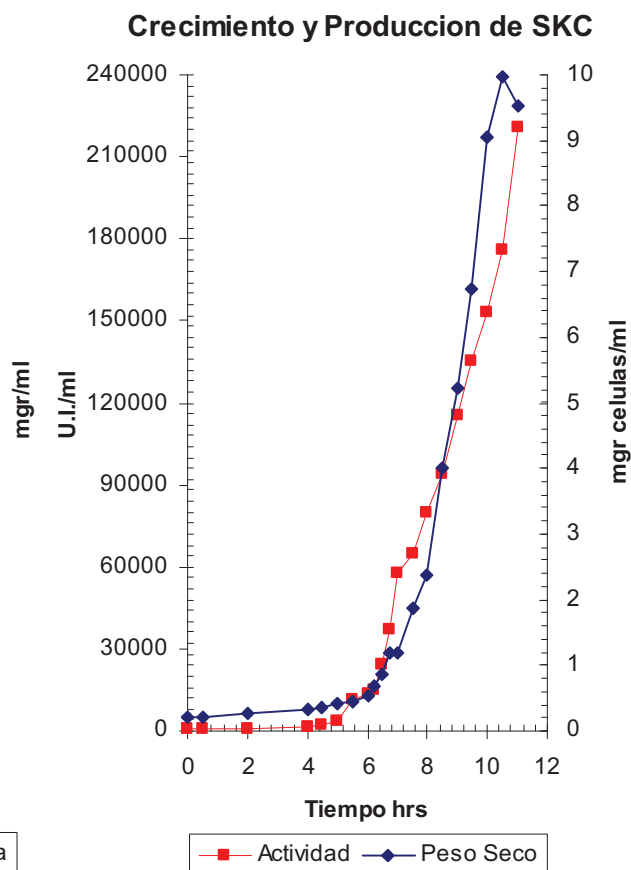
Gráfica 6

La curva de crecimiento en la grafica 5, presenta un primer punto de inflexión en la fase exponencial, un segundo punto de inflexión, que corresponde a una pequeña fase estacionaria y un tercer punto de inflexión en la fase exponencial siguiente, las inflexiones en las exponenciales corresponden, al final del consumo de glucosa e inicio del consumo de maltosa, el valor máximo de crecimiento obtenido es de 8,62 mg células/ml.

Gráfica 6: en la curva de producción se observan cambios en las pendientes que corresponden a los puntos de inflexión en la curva de crecimiento, obteniéndose una grafica muy particular, el valor máximo fue de 131.000 U.I./ml y el valor final fue de 129.842 U.I./ml.



Grafica 7

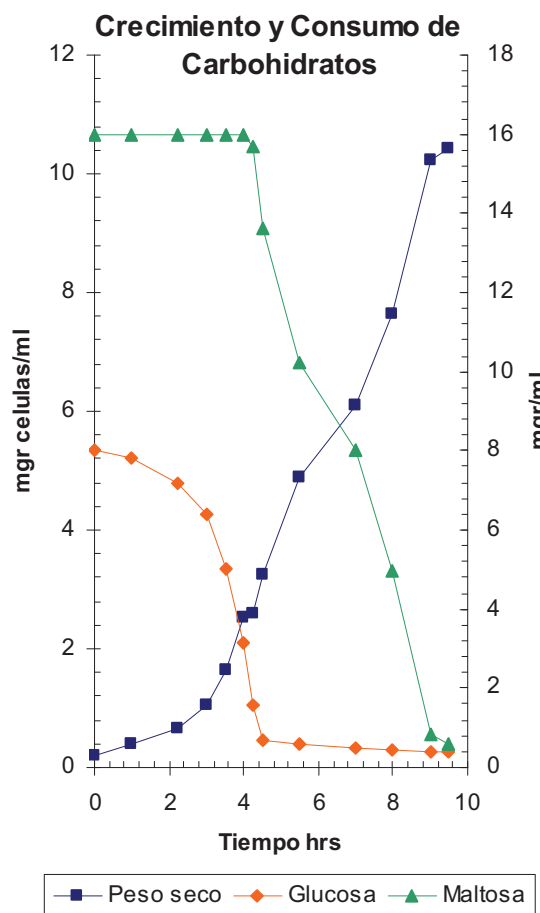


Grafica 8

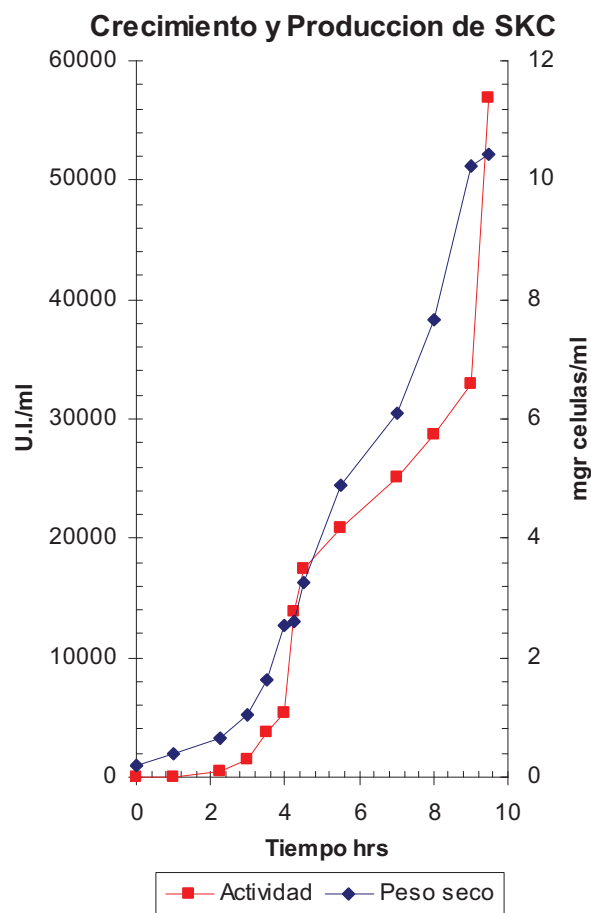
Grafica 7: se observa una fase de latencia; luego comienza una fase exponencial en la que se presenta un cambio en la pendiente de la curva de crecimiento, coincide con el agotamiento de la glucosa y el comienzo del consumo de maltosa, observándose una caída al final de la curva de crecimiento, el valor máximo obtenido en peso seco es de 9,97 mg células/ml y el valor final es de 9,54 mg células/ml.

Grafica 8: la curva de producción de SKC, presenta un cambio de pendiente que coincide con el cambio de pendiente presente en la curva de crecimiento, el valor final de actividad obtenida es de 220.883 U.I./ml.

Fermentación de 4 litros de *S. equisimilis* en Fibra Hueca (ICS).



Grafica 9

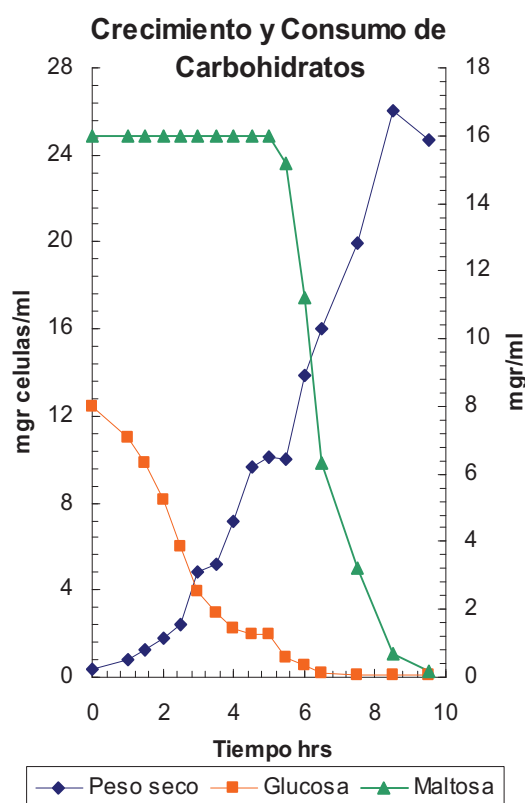


Grafica 10

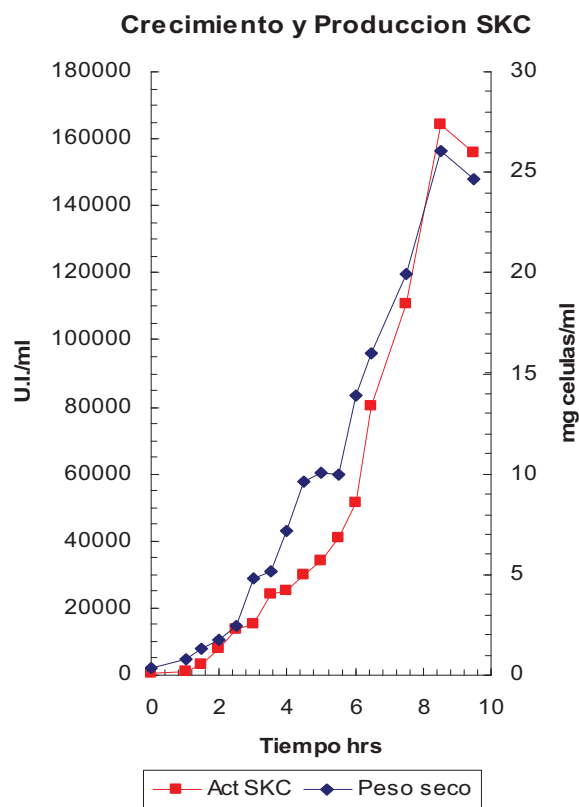
Grafica 9: se observa una fase exponencial en la que se presenta un cambio en la pendiente, la cual coincide con el final del consumo de glucosa y el comienzo del consumo de maltosa, finalmente en la curva de crecimiento se observa el inicio de la fase estacionaria, obteniéndose un valor máximo de crecimiento de 10,42 mg células/ml.

