



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**Optimización de procesos industriales para la
lisis bacteriana durante la bioproducción de
Recombinámeros de tipo elastina (ELRs)
empleados en aplicaciones biomédicas**

Autor:

Alonso García, Carlos Manuel

Tutor(es):

**González de Torre, Israel
Acosta Rodríguez, Sergio
Departamento de Química Analítica**

Valladolid, septiembre de 2024

ÍNDICE

1. Resumen	10
2. Objetivos	12
3. Introducción	13
3.1. Ingeniería de bioprocesos	13
3.2. Biomateriales	15
3.3. Recombinámeros tipo elastina (ELRs)	19
3.4. Métodos de lisis bacteriana a escala industrial	23
3.4.1. Métodos mecánicos	24
3.4.2. Métodos no mecánicos	26
4. Materiales y métodos	28
4.1. Materiales	28
4.1.1. Instrumental del laboratorio	28
4.1.2. Equipos	29
4.1.3. Reactivos químicos	34
4.1.4. Soluciones de aplicación general	35
4.1.5. Medios de cultivo bacteriano	36
4.2. Bioproducción	37
4.2.1. Sembrado de la placa bacteriana	37
4.2.2. Screening	38
4.2.3. Crecimiento de la bacteria: preparación del preinóculo, subcultivo e inóculo	39
4.2.4. Medición de absorbancia	39
4.2.5. Lavado de células	40
4.2.6. Lisis bacteriana	40
4.2.7. Purificación del polímero	41
4.2.8. Diálisis	44
4.2.9. Filtración y Liofilización	44
4.3. Caracterización mediante electroforesis con gel de poliacrilamida y SDS (SDS-Page)	45
4.3.1. Ensamblaje de los vidrios	45
4.3.2. Preparación del gel de resolución (<i>resolving gel</i>)	46
4.3.3. Preparación del gel de empacamiento (<i>stacking gel</i>)	47
4.3.4. Montaje de la cubeta de electroforesis	47
4.3.5. Puesta en marcha de la electroforesis	47
4.3.6. Coloración y visualización de las proteínas	48
5. Resultados y discusión	49
5.1. Número de ciclos de ruptura por congelación-descongelación	49
5.2. Influencia del calentamiento previo y del reposo en MQ	51
5.3. Comparación de rendimientos entre la disrupción y los ciclos <i>freeze-thaw</i>	58
6. Análisis medioambiental	63
7. Análisis de rentabilidad	64

8. Conclusiones	69
9. Bibliografía	70
10. Nomenclatura	75
Subíndices	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Campos de aplicación en la ingeniería de bioprocesos [7]	15
Tabla 2. Reactivos químicos	34
Tabla 3. Soluciones de aplicación general	35
Tabla 4. Medios de cultivo bacteriano	36
Tabla 5. Preparación del gel de resolución.....	46
Tabla 6. Preparación del gel de empacamiento	47
Tabla 7. Costes de las materias primas (productos químicos)	64
Tabla 8. Costes de los equipos de proceso empleados en el laboratorio	65
Tabla 9. Costes energéticos.....	68
Tabla 10. Costes de agua.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prótesis fabricadas a partir de materiales naturales: dedo del pie de madera, alrededor de 1065-740 a.C., utilizado como prótesis para reemplazar un dedo del pie amputado e identificado en una excavación antropológica de las tumbas del oeste de Tebas, Egipto [28]	16
Figura 2. Enlace peptídico	19
Figura 3. Tecnología de ADN recombinante [39]	20
Figura 4. Proceso de bioproducción de ELRs mediante la tecnología de ADN recombinante [8]	21
Figura 5. Representación esquemática del modelo de derivación arteriovenosa femoral de babuino. Las muestras de prueba se interponen dentro de una derivación de silicona exteriorizada y la deposición de plaquetas In111 en superficies de prueba monitoreadas por imágenes de cámara de centelleo utilizando un sistema SPECT [26]	22
Figura 6. Hidrogel inyectable a base de ELRs para aplicaciones osteocondrales [24].....	22
Figura 7. Esquema de un proceso de bioproducción a escala industrial [18]	23
Figura 8. Métodos mecánicos de ruptura celular [18]	24
Figura 9. Esquema de un molino de bolas [18]	25
Figura 10. Modelo molecular de la guanidina	26
Figura 11. Centrífuga Beckman Coulter Avanti J-26 XP	29
Figura 12. Autoclave JP Selecta Autester-E-DRY 75	30
Figura 13. Disruptor GEA Niro Soavi Panda Plus	30
Figura 14. Incubador Certomat Thermo MaxQ 8000	31
Figura 15. Componentes de una celda de electroforesis [25].....	32
Figura 16. Procedimiento de montaje de la cubeta de electroforesis [imagen tomada de protocolo del grupo de investigación BIOFORGE).....	33
Figura 17. Procedimiento de sembrado de placa bacteriana [15]	38
Figura 18. Protocolo de purificación del polímero OE5OI60 [imagen tomada de protocolo del grupo de investigación BIOFORGE)	43
Figura 19. Ejemplo de impresión de foto de SDS-Page [25].....	45
Figura 20. Impresión de SDS Page representando la evolución de ciclos de ruptura por congelación-descongelación del polímero HRGD6, con las siguientes calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Muestra 1, sobrenadante, ciclo 1; 3) Muestra 1, precipitado, ciclo 1;	

4) Muestra 1, sobrenadante, ciclo 2; 5) Muestra 1, precipitado, ciclo 2; 6) Muestra 1, sobrenadante, ciclo 3; 7) Muestra 1, precipitado, ciclo 3; 8) Muestra 2, sobrenadante, ciclo 1; 9) Muestra 2, precipitado, ciclo 1; 10) Muestra 2, sobrenadante, ciclo 2; 11) Muestra 2, precipitado, ciclo 2; 12) Muestra 2, sobrenadante, ciclo 3; 13) Muestra 2, precipitado, ciclo 3..... 49

Figura 21. Impresión de SDS Page representando la evolución de ciclos de ruptura por congelación-descongelación del polímero VK4x24, con las siguientes calles: 1) Muestra 1, sobrenadante, ciclo 1; 2) Muestra 1, precipitado, ciclo 1; 3) Muestra 1, sobrenadante, ciclo 2; 4) Muestra 1, precipitado, ciclo 2; 5) Muestra 1, sobrenadante, ciclo 3; 6) Muestra 1, precipitado, ciclo 3; 7) Muestra 1, sobrenadante, ciclo 4; 8) Muestra 1, precipitado, ciclo 4; 9) Marcador de pesos moleculares. 50

Figura 22. Impresión de SDS Page representando el screening de una producción de polímero OE50I60, donde la primera calle representa el marcador de proteínas, mientras que las siguientes 8 calles representan cada una de las colonias aisladas seleccionadas..... 51

Figura 23. Impresión de SDS Page representando la evolución de ciclos de ruptura por congelación-descongelación del polímero OE50I60, tras haber permanecido la bacteria en reposo durante 1h en agua MQ y posteriormente congelarse a -80°C. Se tienen las siguientes calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Sobrenadante, ciclo 1; 3) Precipitado, ciclo 1; 4) Sobrenadante, ciclo 2; 5) Precipitado, ciclo 2; 6) Sobrenadante, ciclo 3; 7) Precipitado, ciclo 3; 8) Sobrenadante, ciclo 4; 9) Precipitado, ciclo 4; 10) Sobrenadante, ciclo 5; 11) Precipitado, ciclo 5; 12) Sobrenadante, ciclo 6; 13) Precipitado, ciclo 6; 14) Marcador de pesos moleculares. 52

Figura 24. Impresión de SDS Page representando la evolución de ciclos de ruptura por congelación-descongelación del polímero OE50I60, tras haber sometido la bacteria directamente a congelación a -80°C. Se tienen las siguientes calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Sobrenadante, ciclo 1; 3) Precipitado, ciclo 1; 4) Sobrenadante, ciclo 2; 5) Precipitado, ciclo 2; 6) Sobrenadante, ciclo 3; 7) Precipitado, ciclo 3; 8) Sobrenadante, ciclo 4; 9) Precipitado, ciclo 4; 10) Sobrenadante, ciclo 5; 11) Precipitado, ciclo 5; 12) Sobrenadante, ciclo 6; 13) Precipitado, ciclo 6; 14) Marcador de pesos moleculares. 53

Figura 25. Impresión de SDS Page representando la evolución de ciclos de ruptura por congelación-descongelación del polímero OE50I60, tras haber sometido la bacteria a un calentamiento a +80°C y posteriormente congelarse a -80°C. Se tienen las siguientes calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Sobrenadante, ciclo 1; 3) Precipitado, ciclo 1; 4) Sobrenadante, ciclo 2; 5) Precipitado, ciclo 2; 6) Sobrenadante, ciclo 3; 7) Precipitado, ciclo 3; 8) Sobrenadante, ciclo 4; 9) Precipitado, ciclo 4; 10) Sobrenadante, ciclo 5; 11) Precipitado, ciclo 5; 12) Sobrenadante, ciclo 6; 13) Precipitado, ciclo 6; 14) Marcador de pesos moleculares..... 54

Figura 26. Impresión de SDS Page representando la evolución de ciclos de ruptura por congelación-descongelación del polímero OE50I60, tras haber permanecido la bacteria en reposo durante 1h en agua MQ y posteriormente congelarse a -20°C. Se tienen las siguientes calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Sobrenadante, ciclo 1; 3)

Precipitado, ciclo 1; 4) Sobrenadante, ciclo 2; 5) Precipitado, ciclo 2; 6) Sobrenadante, ciclo 3; 7) Precipitado, ciclo 3; 8) Sobrenadante, ciclo 4; 9) Precipitado, ciclo 4; 10) Sobrenadante, ciclo 5; 11) Precipitado, ciclo 5; 12) Sobrenadante, ciclo 6; 13) Precipitado, ciclo 6; 14) Marcador de pesos moleculares. 55

Figura 27. Impresión de SDS Page representando la evolución de ciclos de ruptura por congelación-descongelación del polímero OE50I60, tras haber sometido la bacteria directamente a congelación a -20°C . Se tienen las siguientes calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Sobrenadante, ciclo 1; 3) Precipitado, ciclo 1; 4) Sobrenadante, ciclo 2; 5) Precipitado, ciclo 2; 6) Sobrenadante, ciclo 3; 7) Precipitado, ciclo 3; 8) Sobrenadante, ciclo 4; 9) Precipitado, ciclo 4; 10) Sobrenadante, ciclo 5; 11) Precipitado, ciclo 5; 12) Sobrenadante, ciclo 6; 13) Precipitado, ciclo 6; 14) Marcador de pesos moleculares. 56