Grafica 10: el valor máximo de actividad SKC obtenida para esta fermentación es de 56.872 U.I./ml. En la curva de producción se puede observar un cambio de pendiente, que coincide con el cambio de pendiente en la curva de crecimiento.

Fermentación de 3 litros de *S. equisimilis* con dos cartuchos de Fibra Hueca conectados en serie (ECS).



Grafica 11



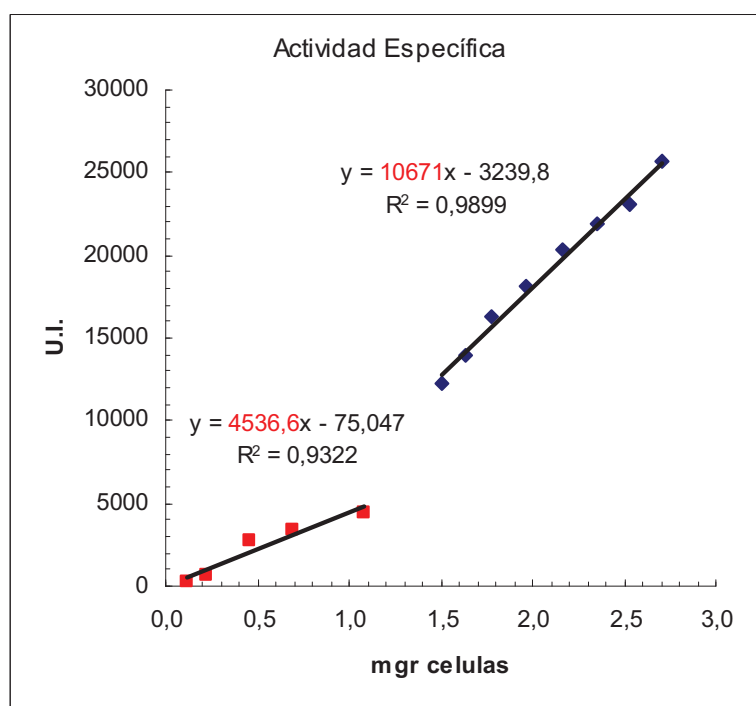
Grafica 12

Grafica 11: se muestra la curva de crecimiento, en el cual se presenta una inflexión en la fase exponencial de la curva, la cual coincide con el agotamiento de la glucosa y el comienzo del consumo de la maltosa, al final se observa una caída en la curva de crecimiento. El valor máximo obtenido en peso seco es de 26,06 mg células/ml y el valor final obtenido es de 24,66 mg células/ml.

Grafica 12: el valor máximo de actividad SKC obtenida para esta fermentación es de 164.088 U.I./mg y el valor final fue de 156.079 U.I./mg. En la curva de producción se puede observar un cambio de pendiente, que coincide con el cambio de pendiente en la curva de crecimiento, al final se observa una caída en la curva de producción.

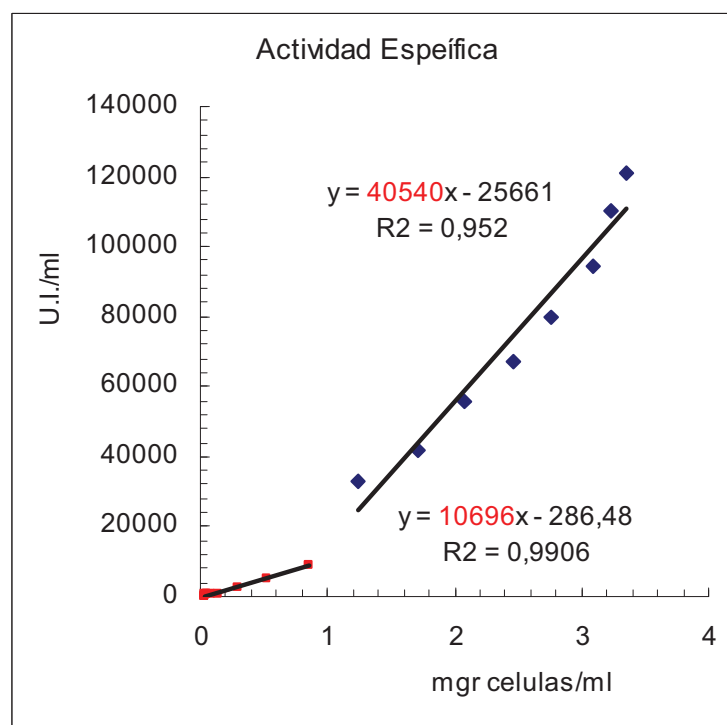
Actividad Específica

Fermentación de 4 litros de *S. equisimilis* en Batch.



Grafica 13

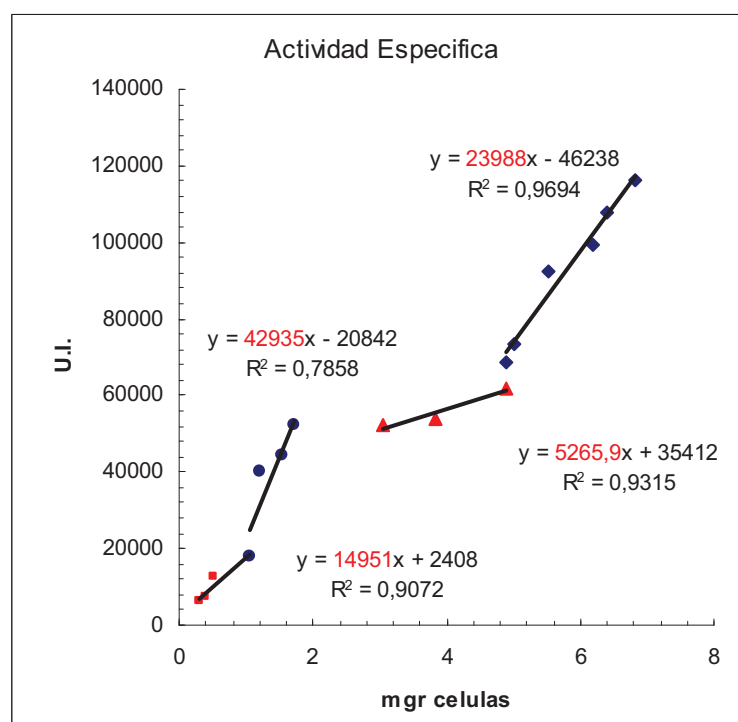
Grafica 13: al graficar la actividad SKC obtenida punto a punto versus el peso seco correspondiente se pueden observar dos pendientes, lo que implica que durante la fermentación se obtienen dos valores de Actividad específica una correspondiente al consumo de glucosa equivalente a 4.536 U.I./mg células y otra correspondiente al consumo de Maltosa equivalente a 10.671 U.I./mg células.

Fermentación de 10 litros de *S. equisimilis* en Fibra hueca (ECS).

Grafica 14

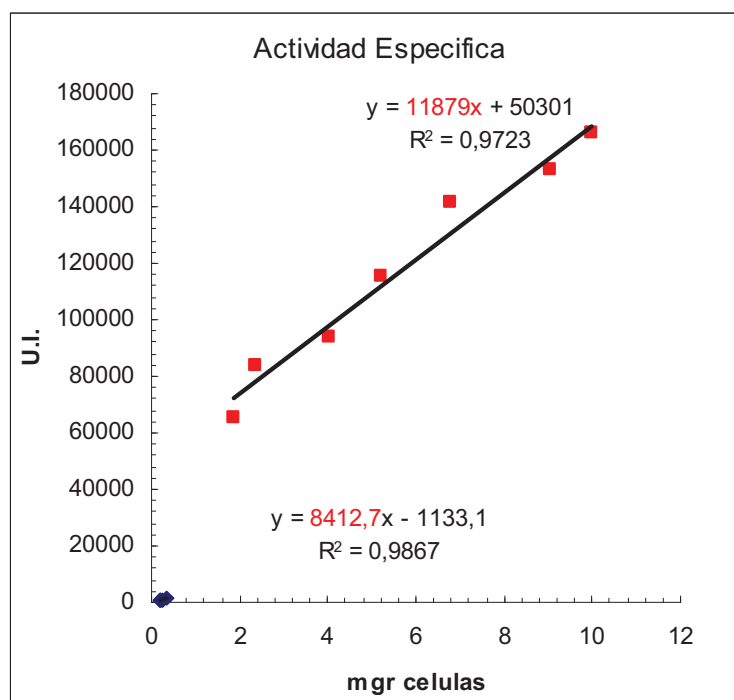
Grafica 14: al realizar la representación gráfica de la actividad SKC versus el peso seco obtenido en cada punto de la fermentación se pueden observar dos pendientes, los valores para cada una de las pendientes obtenidas son: 10.696 U.I./mg células y 40.540 U.I./mg células, equivalentes a las pendientes de consumo de glucosa y maltosa respectivamente.