Figura 28. Impresión de SDS Page representando la evolución de ciclos de ruptura por congelación-descongelación del polímero OE50I60, tras haber sometido la bacteria a un calentamiento a $+80^{\circ}\text{C}$ y posteriormente congelarse a -20°C . Se tienen las siguientes calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Sobrenadante, ciclo 1; 3) Precipitado, ciclo 1; 4) Sobrenadante, ciclo 2; 5) Precipitado, ciclo 2; 6) Sobrenadante, ciclo 3; 7) Precipitado, ciclo 3; 8) Sobrenadante, ciclo 4; 9) Precipitado, ciclo 4; 10) Sobrenadante, ciclo 5; 11) Precipitado, ciclo 5; 12) Sobrenadante, ciclo 6; 13) Precipitado, ciclo 6; 14) Marcador de pesos moleculares. 57

Figura 29. Impresión de SDS Page representando el screening de una producción de polímero OE50I60, donde la primera y la última calle representan el marcador de proteínas, mientras que restantes calles representan cada una de las colonias aisladas seleccionadas. 58

Figura 30. Impresión de SDS Page representando la purificación de una producción de polímero OE50I60 obtenido mediante ruptura por disrupción, con la siguiente representación por calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Sobrenadante de ruptura por disrupción (etapa 1); 3) Precipitado de ruptura por disrupción (etapa 1); 4) Sobrenadante base (etapa 2); 5) Precipitado base (etapa 2); 6) Sobrenadante ácido 1 (etapa 3); 7) Precipitado ácido 1 (etapa 3); 8) Sobrenadante frío 1 (etapa 4); 9) Precipitado frío 1 (etapa 4) 59

Figura 31. Impresión de SDS Page representando la purificación de una producción de polímero OE50I60 obtenido mediante ruptura por disrupción, con la siguiente representación por calles: 10) Sobrenadante ácido 2 (etapa 5); 11) Precipitado ácido 2 (etapa 5); 12) Sobrenadante frío 2 (etapa 6); 13) Precipitado frío 2 (etapa 6); 14) Sobrenadante neutro (etapa 7); 15) Precipitado neutro (etapa 7); 16) Sobrenadante caliente (etapa 8); 17) Precipitado caliente (etapa 8); 18) Marcador de pesos moleculares 60

Figura 32. Impresión de SDS Page representando la purificación de una producción de polímero OE50I60 obtenido mediante ruptura por ciclos de congelación-descongelación, con la siguiente representación por calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Sobrenadante de ruptura por congelación-descongelación (etapa 1); 3) Precipitado de ruptura por congelación-descongelación (etapa 1); 4) Sobrenadante base (etapa 2); 5) Precipitado base (etapa 2); 6) Sobrenadante ácido 1 (etapa 3); 7) Precipitado ácido 1 (etapa 3); 8) Sobrenadante frío 1 (etapa 4); 9) Precipitado frío 1 (etapa 4) 61

Figura 33. Impresión de SDS Page representando la purificación de una producción de polímero OE50I60 obtenido mediante ruptura por disrupción, con la siguiente representación por calles: 10) Sobrenadante ácido 2 (etapa 5); 11) Precipitado ácido 2 (etapa 5); 12) Sobrenadante frío 2 (etapa 6); 13) Precipitado frío 2 (etapa 6); 14) Sobrenadante neutro (etapa 7); 15) Precipitado neutro (etapa 7); 16) Sobrenadante caliente (etapa 8); 17) Precipitado caliente (etapa 8); 18) Marcador de pesos moleculares..... 62

Figura 34. Diagrama de Gantt de la planificación por días del proceso de producción de ELRs 66

Figura 35. Diagrama de Gantt de la planificación por horas del proceso de lisis bacteriana empleando el disruptor 66

Figura 36. Diagrama de Gantt de la planificación por horas del proceso de lisis bacteriana empleando ciclos de congelación-descongelación 67

1. Resumen

Resumen

En el presente trabajo de fin de grado, se ha llevado a cabo el proceso biotecnológico de producción de polímeros recombinantes tipo elastina (ELRs) en el laboratorio, con el objetivo de proponer alternativas a una de las etapas que presenta mayores dificultades en cuanto a costes y tiempo: la ruptura celular; además de proponer medidas correctoras y realizar un análisis simplificado desde los puntos de vista de rentabilidad económica y medioambiental.

Se buscaron alternativas distintas a la sonicación y la disrupción para la etapa de lisis bacteriana. El método propuesto consistía en la sucesión de ciclos de congelación-descongelación (*freeze & thaw*), modificando distintas variables como la cantidad de agua MQ en la que se suspendían las bacterias, el tiempo de reposo en la misma o si se sometía a un proceso previo de calentamiento a 80°C. Con esto, se quería comprobar si se requería menos tiempo de operación; menos materias primas, al no requerir elaboración de disoluciones adicionales; y menos costes, ahorrando en mantenimiento y limpieza exhaustiva de un equipo más caro.

En estos procesos se emplearon diferentes polímeros producidos en el grupo de investigación BIOFORGE, como el VKV4x24, el HRGD6, y principalmente, el OE50I60, entre otros.

Empleando técnicas de caracterización como la SDS-PAGE, se concluyó que el método *freeze & thaw* a escala de laboratorio requería mayor tiempo para lograr la ruptura celular completa, además de obtenerse una menor cantidad de polímero tras la purificación, en comparación con la operación realizada con el disruptor.