Fermentación de 4 litros de *S. equisimilis* en Fibra hueca (ECS).



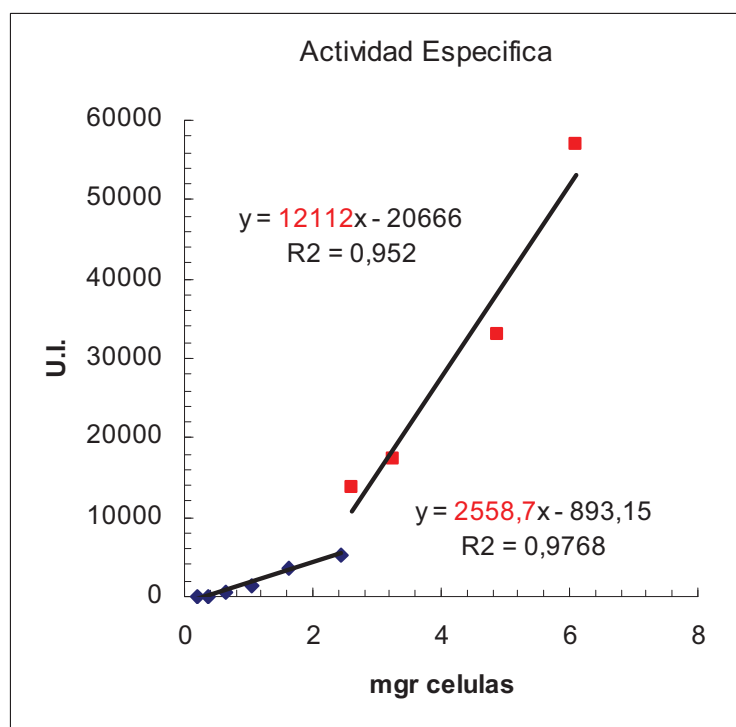
Grafica 15

Grafica 15: en la grafica de Actividad SKC versus Peso Seco se observan cuatro pendientes, que corresponden a las pendientes de consumo de los carbohidratos obteniéndose cuatro valores de Actividad Especifica, para cada una de las pendientes, los valores: 14.951 U.I./mg células y 5.265 U.I./mg células corresponden a los consumos de glucosa y los valores: 42.935 U.I./mg células y 23.988 U.I./mg células a los consumos de maltosa.

Fermentación de 4 litros de *S. equisimilis* en Fibra hueca (ECS).

Grafica 16

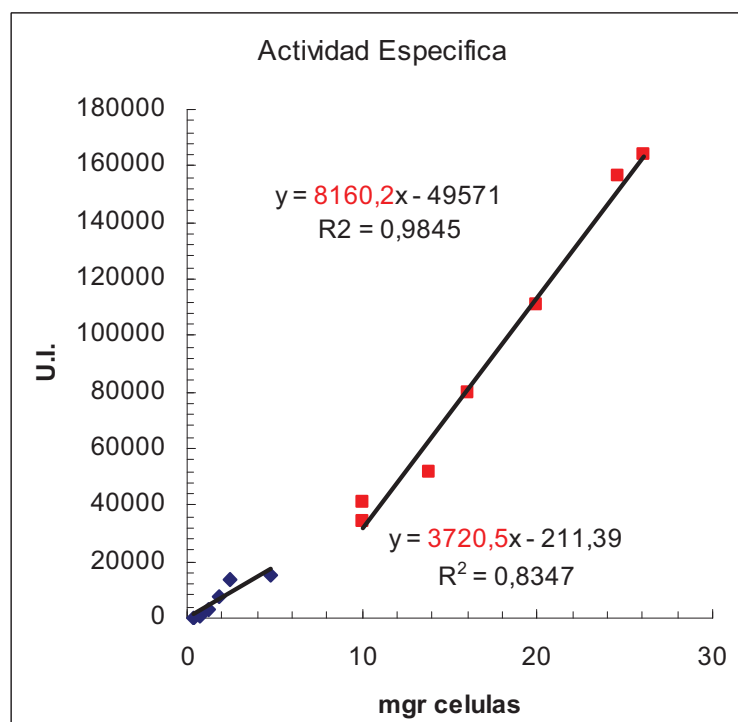
Grafica 16: en la grafica de actividad SKC versus peso seco, se obtienen dos pendientes, equivalentes a los consumos de glucosa y maltosa con los siguientes valores de Actividad especifica, 8.412 U.I./mg células y 11.879 U.I./mg células respectivamente.

Fermentación de 4 litros de *S. equisimilis* en Fibra Hueca (ICS).

Grafica 17

Grafica 17: al realizar la grafica de la actividad SKC versus el peso seco de la fermentación se obtiene una curva, la cual presenta dos pendientes, los valores para cada una de las pendientes obtenidas son: 2.558 U.I./mg células y 12.112 U.I./mg células, una actividad especifica pertenece a la fase de consumo de glucosa y la otra a la fase de consumo de maltosa.

Fermentación de 3 litros de *S. equisimilis* con dos cartuchos de Fibra Hueca conectados en serie (ECS).

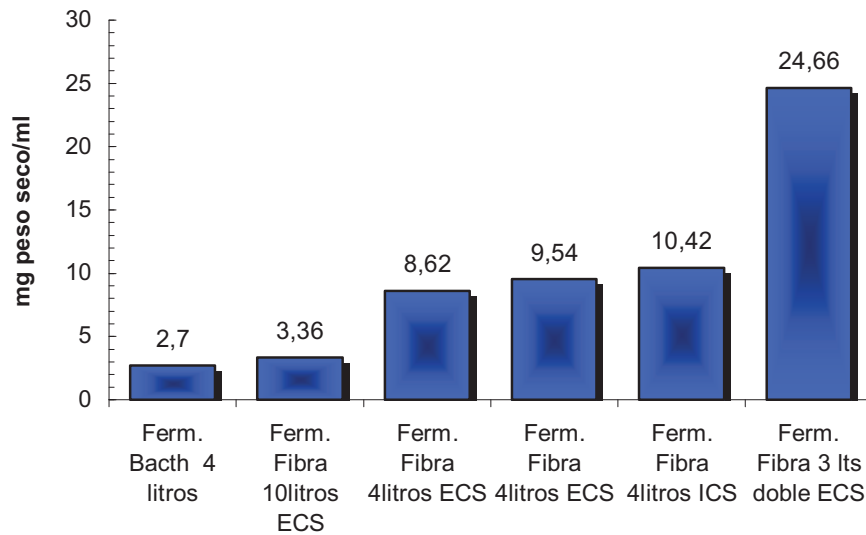


Grafica 18

Grafica 18, al realizar la representación grafica de la actividad SKC versus el peso seco obtenido en cada punto de la fermentación se pueden observar dos pendientes, equivalentes a las pendientes de consumo de glucosa y maltosa respectivamente, los valores para cada una de las pendientes obtenidas son: 3.720 U.I./mg células para el consumo de glucosa y 8.160 U.I./mg células para el consumo de maltosa.

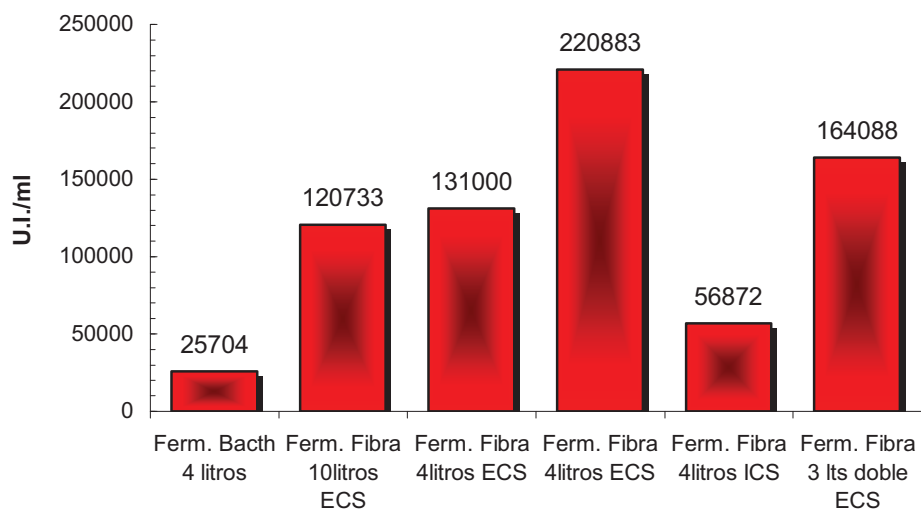
Grafico de barras comparativo

Crecimiento



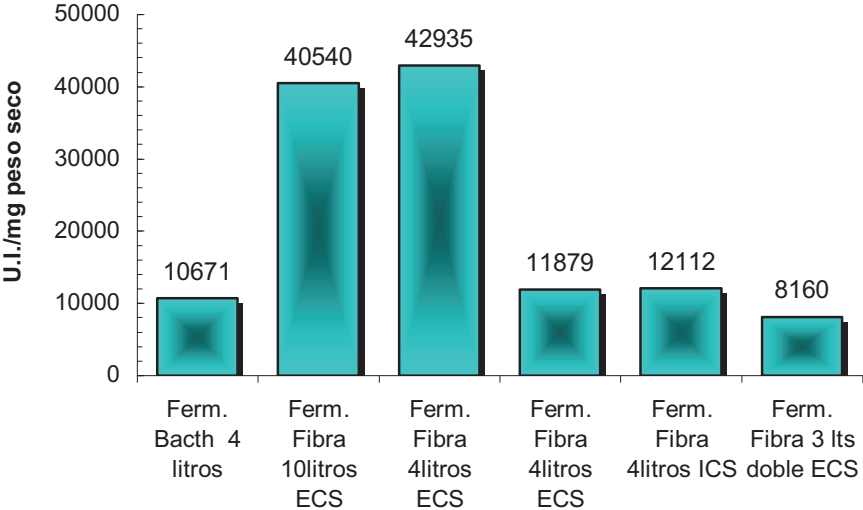
Grafica 19

Producción



Grafica 20

Actividad Específica



Grafica 21

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio de crecimiento y producción de estreptoquinasa por *S. equisimilis*, utilizando un sistema de fermentación en bioreactor de fibra hueca (HFBR). Inicialmente se realizaron pruebas de fermentación en batch, para tener una referencia del crecimiento y la producción, y así poder comparar con las experiencias realizadas por otros investigadores en el mismo sistema y con el sistema de producción en estudio, las pruebas fueron realizadas con diferentes volúmenes de cultivo, diferentes volúmenes de intercambio (reservorios) y dos formas de crecimiento (extra o intra capilar). Los resultados obtenidos nos indican que el sistema de fermentación de fibra hueca es altamente eficiente, esto permite obtener altas concentraciones de la estreptoquinasa en volúmenes relativamente pequeños. A su vez, indican la importancia de este sistema, que puede ser utilizado en la producción de otras proteínas, con otros microorganismos.

Los resultados de las fermentaciones (ver graficas 1, 3, 7, 9 y 11) muestran que la maltosa no se comienza a consumir hasta que no se ha agotado la glucosa del medio, la curva de crecimiento en estas condiciones presenta un plato en la fase exponencial que coincide con el cambio en el carbohidrato que se consume. Esto es característico del crecimiento diauxico, previamente reportado en *S. equisimilis* por Cruz (1.997). En la grafica 5, la curva de crecimiento presenta una curva característica con dos puntos de inflexión que corresponden al consumo de los carbohidratos en uno de los reservorios que fueron conectados consecutivamente, observándose dos curvas de desaparición de glucosa y de maltosa, en esta ultima como en las otras fermentaciones, la maltosa no comienza a consumirse hasta que no se ha agotado la glucosa.

El crecimiento diauxico, ha sido observado también en otros microorganismos, como por ejemplo: *S. bovis* primero se consume glucosa y luego lactosa (Kearns y Russell, 1.996), *Agrobacterium tumefaciens* 15955 se consume succinato inicialmente y manapino luego (Nautiyal *et al.* 1.992) y en *Azotobacter vinelandii* se consume antes acetato y posteriormente glucosa (Tauchert *et al.* 1.990) citado por (Torres, A. 2.000)

Como bien es sabido la glucosa es uno de los carbohidratos mas sencillos, siendo mas fácil de degradar, por lo que es entendible que sea el preferido por muchos microorganismos sobre otras fuentes de carbono mas complejas, es una ventaja evolutiva evidente que las rutas de consumo de otras fuentes de carbono se vean reguladas por la glucosa o la presencia de esta, lo cual permite a la célula ahorrar la energía que seria utilizada en la fabricación de enzimas involucradas en dichas rutas metabólicas.

Cruz, J. (1997), realiza una descripción detallada del crecimiento diauxico y la producción de estreptoquinasa por *S. equisimilis*, utilizando para el cultivo, medio suplementado con glucosa y maltosa. En estos experimentos se determinó que el crecimiento celular se ve favorecido en la fase de consumo de la glucosa y también se observó que la biosíntesis de SKC se desencadena al agotarse la glucosa, que la biosíntesis sobre maltosa es 5 veces mayor que sobre glucosa y que la adición de un pulso de glucosa sobre el cultivo en maltosa detiene la biosíntesis de SKC, concluyéndose que el crecimiento esta siendo sometida a represión catabólica.

En *S. equisimilis* en cultivos realizados bajo condiciones semejantes a las utilizadas en batch para el presente trabajo, Torres en 2.000 determinó que: las mejores condiciones para producir estreptoquinasa están dadas cuando en el medio se encuentran los dos carbohidratos, ya que al consumirse la glucosa habrá un considerable aumento en la masa celular y al consumir la maltosa todas estas células estarán produciendo estreptoquinasa.

Ambos investigadores (Cruz, 1.997 y Torres, 2.000) encuentran que: la actividad estreptoquinasa en el cultivo se mantiene constante o disminuye, al cesar el crecimiento, lo que puede ser resultado de las proteasas producidas por el estreptococo.

Fermentaciones

En Batch

La fermentación realizada nos corrobora los resultados obtenidos por Cruz, 1.997 y Torres, 2.000, en la que se evidencia el crecimiento diauxico, debido al *plateau* que se presenta en la fase exponencial de la curva, los valores obtenidos de masa celular, actividad estreptoquinasa (producción) y actividad especifica (ver Tabla 4) para esta experiencia están por encima de los valores reportados por otros investigadores en otros medios de producción en los cuales es utilizando el sistema tradicional de fermentación en batch.

En Fibra Hueca

En las fermentaciones en fibra hueca, se mantienen las mismas características de crecimiento que en la fermentación en batch, es decir una curva exponencial con un plateau que indica un crecimiento diauxico, además podemos observar un crecimiento superior, que va desde 1,24 hasta 9,13 veces mas masa celular, esto nos permite afirmar que el crecimiento en este sistema es mucho mayor debido al total aprovechamiento del medio por parte del microorganismo, ya que hay una absorción mas efectiva de los nutrientes y metabolitos que se encuentran en el medio a nivel de la fibra.

Por otra parte, a pesar de que los valores medidos son superiores a los obtenidos de la fermentación tradicional en batch, es probable que estos valores puedan estar subestimados, ya que no es posible medir dentro del cartucho o fibra la masa celular que se encuentra (adosada, pegada, unida) en el espacio extra capilar por lo que se estarían subestimando estos valores, el calculo de la actividad especifica también se subestima al utilizar los valores de masa celular obtenidos.

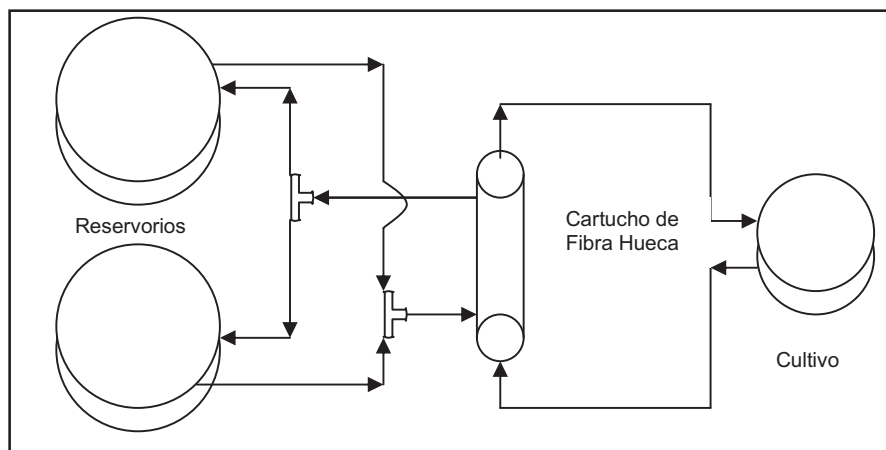
En el único caso donde es posible que no se presente este error es cuando se realiza el crecimiento en el espacio intracapilar, ya que por las características del cartucho y debido al diámetro interno del mismo no se permite que gran cantidad de células se peguen en las paredes internas de la fibra, por lo que los valores obtenidos para masa celular, actividad estreptoquinasa (producción) y actividad específica (ver tabla 4) podrían tomarse como valores más reales o exactos, siendo también superiores a los obtenidos en la experiencia en batch, esto se ve reflejado en un valor de masa celular mayor que las experiencias de fibra realizadas en el espacio extracelular para el mismo volumen de cultivo de 4 litros.

Tipo de Fermentación	Crecimiento (mg peso seco/ml)	Producción (U.I./ml)	Actividad Específica (U.I./mg peso seco)
Batch 4 litros	2,7	25.704	10.671
Fibra ECS 10 lts.	3,36	120.733	40.540
Fibra ECS 4 lts.	8,62	131.000	42.935
Fibra ECS 4 lts.	9,64	220.883	11.879
Fibra ICS 4 lts.	10,42	56.872	12.112
Fibra ECS doble cartucho 3 lts.	24,66	164.088	8.160

Tabla 4.- Resultados

En la fermentación de 10 litros de cultivo con un reactor de fibra hueca, conectado a un contenedor con 10 litros de medio como reservorio, se puede apreciar el efecto que genera el bioreactor al obtener valores de masa celular, actividad estreptoquinasa y actividad específica (ver tabla 4) mayores que los obtenidos para la fermentación en batch. Tomando en cuenta los volúmenes utilizados, no se puede obtener un mayor crecimiento ya que el medio se agota rápidamente debido a que la relación existente entre el cultivo y el reservorio es de 1:1.