Palabras clave: bioproducción, ELRs, disrupción, congelación, optimización

Abstract

In this project, biotechnological production process of elastin-like recombinant polymers (ELRs) has been carried out in laboratory, with the aim of proposing alternatives to one of the most difficult stages in terms of cost and time: cell disruption, in addition to proposing corrective measures and carrying out a simplified analysis from an economic and environmental point of view.

Alternatives to sonication and disruption were sought for the bacterial lysis step. The proposed method consisted of a freeze-thaw cycles succession, modifying different variables such as the amount of MQ water in which bacteria were suspended, the resting time in the water or whether they were subjected to a previous heating process at 80°C. With this, the aim was to check whether less operation time was required; less raw materials, as no buffers were also required; and less costs, saving on maintenance and exhaustive cleaning of more expensive equipment.

In these processes, different polymers produced in BIOFORGE research group were used, such as VKV4x24, HRGD6, and mainly OE50I60, among others.

Using characterisation techniques such as SDS-PAGE, it was concluded that freeze & thaw method at laboratory scale required more time to achieve complete cell disruption, in addition to obtaining a smaller amount of polymer after purification, compared to the operation carried out with disruptor.

Keywords: bioproduction, ELRs, disruption, freeze-thaw, optimisation

2. Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo de fin de grado consiste en la optimización del proceso de bioproducción de ELRs, polímeros con aplicaciones biomédicas, a partir del análisis de las etapas de producción, ruptura y purificación.

Por ello, serán de debido cumplimiento los siguientes objetivos parciales:

- Estudio del proceso productivo a escala de laboratorio y detección de aquellos aspectos que puedan suponer excesivos costes o tiempos de producción.
- Propuesta de alternativas viables, optimizando las condiciones experimentales.
- Realización de un estudio económico y medioambiental que permita comprobar la rentabilidad del proceso.

3. Introducción

3.1. Ingeniería de bioprocesos

Es la rama de la ingeniería que se ocupa de la aplicación tecnológica de los sistemas biológicos y organismos vivos, o sus derivados, para la modificación o creación de productos o procesos para un uso específico. Para ello, hace uso de las ciencias naturales, como la física o la química; las matemáticas, y otras disciplinas especializadas, resultado de la combinación de éstas, como la bioquímica o la biotecnología [1].

Los campos que abarca esta disciplina son amplios, englobando etapas de diseño, desarrollo, selección, adaptación, cambios de escala, control... influyendo en distintos sectores y servicios:

- Laboratorios de investigación: área de desarrollo en ciencia y tecnología de los alimentos, tecnología enzimática, tecnología microbiana, biotecnología vegetal, cultivo células y tejidos animales
- Sector industrial: Industrias agroalimentarias, procesadoras de alimentos, empresas basadas en la fermentación (vinos, cervezas, antibióticos, enzimas, ácidos orgánicos, levaduras...).
- Sector químico: Obtención de aminoácidos, polisacáridos...
- Sector energético: Obtención de materiales procedentes de fuentes biológicas con fines energéticos.
- Sector de la salud: Desarrollo de productos farmacéuticos y veterinarios, nuevas drogas, hormonas...
- Procesos minero-metalúrgicos.
- Empresas de consultoría especializadas y agencias públicas o privadas de desarrollo e innovación en el sector biotecnológico [2].

El punto de partida para comenzar el diseño de un bioproceso se basa en el planteamiento de ciertas necesidades [4]:

- ✓ El tipo de materia prima, en función de si es de carácter renovable o no renovable, de alto o bajo costo, o si conlleva cierta dificultad de procesamiento.
- ✓ El agente biológico responsable de la transformación de la materia prima, ya sean enzimas, microorganismos, células de plantas, células mamíferas o tejidos.
- ✓ El tipo de producto o servicio, como la producción de químicos, enzimas, proteínas farmacéuticas, microorganismos, biomateriales; o si se requieren servicios de tratamiento de desechos y conocimiento de los contaminantes a remover.

Posteriormente, se plantean las múltiples operaciones a llevar a cabo: pretratamiento de materia prima; preparación de insumos, sometiendo lo necesario a un proceso de esterilización; preinoculación, fermentación o biorreacción, todo ello después de hacer una rigurosa selección de los equipos y concretar la configuración del proceso; separación de biomasa o enzimas, mediante operaciones como la filtración, centrifugación...; y la separación del producto de interés, ya sea por extracción, evaporación, cromatografía, intercambio iónico...

Se deberán identificar posibles problemas, que puedan aparecer en cada escenario, referentes a microorganismos, como la generación de cepas de manera eficiente y rápida, con capacidades específicas para el proceso de producción, que sean estables genéticamente para mantener su rendimiento de manera prolongada y que se adapten a las distintas materias primas y a las variables de proceso, como la temperatura o la concentración; y a las rutas metabólicas, por si deben modificarse la capacidad catalítica y específica de algunas enzimas antes de ser incluidas en las rutas [5].

Después de definir todas estas condiciones óptimas de proceso, se lleva a cabo un cambio de escala. Generalmente, se escala un biorreactor a planta piloto, de acuerdo con las especificaciones determinadas a partir del prototipo a escala de pruebas [2].

Si la etapa de cambio de escala se completa satisfactoriamente, se avanza al escalado industrial, donde se rediseñan tanto el reactor como todos los servicios requeridos para su funcionamiento, como el equipo de esterilización, los suministros de aire y agua o la red de control del proceso. Además, se deberán ver reflejadas las normas de seguridad exigidas al trabajar con organismos patógenos, compuestos tóxicos y equipos peligrosos [2].