Para las fermentaciones de 4 litros se realizaron dos experiencias diferentes, el primero utilizando dos reservorios conteniendo cada uno 10 litros de medio con la mezcla de los dos carbohidratos (glucosa y maltosa), conectándose un reservorio primero y luego el segundo, la grafica de consumo de carbohidratos para esta fermentación presenta curvas muy particulares, pero mantiene los valores por encima de los obtenidos para la fermentación en batch (ver tabla 4). En la segunda experiencia, se conectaron los reservorios en paralelo lo que equivalía a 20 litros y 4 litros de medio de cultivo, los valores obtenidos de masa celular, actividad estreptoquinasa y actividad específica (ver tabla 4) también superaron a los de la fermentación en batch, la relación entre el medio de cultivo y el reservorio es de 1:5, esta relación aumenta entre 3,19 y 3,85 veces el crecimiento y entre 2,21 y 8,59 veces la actividad estreptoquinasa (producción), por lo que es mas evidente el beneficio de utilizar este sistema para la producción.



En la última experiencia que se realizó, se utilizaron dos cartuchos de fibra hueca conectados en serie, los cuales fueron alimentados con dos reservorios que contenían 20 litros de medio (10 litros c/u) conectados en paralelo a la fibra, para suministrar a los dos cartuchos el medio de forma equitativa y evitar el posible agotamiento del medio en uno de ellos, los resultados obtenidos para esta experiencia en cuanto a masa celular fue de 9,13 veces mayor (ver tabla 4) que lo obtenido para la fermentación en batch, en cuanto a actividad estreptoquinasa (producción), el valor obtenido es similar a los obtenidos para la fermentación de 4 litros (ver tabla 4).

Como se observa en la gráfica de crecimiento comparativo (ver grafica 19), se puede afirmar que las fermentaciones con el sistema de fibra, producen una masa mayor de célula incluso si la fermentación se realiza en el espacio intra capilar de la fibra. Esto es debido a que el sistema de fibra se comporta semejando un sistema vivo, el estreptococo ancla en la superficie de la fibra igual a como lo haría sobre la mucosa de un organismo al cual esta invadiendo. En la fibra se le suministran los nutrientes y metabolitos necesarios para su crecimiento y desplegar así toda la maquinaria metabólica para la producción de las proteínas, en especial la de nuestro interés, como lo es la estreptoquinasa.

Con respecto a la producción de estreptoquinasa (ver grafica 20), podemos afirmar que el sistema de fibra es altamente productivo, siendo menor cuando el crecimiento se realiza en el espacio intra capilar, esto es debido a que las células que se anclan en la fibra son muy pocas y el sistema se comportaría como un batch mejorado, a pesar de esto se obtiene el doble de lo que se produce en la fermentación en batch.

Cuando se realiza la fermentación en el espacio extra capilar de la fibra, se obtiene una producción hasta de 8,59 veces mayor que cualquier tipo de fermentación. Cuando se realizó la experiencia con doble cartucho se esperaba que se aumentara aun mas la producción, lo que no sucedió, aunque la producción fue 6,38 veces mayor que la fermentación en batch, no supero lo obtenido cuando se realizó la experiencia con un cartucho. Esto es posible que sea causado por estrés celular, ya que la cantidad de células puede ser muy grande en cada uno de los cartuchos y la alimentación no es efectivamente homogénea lo que afectaría la producción de la proteína.

Finalmente realizando la observación de las graficas comparativas de la actividad especifica (ver grafica 21), se puede apreciar que las fermentaciones en fibra presentan valores superiores a la fermentación en batch, los valores obtenidos de la segunda fermentación en fibra de 4 litros ECS y la de doble cartucho ECS, nos crean dudas debido a que los valores de peso seco obtenidos no son confiables, ya que no se puede

medir exactamente la cantidad de células que se encuentran ancladas dentro del cartucho de fibra hueca.

El valor de actividad específica de la fermentación en fibra de 4 litros (ver grafica 21) deberían estar entre 40.000 y 50.000 U.I./mg de células, lo que equivaldría a lo que produciría la cantidad de células para esta fermentación (ver grafica 19), para la fermentación de doble cartucho el valor de actividad específica presenta un valor inferior a la fermentación en batch (ver grafica 21), este resultado debería estar en 110.000 U.I./mg de células, equivalente a lo que produciría la cantidad de células para esta fermentación, indudablemente que los valores de actividad específica para estas dos fermentaciones podrían estar subestimados y no son confiables ya que no hay una forma alternativa de medir la actividad, ya que el medio de cultivo presenta una cantidad muy alta de proteínas suspendidas, lo que impide utilizar métodos alternativos.

CONCLUSIONES

1. Se verifica un aumento en la producción de estreptoquinasa utilizando el sistema de fermentación en fibra hueca lo cual cumple con la hipótesis planteada en este trabajo.
2. Se obtuvo un aumento en el rendimiento en cuanto a la producción de estreptoquinasa en el sistema de fermentación en fibra hueca en condiciones de diauxia glucosa/maltosa, equivalente a un 88%, en comparación con el rendimiento alcanzado con los sistemas de fermentación en batch.
3. Se han mejorado los parámetros de fermentación en fibra hueca. Esto nos plantea nuevas estrategias de producción que permitirán multiplicar el rendimiento de la producción de SKC.
4. Los altos rendimientos obtenidos con estos resultados nos permitirán a futuro tener costos de producción de la SKC más bajos, lo que redundara en un precio mas accesible a nivel de consumidor, esta es una de las metas que se persiguen desde los inicios de esta línea de investigación en nuestro laboratorio.

ESPECTATIVAS

Realizar pruebas en las cuales se disminuya el volumen de cultivo y se incremente el volumen de intercambio para compararlo con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Aumentar la relación existente entre cultivo y medio de intercambio para determinar cual es la mas adecuada para obtener un óptimo de producción de estreptoquinasa.

Realizar pruebas de producción con este sistema para otros microorganismos y para la producción de otras proteínas.

Bibliografía citada:

- 1 Adema, E. and Sinkey, A. J. 1987. An analysis of intra-versus extracapillary growth in a hollow fiber reactor. *Biotechnol. Prog.* 3(2): 74-79.
- 2 Alberts, B. Bray, D. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. and Watson, J. D. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing.
- 3 Aloff, J.F. 1980. Streptococcal toxins. *Pharmacol. Ther.* 11:661-717.
- 4 Altshuler, G. L., Dziewulski, D. M., Soweck, J. A., and Belfort, G. 1986. Continuous hybridoma growth and monoclonal antibody production in hollow fiber reactors-separators. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 646-658.
- 5 Ansto (2004). Membranes of filtration. (On line). Disponible en : <http://www.ansto.gov.au/...../project/membranes.jpg> (15/11/03).
- 6 Bachman, F. 1995. Fibrinolytic agents. *Fibrinolysis.* 9(1)9-15.
- 7 Baxter (1989). Familia de Dializadores CA. (On line). Disponible en: <http://www.baxter.com.mx/dialca.htm> (12/12/03)
- 8 Belfort, G. 1989. Membranes and bioreactors: A technical challenge in biotechnology. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 1047-1066.
- 9 Bhakdi, M., Trantum, J. and Sziegoleit, A. 1985. Mechanism of membrane damage by Streptolysin O. *Infect. Immun.* 47:52-60.
- 10 Brock, T. 1976. *Biología de los microorganismos*. Ediciones Omega (Segunda edición). Barcelona.
- 11 Brotherton, J. D. and Chau, P. C. 1996. Modeling of axial-flow hollow fiber cell culture bioreactors. *Biotechnol. Prog.* 12: 575-590.
- 12 Casciari, J. J., Hollingshead, M. G., Alley M. C., Mayo, J. G., Malspeis, L., Miyauchi, S., Grever, M. R. and Weinstein J. N. 1994. Growth and chemotherapeutic response of cell in a hollow-fiber in vitro solid tumor model. *Journal of the National Cancer Institute.* 86(24):1846-1852.
- 13 Castellino, F. Sodetz, J., Brockway, W. and Siefring, G. Jr. 1976. Streptokinase. *Methods in Enzymology.* 45:244-257.

- 14 Chresand, T. J., Gillies, R. J., and Dale, B. E. 1988. Optimum fibre spacing in a hollow fiber bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 32: 983-992.
- 15 Christensen, L. 1945. Streptococcal fibrinolysis: a proteolytic reaction due a serum enzyme activated by streptococcal fibrinolysis. *J. Gen. Physiol.* 28:363-383.
- 16 Christensen, L. 1949. Methods for measuring the activity of components of the streptococcal fibrinolytic system and streptococcal desoxyribonuclease. *J. Clinic. Invest.* 28:163-172.
- 17 Chwan Yee, F. (1.998). Hollow Fiber Membranes. (On line). Disponible en: <http://www.cheresources.com/hmembranes.shtml> (20/01/04).
- 18 Cowan, S. and Seel, K. 1965. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge at University press.
- 19 Cruz, J. F. 1991. Producción de Streptokinasa por *Streptococcus pyogenes*. Tesis de Grado, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- 20 Cruz, J. F. 1997. Estudio de la represión catabólica sobre la biosíntesis de estreptokinasa por *Streptococcus equisimilis*. Tesis de Post-grado, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- 21 Dick, G.F. and Dick G.H. 1924. A skin test of susceptibility to scarlet fever. *J. Am. Med. Assoc.* 82: 265-266.
- 22 Difco, 1.978. Manual de microbiología. Novena Edición Edt. Miras, Madrid.
- 23 Estrada, M.P. and Hernandez, L. 1992. High level expression of Streptokinase in *Escherichia coli*. *Biotechnology.* 10:1138-1142.
- 24 Evans, T. L. and Miller, R. A. 1988. Large-scale production of murine monoclonal antibodies using hollow fiber bioreactors. *BioTechniques.* 6:762-767.
- 25 Frank, C. Seiner, K. and Malke, H. 1995. Conservation of the organization of the streptokinase gene region among pathogenic streptococci. *Med. Microbiol. Immunol.* 184(3):139-146.