Finalizando el proceso, es crucial la etapa de recuperación del producto, antes de obtener el producto final. A menudo, es difícil y cara, ya que la purificación constituye más del 80% del coste total del proceso. En este escenario, también se plantea la recuperación de efluentes y su posible reutilización [2].

Una vez que el producto se ha purificado, se suele someter a ciertos ensayos con el fin de comprobar su eficacia y, tras comprobar la seguridad correspondiente y establecer medidas preventivas, se puede comercializar. [2].

El trabajo realizado por el grupo de investigación BIOFORGE se enfoca principalmente en sistemas avanzados para aplicaciones biomédicas (ingeniería de tejidos, dosificación de fármacos...), medioambientales, analíticas y otras tecnologías, como el desarrollo de nanosistemas tecnológicos y biotecnológicos para la obtención de dispositivos.

En la Tabla 1, se recogen los distintos campos de aplicación biotecnológica, donde entre ellos, figura el campo de los tejidos:

<i>Biocatalizador</i>	<i>Fases</i>	<i>Productos</i>	<i>Ejemplos</i>
Células	Líquida	Productos químicos	Bioetanol, ácidos orgánicos, bioplásticos
		Enzimas	Amilasas, celulasas
		Inóculos	"Starters", levadura del pan
		Productos farmacéuticos	Antibióticos, hormonas, esteroides,...
		Productos alimentarios	Bebidas fermentadas, vitaminas,
		Tratamientos ambientales	Tratamiento de aguas, de COV, metano
	Sólida	Alimentos	Queso, productos cárnicos
		Tejidos	Piel, tejido hematopoyético
		Residuos y energía	Biogas, compost
Enzimas	Acuosa	Productos químicos	Aminoácidos, glutamato
	Orgánica	Síntesis orgánica	Uso de Hidrolasas (Lipasas, proteasas)
	Sólida	Hidrólisis	Hidrólisis de almidones
		Productos comerciales	Detergentes enzimáticos
Sin biocatalizador	Sólida	Vegetal- Materiales de construcción celular	Papel
		Vegetal- Materiales de almacenamiento de hidratos de carbono	Azúcar
		Animal Grasas	Manteca, Sebos
		Animal órganos	Hormonas
	Líquida	Vegetal	Aceites
		Animal- Proteínas	Lactosuero, sangre de mataderos, colas.

Tabla 1. Campos de aplicación en la ingeniería de bioprocesos [7]

3.2. Biomateriales

De manera general, un biomaterial se define como un material destinado a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o sustituir cualquier tejido, órgano o función del cuerpo, con el fin de emplearse en aplicaciones diagnósticas, terapéuticas, protésicas y de almacenamiento, sin afectar negativamente al organismo vivo y sus componentes [8].

Los biomateriales han contribuido a mejorar la calidad de vida de las personas en casi todos los rincones del mundo. A lo largo de los años, a medida que la ciencia ha progresado y ha permitido comprender mejor la interacción entre la biología y los materiales, la definición de biomateriales también ha cambiado.

Hay ciertos requisitos que deberán cumplir los biomateriales para poder ser implementados [9]:

- ✓ Biocompatibilidad, en función de su estructura, forma, composición y propiedades químicas, físicas, eléctricas o mecánicas. El grado de biocompatibilidad dependerá del tipo de aplicación, así como de la localización del biomaterial en el organismo, con el objetivo de evitar cualquier alteración patológica al entrar en contacto con los tejidos vivos.

- ✓ Reproducibilidad, en cuanto a su fabricación.
- ✓ Fiabilidad, que sea capaz de mantener sus prestaciones.
- ✓ Económicamente viable, buscando que su precio sea lo más reducido posible.

El uso de este tipo de materiales por parte de la humanidad para realizar aumentos o reparaciones en el cuerpo se remonta a la antigüedad, cuando se utilizaron materiales naturales como la madera en un intento de reemplazar estructuralmente tejidos perdidos por enfermedades [18].



Figura 1. Prótesis fabricadas a partir de materiales naturales: dedo del pie de madera, alrededor de 1065-740 a.C., utilizado como prótesis para reemplazar un dedo del pie amputado e identificado en una excavación antropológica de las tumbas del oeste de Tebas, Egipto [28]

A principios del siglo XX, los materiales de origen natural comenzaron a ser reemplazados por polímeros sintéticos, cerámicas y aleaciones metálicas, que proporcionaban una mayor funcionalidad, un mejor rendimiento y más reproducibilidad que sus contrapartes derivadas

de forma natural. Las posibilidades de usar estos materiales duraderos e inertes intrigaron inmediatamente a los cirujanos con necesidades de reemplazar partes del cuerpo enfermas o dañada [28].

Se deseaba que los materiales realizaran funciones en gran medida mecánicas: para evitar el rechazo biológico, que obstaculizaba el rendimiento del dispositivo y la salud del paciente, era preferible que fueran inertes y no interactuaran con la biología del organismo huésped. Sin embargo, la revolución de la biología molecular de la década de 1970 y los avances en proteómica y genómica en las décadas de 1990 y 2000 afectaron significativamente las formas en que se diseñan y emplean los biomateriales. Este progreso llevó a un pronunciado aumento en el uso y la eficacia de los biomateriales, como resultado de lo cual millones de vidas se han salvado o mejorado debido a dispositivos como restauradores dentales, *stents* vasculares, caderas artificiales o lentes de contacto [29].