- 26 General Electric Company (1.997-2.003). Basic Principles of Microfiltration. (On line). Disponible en: http://www.gewater.com/library/tp/basic_principles.jsp (15/02/04).
- 27 Ginsburg, I. 1972. Mechanism of cell and tissue injury induced by group A streptococci: relation poststreptococcal sequelae. *J. Infect. Dis.* 126: 294-340.
- 28 Gramer, M. J. and Poeschl, D. M. 1998. Screening tool for hollow-fiber bioreactor process development. *Biotechnol. Prog.* 14: 203-209.
- 29 Gramer, M. J., Poeschl, D. M., Conroy, M. J., and Hammer, B. E. 1999. Effect of harvesting protocol on performance of a hollow fiber bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 65: 334-340.
- 30 Gross, S., Gase, K. and Malke, H. 1996. Localization of the sequence determined DNA bending center upstream of the streptokinase gene *skc*. *Arch. Microbiol.* 166(2):116-121.
- 31 Heifetz, A. H. Braatz, J. A. Wolfe, R. A., Barry, R. M., Miller, D. A. and Solomon B. A. 1989. Monoclonal antibody production in hollow fiber bioreactors using serum-free medium. *BioTechniques.* 7(2):192-199.
- 32 Hynes, W. and Ferretti, J. 1989. Sequence analysis and expression in *E. coli* of the hyaluronidase gene of *Streptococcus pyogenes* bacteriophage H4489A. *Infect. Immun.* 57:533-539.
- 33 In Vitro System and Service (1.998). Basic Principles of Hollow Fiber (On line). Disponible en: http://www.ivss.de/en/product/Hollow_Fiber/hollow_fiber/prinzip_e1.gif (6/11/03).
- 34 Inloes, D. S., Smith, W. J., Taylor, D. P., Cohen, S. N., Michaels, A. S., and Robertson, C. R. 1983. Hollow-fiber membrane bioreactors using immobilized *E. coli* for protein synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 2653-2681.
- 35 Jackson, K. W., and Tang, J. 1982. Complete amino acid sequence of Streptokinase and its homology with serin proteases. *Biochem.* 21(26):6620-6625.

- 36 Jackson, K. W., Esmon, N. and Tang, J. 1981. Streptokinase and Staphilokinase. *Methods in Enzimology*. Academic Press Inc. 80:387-394.
- 37 Jauregui, H. O., Naik, S., Santangini, H., Pan, J., Trenkler, D. and Mullon, C. 1994. Primary cultures of rat hepatocytes in hollow-fiber chambers. *In vitro Cell. Dev. Biol.* Jan; 30A:23-29.
- 38 Johnson, A. and McCarty, W. 1959. The lysis of artificially induced intravascular clots in man by intravenous infusions of Streptokinase. *J. Clinic. Invest.* 38:1627-1643.
- 39 Keith, Scott. 1998. Handbook of Industrial Membranes. Elsevier Advanced Technology, Second Edition.
- 40 Kleinstreuer, C., and Agarwal, S. S. 1986. Analysis and simulation of hollow-fiber bioreactor dynamics. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 1233-1240.
- 41 Knazek, R. A., Gullino, P. M., Kohler, P. O., and Dedrick, R. L. 1972. Cell culture on Artificial capillaries: An approach to tissue growth in vitro. *Science.* 178:65-67
- 42 Koska, J., Bowen, B. D. and Piret, J. M. 1997. Protein transport in packed-bed ultrafiltration hollow-fibre bioreactors. *Chem. Eng. Sci.* 52(14): 2251-2263.
- 43 Kotecki, S and Flynn, B. (1.998). Reverse Osmosis (On line). Disponible en: <http://www.cee.vt.edu/environmental/teach/wtprimer/revosmo/osmosis.jpg> (2/07/04).
- 44 Ku, K., Kuo, M. J., Delente, J., Wildi, B. S. and Feder J. 1981. Development of a hollow fiber system for large-scale culture of mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* 23:79-95.
- 45 Kurkela, R., Fraune, E. and Vihko, P. 1993. Pilot-scale production of murine monoclonal antibodies in agitated, ceramic matrix or hollow-fiber cell culture systems. *BioTechniques.* 15(4):674-683.
- 46 Labecki, M. Bowen, B. D. and Piret, J. M. 1996. Two-dimensional analysis of protein transport in the extracapillary space of hollow-fibre bioreactors. *Chem. Eng. Sci.* 51(17): 4197-4213.

- 47 Labecki, M., Piret, J. M. and Bowen, B. D. 1995. Two-dimensional analysis of fluid in hollow-fibre modules. *Chem. Eng. Sci.* 50(21): 3369-3384.
- 48 Leigh, J.A. Hodgkinson, S.M. and Lincoln, R.A. 1998. The interaction of *Streptococcus dysgalactidae* with plasmin and plasminogen. *Vet. Microbiol.* 61:121-135.
- 49 Liu, T. and Elliot, S. 1971. Streptococcal proteinase. In P.D. Boyer (Ed) *The Enzymes* Vol. 3 Academic Press Inc. N.Y.
- 50 Lottenberg, R., DesJardin, L., Wang, H. and Boyle, M. 1992. Streptokinase-producing streptococci grow in human plasma acquire unregulated cell-associated plasmin activity. *J. Infect. Dis.* 166(2):436-440.
- 51 Lovesio, C. and Miroli, A. 1987 *Hemorragias y Trombosis en clínica y cirugía.* Edit. El Ateneo. 414.
- 52 Lowrey, D. Murphy, S. and Goffe, R. A. 1994. A comparison of monoclonal antibody productivity in different hollow fiber bioreactors. *J. Biotechnol.* 36:35-38.
- 53 Luque, S., Mallubhatta, H., Gehlert, G., Kuriyel, R., Dzengeleski, S., Pearl, S. and Belfort, G. 1999. A new coiled hollow-fiber module design for enhanced microfiltration performance in biotechnology. *Biotechnol. Bioeng.* 65(3): 247-257.
- 54 Malke, H., and Ferretti, J. 1984. Streptokinase: cloning, expression and excretion by *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:3557-3561.
- 55 Malke, H., Roe, B., and Ferretti, J. 1985. Nucleotide sequence of the streptokinase gene from *Streptococcus equisimilis* H46A. *Gene.* 34(2-3):357-362.
- 56 Malke, H., Steiner K., Gase, K., Mechold, U., and Ellinger, T. 1995. The streptokinase gene: Variation allelic, genomic environment and expression control. In Ferretti, J; Gilmore, M; Klaenhammer, T. and Brow, F. (Eds) *Genetics of Streptococci, Enterococci, and Lactococci.* *Dev. Biol. Stand. Karger, Basel* 85: 183-193.
- 57 Mayer, M. 1990. Biochemical and biological aspects of the plasminogen activation system. *Clin. Biochem.* 23(3):197-211.

- 58 Mechold, U. Steiner K., Vettermann, S., and Malke, H. 1993. Genetic organization of the streptokinase region of the *Streptococcus equisimilis* H46A chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 241(1-2):129-140.
- 59 Michaelis, S., and Beckwith, J. 1982. Mechanism of incorporation of cell envelope proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 36:6620-6625.
- 60 Michaels, A. 1979. Teen year of Ultrafiltration. Pages (). in Cooper R. Anthony, Ultrafiltration membranes and Applications. Polymer Science and Technology Vol. 13 Plenum press. New York; London. 1980.
- 61 Milstone, H. 1941. A factor in normal human blood which participates in streptococcal fibrinolysis. *J. Immunol.* 42:109-116.
- 62 Patkar, A. Y., Bowen B. D. and Piret, J. M. 1993. Protein absorption in polysulfone hollow-fiber bioreactors used for serum-free mammalian cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* 43(9): 1099-1106.
- 63 Patkar, A. Y., Koska, J., Taylor, D. G., Bowen, B. D. and Piret, J. M. 1995. Protein transport in ultrafiltration hollow-fiber bioreactors. *AIChE Journal.* 41(2): 415-425.
- 64 Perez-Casal, J., Caparon, M., and Scott, J. 1991. Mry, a trans-acting positive regulator of the M protein gene of *Streptococcus pyogenes* with similarity to the receptor protein of two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* 173(8):2617-2624.
- 65 Piret, J. M., and Cooney, C. L. 1990. Mammalian cell and protein distributions in ultrafiltration hollow-fiber bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 902-910.
- 66 Piret, J. M., and Cooney, C. L. 1991. Model of oxygen transport limitations in hollow fiber bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 37: 80-92.
- 67 Piret, J. M., Devens, D. A. and Cooney, C. L. 1991. Nutrient and metabolite gradients in mammalian cell hollow fiber bioreactors. *Can. J. Chem. Eng.* 69:421-428.
- 68 Rony, P. R. 1971. Multiphase catalysis. II Hollow fiber catalysts. *Biotechnol. Bioeng.* 13:431-447.

- 69 Sardonini, C. A. and DiBiasio, D. 1993. Growth of animal cells around hollow fibers: Multifiber Studies. *AIChE Journal*. 39(8): 1415-1419.
- 70 Taketo, A. and Taketo, Y. 1965. Biochemical studies of Streptolysin S formation. 3. Intracellular streptolysins. *J. Biochem.* 57(6):787-792.
- 71 Taketo, A., Taketo, Y., and Kuno, S. 1974. Properties of hemolytic streptococci growth in glucose-containing medium. *Jpn. J. Exp. Med.* 44(5):421-433.
- 72 Tharakan, J. P., and Chau, P. C. 1986. Operation and pressure distribution of immobilized cell hollow fiber bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 1064-1071.
- 73 Tillett, W. and Garner, R. 1933. The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. *J Exp. Med.* 58:485-502.
- 74 Todd, E. 1947. A study of the inhibition of Streptococcal proteinase by sera of normal and immune animals and of patients infected with group A hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 85:591-606.
- 75 Torres, A. L. 2000. Estudio del crecimiento y producción de estreptoquinasa en *Streptococcus equisimilis*. Tesis de grado. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- 76 Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase. *Ann. Clin. Biochem.* 6:24.
- 77 Van De Rijn, S., and Kessler, R. S., 1980. Growth characteristics of group A streptococci in a new chemically defined medium. *Infect. Immu.* 27:444-448.
- 78 Watson, D. and Kim, Y. 1970. Erythrotoxic toxin. Pages 173-187. in Motie, T. Kodes, S. and Anal, S. (Eds) *Microbial. Toxins*. Vol. 3 Academic Press. Inc. N.Y.
- 79 Werf, F. 1991. L'infartus du myocarde et la thrombolise. *La Recherche.* 231:424-428.

Anexo 1

Purificación de Plasminogeno (protocolo resumido)

- Se equilibra una columna de L-Lisina Sepharosa 4B con 1 Litro de buffer de equilibracion.
- El plasma es protegido del efecto de proteasas agregándole inhibidores, (EDTA, Benzamidina, Aprotinina, STI, NPGB, PMSF)
- El plasma se hace pasar por la columna preparada, previamente equilibrada con buffer fosfato 20 mM con NaCl 500 mM, EDTA 2 mM, 0,01% NaN_3 y Benzamidina 5 mM, pH 7.4 a 4 °C, con un flujo de 0,6 ml/min.
- La columna se lava con 5 volúmenes del mismo buffer, se realiza luego un lavado con buffer fosfato 50 mM con NaCl 80 mM con NaN_3 y Benzamidina pH 7.4
- El plasminogeno que esta fijado en la columna es eluido con buffer fosfato 50 mM con NaCl 80 mM y ϵ -ACA 50 mM pH 7.4 (500 ml).
- Se recogen las fracciones con un colector de fracciones aproximadamente 80 gotas (4 ml) por tubo, con un flujo de 0,266 ml/min (60 gotas/min) aproximadamente 1 gota cada 4 segundos.
- Se lee la D.O. a 280 nm, las lecturas altas son reunidas en una sola fracción.
- Se precipita el plasminogeno con 55% de Sulfato de amonio por 15 hrs a 4 °C.
- El precipitado se recupera por centrifugación a 4500 rpm por 15 minutos a 4 °C.
- Se resuspende en un volumen mínimo de buffer fosfato 150 mM con NaN_3 y Benzamidina pH 8.0 y se dializa con una membrana contra el mismo buffer por 15 horas a 4 °C, cambiando la solución hasta que la solución en la membrana este libre de precipitados.
- Fraccionar la solución de la membrana en tubos eppendorf estériles, alicuotadas y marcadas, almacenando a -20 °C para su uso.

Determinar la concentración de proteína de la preparación.

Se mide la D.O. a 280 nm a la solución dializada, se calcula la concentración del plasminogeno utilizando su coeficiente de extinción molar a 280 nm, que equivale a 1,7 mg/ml.

Buffer de equilibración. (pH 7.4)

Fosfato	0.02 M
NaCl	0.5 M
EDTA	2 mM
NaN ₃	0.01 %
Aprotinina	1 ug/ml
STI	1 ug/ml

Buffer A. (pH 7.4)

Fosfato	0.05 M
NaCl	80 mM
Aprotinina	1 ug/ml
STI	1 ug/ml

Buffer de elución. (pH 7.4)

Buffer A con ϵ -ACA	50 mM
------------------------------	-------

Anexo 2

- **Material de vidrio:**

- Cápsulas de petri.
- Viales.
- Fiolas de 250 ml, 500 ml, 1000 ml y 2000 ml.
- Fiolas de 250 ml con tapa de rosca.
- Vasos de precipitado de 250 ml, 500 ml, 1000 ml y 2000 ml.
- Envases de vidrio de 5 litros y 10 litros.
- Cubetas para espectrofotómetro LKB y Agilent de cuarzo.
- Tubos de ensayo.
- Cilindros graduados de 100 ml, 250 ml y 1000 ml.
- Electrodo de pH Cole-Parmer.

- **Equipos:**

- Estufa PANEM modelo 002 CB a 37 °C.
- Fermentadores de 0,5 litros, 2 litros, 5 litros y 15 litros.
- Bombas peristálticas Masterflex.
- Cabezales para bombas peristálticas Masterflex # 13, 15, 16 y 17.
- Cajas de control de bombas peristálticas.
- Mantas térmicas.
- Caja de control de interfase para fermentación.
- Computador.
- Electrodo de temperatura (termocuplas).
- Espectrofotómetro Spectronic 20.
- Espectrofotómetro Agilent 8453.
- Espectrofotómetro LKB Biochrom Ultrospec II.
- Ultra Microplate Reader (ELx808) Biotek.

- Neveras a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Balanza analítica Mettler BB1300.
- Balanza Analítica Mettler AJ180.
- Vortex Maxi Mix II Thermolyne Type 37600 Mixer.
- Agitador magnético Thermolyne modelo S18525.
- Baño a temperatura regulada.
- pHmetro PHB-47 Microprocessor Omega.
- Horno microondas Goldstar.
- Autoclave All American modelo N° 25X.
- Autoclave Precision Scientific.
- Micro-centrífuga Eppendorf modelo 5413.
- Ultra-Centrífuga International Equipment Company IEC PR-7000.

- **Materiales varios y fungibles:**

- Mecheros.
- Asas de platino.
- Magnetos.
- Espátulas.
- Papel para pesar.
- Algodón.
- Gasa.
- Papel aluminio.
- Mangueras Masterflex # 13, 15, 16 y 17.
- Conectores para mangueras.
- Inyectadoras 2 ml, 5 ml y 10 ml.
- Filtros de papel Waltman # 1, 40 y 42.
- Filtros Millipore de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ y $0,45\text{ }\mu\text{m}$.
- Microplacas de Elisa de 96 pozos.

- **Reactivos:**

- Glicerol.
- Peptona de Caseína.
- Sulfato ferroso.
- Nitrato ferroso.
- Fosfato de potasio monobásico.
- Fosfato de potasio dibásico.
- Sulfato de magnesio.
- Sulfato de manganeso.
- Ácido p-aminobenzoico.
- Biotina.
- Ácido fólico.
- Niacinamida.
- NADPH (Nicotinamin Adenin Di-nucleótido Fosfato).
- Pantotenato de Calcio.
- Piridoxal fosfato.
- Piridoxamina di-hidrocloruro.
- Vitamina B-12.
- Riboflavina.
- Tiamina.
- Cianocobalamina.
- Hidróxido de sodio.
- Ácido Clorhídrico.
- Glucosa.
- Maltosa.
- Adenina.
- Guanina.
- Uracilo.
- Cloruro de calcio.

- Acetato de sodio.
- Bicarbonato de sodio.
- Fosfato de sodio monobásico.
- Fosfato de sodio dibásico.
- L-Cisteína.
- Aminoácidos.
- Tris.
- Plasminogeno.
- Sustrato cromogenico (D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilide).
- Reactivo para determinación de glucosa (Método Enzimático).
- Agarosa.
- Leche descremada.
- Twin 80.
- Cloruro de Sodio.
- Azocaseína.
- Ácido Tricloroacético.
- Maltasa.

Anexo 3

Preparación del medio MSP.-

Se pesan por grupos todos los componentes para el volumen de medio a utilizar, los componentes se disuelven en un pequeño volumen de agua desmineralizada de manera que el volumen final no exceda la cuarta parte del volumen total del medio a preparar.

El grupo I se disuelve en una solución muy ácida (pH 3 o 4) de HCl.

El grupo V se disuelve en una solución muy ácida, pero calentando ligeramente hasta disolver.

El grupo III se disuelve en una solución básica de KOH o NaOH (pH 8 o 9).

El grupo VI se disuelve en suficiente agua ligeramente caliente, el pH de esta solución es cercano a 7.2, a esta solución una vez disuelta, se le añaden con agitación las soluciones preparadas anteriormente tratando de mantener el pH cercano al neutro, para evitar precipitación de alguno de sus componentes.

El medio preparado es muy turbio, este debe someterse a filtración para clarificarlo, se filtra secuencialmente con papel de filtro nº 1,40 y 42. Luego se filtra con membrana de 0,45µm de poro.

Las vitaminas NADPH, pantotenato de calcio y vitamina B-12 se encuentran a 4 °C y se añaden luego de este proceso de filtración.

El medio está listo para ser esterilizado por filtración utilizando un sistema millipore con presión positiva suministrada con bomba peristáltica en ambiente estéril, con cartuchos recargables con membranas de 0,22 µm previamente esterilizadas por calor.