La creciente importancia de los biomateriales en nuestra sociedad puede verse reflejada no solo en la industria, sino como disciplina académica. Ha habido un aumento precipitado en las publicaciones científicas en el campo de los biomateriales en los últimos 30 años, y aunque los biomateriales fueron históricamente un foco de estudio en un número muy pequeño de escuelas, el campo se ha expandido notablemente en los últimos 20 años. Solo en los Estados Unidos, ahora hay más de 75 departamentos de ingeniería biomédica (solo 12 existían en 1975) [28].

Algunos de los materiales diseñados específicamente para aplicaciones de biomateriales fueron los siguientes:

Siliconas

A principios de la década de 1940, Eugene Rochow de General Electric, fue pionero en la ampliación y fabricación de siliconas comerciales a través de la reacción del cloruro de metilo con silicona en presencia de catalizadores. Destaca la aplicación de caucho de silicona en riñones artificiales y rejillas de goma recubiertas de silicona para soportar una membrana de diálisis. [28].

Poliuretano

Fue inventado por Otto Bayer y sus colegas en Alemania en 1937. La química de los poliuretanos ofrecía intrínsecamente una amplia gama de opciones sintéticas que conducían a plásticos duros, elastómeros o películas flexibles. Curiosamente, esta fue la primera clase de polímeros que exhibió elasticidad de caucho sin reticulación covalente. Ya en 1959, los poliuretanos se exploraron para aplicaciones biomédicas, específicamente válvulas cardíacas y, a mediados de la década de 1960, se desarrolló una clase de poliuretanos segmentados que mostraban tanto una buena biocompatibilidad como una excelente vida útil [28].

Teflón

El químico Roy Plunkett descubrió el politetrafluoroetileno (PTFE) en 1938, también denominado teflón, un polímero notablemente inerte. En 1958 se comenzó a aplicar para el aislamiento de cables mientras que, en 1969, se descubrió que este material, si se calienta y se estira, forma una membrana porosa con propiedades físicas y químicas atractivas, así que se probó como prótesis vascular. Actualmente, los PTFE expandidos son los principales injertos vasculares sintéticos, y también se utilizan en muchas otras aplicaciones en cirugía y biotecnología [28] [31].

Hidrogeles

Los hidrogeles se han encontrado en la naturaleza desde que la vida en la tierra evolucionó, ya sea en biopelículas bacterianas, en los componentes de la matriz extracelular o en las estructuras vegetales. La gelatina y el agar también fueron conocidos y utilizados para diversas aplicaciones al principio de la historia de la humanidad.

Las primeras aplicaciones importantes incluyeron geles de acrilamida para electroforesis; esponjas porosas de polialcohol vinílico, como implantes; formulaciones de hidrogel como lentes de contacto blandas y geles de alginato para la encapsulación celular [30].

Polietilenglicol (PEG)

También llamado polióxido de etileno, en su forma de alto peso molecular, se puede clasificar como un hidrogel, especialmente cuando las cadenas están reticuladas.

Su baja reactividad con organismos vivos se conoce desde al menos 1944, cuando se examinó como un posible vehículo para administrar por vía intravenosa hormonas liposolubles,

El profesor Edward Merrill del MIT concluyó, gracias a los resultados experimentales de su grupo de investigación a principios de la década de 1980, que el PEG inmovilizado en la superficie resistiría las proteínas y la captación celular. La aplicación de PEG a una amplia gama de problemas biomédicos se aceleró significativamente por los desarrollos de química sintética del Dr. Milton Harris mientras estaba en la Universidad de Alabama, Huntsville [28] [30].

Titanio

En 1791, William Gregor, un químico aficionado de Cornualles, utilizó un imán para extraer de un río local el mineral conocido como ilmenita. Posteriormente, extrajo el hierro de este polvo negro con ácido clorhídrico y se quedó con un residuo: el óxido impuro del titanio. Después de 1932, un proceso desarrollado por William Kroll permitió la extracción comercial de titanio a partir de fuentes minerales. Al final de la Segunda Guerra Mundial, los métodos de metalurgia y los materiales de titanio se abrieron paso de la aplicación militar a usos en implantes [28].

Vidrio orgánico

El biovidrio es uno de los primeros materiales completamente sintéticos que se une perfectamente al hueso, y fue desarrollado por el profesor Larry Hench [28]. Durante sus años como profesor asistente en la Universidad de Florida, descubrió que el cuerpo humano rechazaba algunos metales y materiales poliméricos utilizados para reparar el cuerpo, por lo que se decidió a comprobar que los vidrios a base de silicato y las cerámicas de vidrio que contienen cantidades críticas de iones P y Ca no serían rechazadas por el hueso. Tras confirmar su funcionamiento al implementarse en fémures de rata en el Hospital VA en Gainesville, Hench continuó con más estudios, descubriendo que la superficie del biovidrio, en fluidos biológicos, se transforma de una composición rica en silicatos a una estructura rica en fosfato, posiblemente hidroxiapatita [28].