Almacenar a 4 °C en fioles selladas previamente esterilizadas (20 min a 121 °C) hasta su uso.

Los carbohidratos a utilizar se disuelven en el mínimo volumen posible en agua destilada, estos se esterilizan por filtración y se añaden al medio al momento de iniciar el cultivo o fermentación.

En fioles de 250 ml, se preparan 200 ml de medio MSP, con un asa estéril, se toma una asada del medio de cultivo de un vial con medio caldo tioglicolato, de una colonia de una caja de medio agar sangre o de un eppendorf guardado a 4 °C, agitando el asa en el liquido de la fiola, la cual se lleva a una estufa o baño maria a 37 °C por 12 hrs.

Preparación del medio Sólido Agar Sangre.-

Se disuelven 40,0 gr. de agar base en 1 litro de agua destilada o desmineralizada, calentar hasta disolver completamente y esterilizar por 15 minutos en autoclave a 121°C.

Calentar entre 45 y 50 °C para disolver y homogeneizar, mezclar con 5 a 8% de sangre fresca desfibrinizada agitar ligeramente para homogeneizar y servir en las cajas de petri.

En cajas de medio agar sangre, se toma con un asa estéril, una asada del medio de un tubo eppendorf guardado a 4 °C, rayando en la caja de medio, la cual se lleva a una estufa a 37 °C por 12 hrs. Este medio funciona como un medio diferencial ya que las células que crecen y forman halos de hemólisis, serán de nuestras células.

Preparación del medio Caldo Tioglicolato.-

Resuspender 30 grs. en 1 litro de agua desmineralizada y calentar en un baño maria hasta disolver completamente. Separar en porciones de 10 a 15 ml en tubos, (20 a 30 ml en viales) y esterilizar en autoclave a 120 °C por 15 min. (Gel preparado en liquido para cultivos con fase semi-sólida sumergida, el pH para uso del medio es 37 °C: 7.1 +- 0.2).

Para sembrar, se toma con un asa estéril, una asada del medio de un tubo eppendorf guardado a 4 °C o de una caja de medio agar sangre y se inocula el medio agitando el asa, se lleva a una estufa a 37 °C por 12 horas.

Nota: En el medio caldo tioglicolato, la rezasurina de sodio es un indicador de cambio en el pH del medio, a pH 7.2 el medio es rojizo, a pH ácido el medio es de color amarillo.

Anexo 4

Sistema Computarizado

Para entrar al sistema se siguen los siguientes pasos:

- 1 Una vez encendido el computador, en el escritorio o pantalla, buscar el icono **Fermentador**, doble-clic sobre el mismo.
- 2 Aceptar el reinicio del sistema en el modo MS-DOS.
- 3 Se cargara el software del fermentador.
- 4 Abrir **General**, seleccionar en la siguiente ventana el tipo de fermentación (**Batch** o **Doble Circuito**) y el tipo de control de pH (**Ácido** o **Básico**).

Para calibrar los parámetros de fermentación:

- A. Escoja la opción **Setup**
- B. Seleccionar en la siguiente ventana **Setup Parámetros**
- C. Seleccione **Temperatura del Fermentador** ahora puede calibrar la sonda de temperatura siguiendo las instrucciones. Importante: escoger el rango de temperatura en el cual se mantendrá toda la fermentación.
- D. Salir al calibrar la sonda de temperatura.
- E. Ahora seleccione **pH Fermentador** calibrar conectando el electrodo y siguiendo las instrucciones que le indique el sistema.
- F. Escoja el rango de pH al cual debe mantenerse el cultivo, salir al calibrar el electrodo de pH.
- G. Volver al menú principal, seleccionar **Fermentación** encender en la caja de control (Medición y Control).
- H. Conecte la manta de calentamiento al sensor respectivo y la bomba peristáltica para el control del pH del cultivo al sensor correspondiente.

En la pantalla deben comenzar a cambiar las lecturas de pH y Temperatura, una vez se encuentren en los valores establecidos, pasar el switch de control en la pantalla de **Off** a **On** para iniciar el control de la fermentación.

Anexo 5

Método de Trinder

La glucosa es oxidada enzimáticamente por la glucosa oxidasa produciendo ácido gluconico y agua oxigenada H_2O_2 . Esta última oxida al cromógeno en presencia de peroxidasa produciendo un compuesto de color rosado cuya intensidad es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra analizada (Trinder, P. 1.969)

Mezclar 10 μ l de muestra con 1 ml de reactivo reconstituido, incubar por 10 min a 35-37 °C por 30 minutos a temperatura ambiente. Leer la absorbancia a 510 nm (el color es estable por 1 hora)

Calculo de los resultados:

$$\frac{\text{Abs. Muestra}}{\text{Abs. Patrón}} \times \text{Conc. de patrón (1 mg/ml)} = \text{Glucosa mg / ml}$$

Los resultados obtenidos son graficados junto con los datos de crecimiento y actividad SKC a medida que procede la fermentación o al final de la misma cuando se procesen todas las muestras.

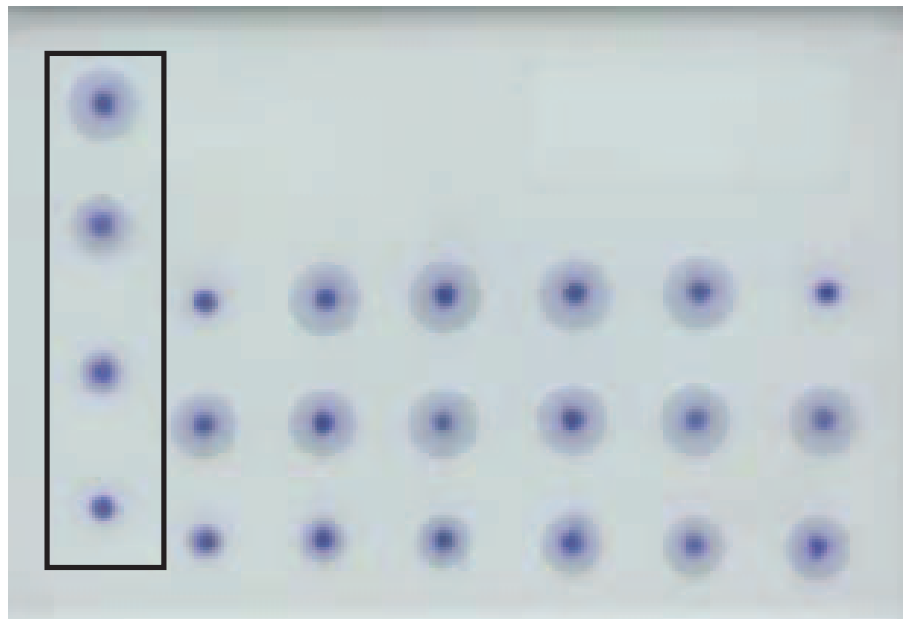


Anexo 6

Método para la determinación de la producción de estreptoquinasa por la actividad caseinolítica de la plasmina.

La siguiente imagen muestra una placa de agarosa de las utilizadas para determinar la concentración de estreptoquinasa en el cultivo a lo largo de la fermentación, los halos corresponden a la lisis de la caseína propiciada por la plasmina, la cual proviene de la activación del plasminogeno por parte de la estreptoquinasa.

Los halos encerrados en el rectángulo corresponden a la curva de calibración (U.I. de SKC/ml)



Anexo 7

ABREVIACIONES

MF	Microfiltración.
UF	Ultrafiltración.
PV	Pervaporación.
GP	Gas Permeación.
VP	Vapor Permeación.
ED	Electrodialisis.
NF	Nanofiltración
RO	Osmosis reversa o (inversa).
PVC	Poli vinil cloruro
PVDF	Poli vinil
PTFE	Poli tetra fluoroetileno
SEM	Microscopia Electrónica de Superficie
TEM	Microscopia Electrónica de
PAN	Poli acilo nitrilo
HFBR	Bioreactor de fibra hueca
ECS	Espacio extra capilar
ICS	Espacio intra capilar
t-PA	Activador Tisular de Plasminogeno
SKC	Estreptoquinasa
Plg	Plasminogeno
Plm	Plasmina
SLS	Estreptolisina S
SLO	Estreptolisina O
PS	Proteinasa estreptococal
MSP	Medio suplementado con peptonas
TCA	Ácido tricloro acético
PBS	Buffer fosfato salino

PVA	Poli Vinil Acrilonitrilo
NPGB	p-Nitrofenil p'-Guanodinobenzoato
ϵ -ACA	ϵ -Amino caproico

ANEXO 8

LISTA DE MATERIALES Y EQUIPOS DE FERMENTACION

Computador

Fermentadores

- 2 fermentadores de 15 L c/u
- 1 fermentador de 5 L

Bombas Peristálticas

- motor unidireccional de 600 rpm
- motores bidireccionales de 600 rpm
- 2 motores bidireccionales de 100 rpm

Cabezales para bombas peristálticas

- 2 cabezales # 15
- 3 cabezales # 16
- 3 cabezales # 17

1 pHmetro portátil con un transformador

Cajas de control para las bombas peristálticas

Mantas térmicas

- banda de silicón ref. 618/2
- banda de silicón ref. 510/2

Caja de seguridad de Acrílico

Caja de control de interfase para la fermentación

Mangueras

- Master Flex platino # 15
- Master Flex platino # 16
- Master Flex platino #17