Este trabajo versa sobre biomateriales poliméricos, mayormente empleados en la disciplina médica debido al amplio abanico de posibilidades que presentan, tanto en variedad de compuestos como en las múltiples formas de fabricación y conformación (en tejidos, bloques, películas, fibras...), proporcionando determinadas características.

problemas relacionados con la purificación y la polidispersidad cuando es necesario sintetizar estructuras más complejas o simplemente polímeros más grandes. Incluso, aunque los subproductos sólo estén presentes en pequeñas cantidades, pueden afectar drásticamente a las propiedades físicas del producto final.

La llegada de la tecnología del ADN recombinante, la cual implica el uso de enzimas y varias técnicas de laboratorio para manipular y aislar segmentos de ADN de interés, para poder combinar o empalmar ADN de diferentes especies o para crear genes con nuevas funciones. Las copias resultantes se conocen como ADN recombinante [40].

Entre las ventajas que engloba esta recombinación artificial del ADN, cabe señalar que permite la producción de proteínas terapéuticas como la insulina, el interferón o la hormona del crecimiento. También facilita la modificación genética de plantas, animales y microorganismos para mejorar ciertas características en concreto, lo cual contribuye a crear modelos animales para estudiar enfermedades humanas, y así facilitar el diagnóstico de enfermedades genéticas mediante la identificación de mutaciones en el ADN. Todo ello, posibilita el desarrollo de vacunas recombinantes, así como la producción de biocombustibles, bioplásticos o alimentos genéticamente modificados que puedan ser más beneficiosos para la salud. [41].

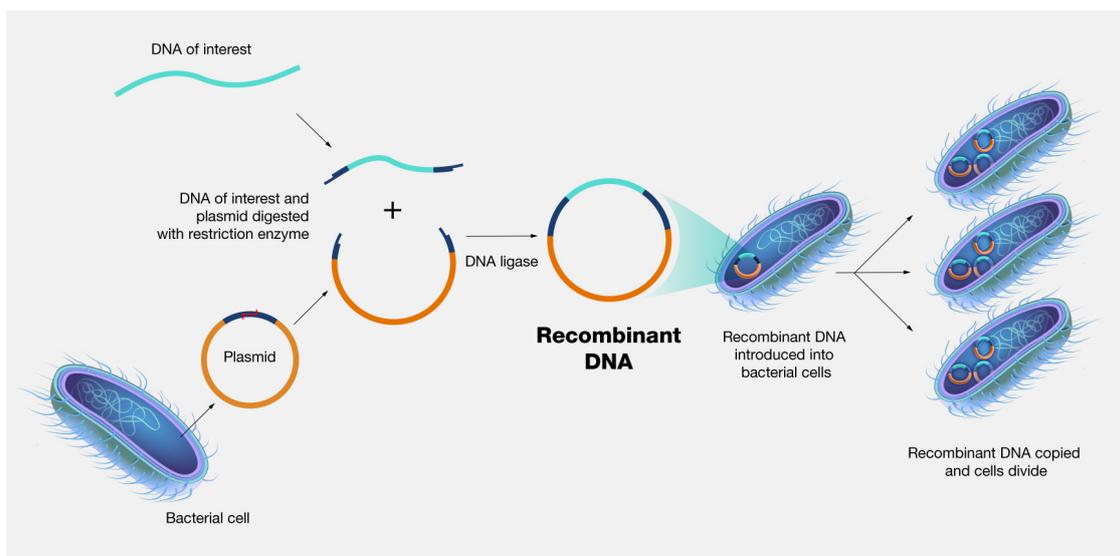


Figura 3. Tecnología de ADN recombinante [39]

Esto abrió un nuevo camino para el diseño y la producción de proteínas sintéticas. En consecuencia, la antigua nomenclatura (ELPs) se cambió por la de recombinantes similares a la elastina (ELRs). Con este nuevo enfoque, se superaron algunos de los problemas derivados de la antigua ruta de síntesis química, obteniendo además un mayor control sobre la secuencia de aminoácidos [24].

El proceso de purificación de los ELRs pasó de las vías clásicas de purificación química a basarse exclusivamente en su comportamiento térmico. Tras varios ciclos de transición inversa (ITC), que consisten en calentar y enfriar las suspensiones que contienen ELRs por encima y por debajo de su temperatura de transición inversa (ITT), estos polímeros pueden purificarse fácilmente sin necesidad de añadir disolventes o agentes químicos que deban eliminarse posteriormente [24].

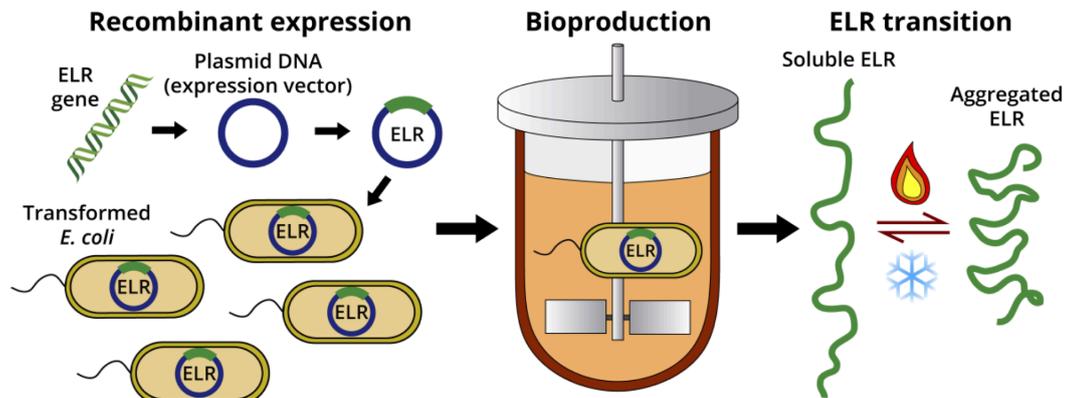


Figura 4. Proceso de bioproducción de ELRs mediante la tecnología de ADN recombinante [8]

Por tanto, los recombinámeros tipo elastina (ELRs) se pueden definir como polímeros biológicos que, debido a la flexibilidad de su diseño, sus propiedades de autoensamblaje, su capacidad para ser modificados químicamente con facilidad, lo que permite la introducción de numerosas funcionalidades interesantes, su capacidad para ser procesados en muchas formas (agregados, fibras, capas, nanopartículas o hidrogeles) y su excelente citocompatibilidad y biocompatibilidad, tienen un potencial significativo en muchos campos que van desde la administración de fármacos y la ingeniería de tejidos hasta la purificación de proteínas, la terapia génica contra el cáncer y las nanovacunas [8].

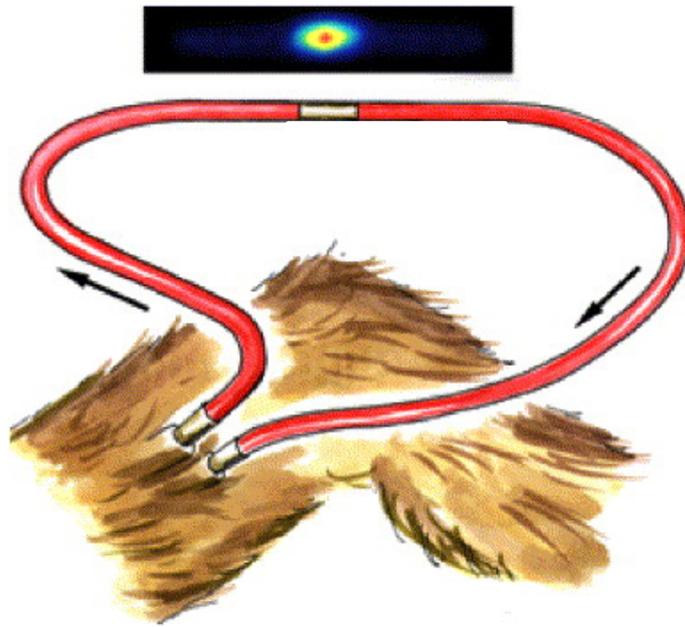


Figura 5. Representación esquemática del modelo de derivación arteriovenosa femoral de babuino. Las muestras de prueba se interponen dentro de una derivación de silicona exteriorizada y la deposición de plaquetas $In111$ en superficies de prueba monitoreadas por imágenes de cámara de centelleo utilizando un sistema SPECT [26]



Figura 6. Hidrogel inyectable a base de ELRs para aplicaciones osteocondrales [24]

3.4. Métodos de lisis bacteriana a escala industrial

El planteamiento de un proceso de purificación debe comenzar con el diseño de la secuencia de separación mediante una serie de etapas, eliminando impurezas y acercando el producto a la especificación final deseada. En segundo lugar, cuando las operaciones unitarias están definidas, debe especificarse el tipo de equipos, su dimensionado y los parámetros de operación [3].

Las etapas de separación y purificación de un proceso biotecnológico se recogen en la Figura 7:

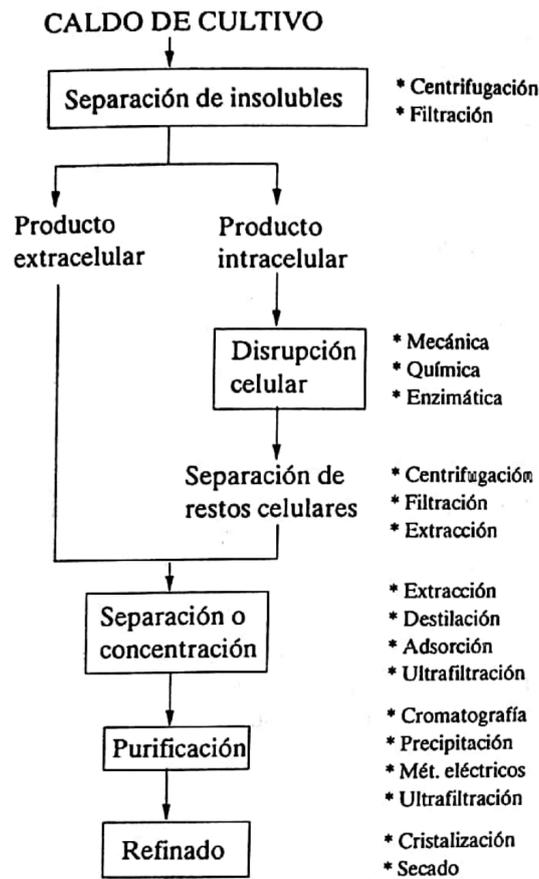


Figura 7. Esquema de un proceso de bioproducción a escala industrial [18]

- Se parte de un caldo de cultivo al que se le deben eliminar impurezas insolubles mediante operaciones como la centrifugación, la filtración o la sedimentación.
- Si los productos de origen microbiano son intracelulares, para obtenerlos se precisa la desintegración de la célula, de manera que se libere su contenido al medio.
- Después, en la etapa de separación o concentración, se lleva a cabo el aumento de concentración del producto de interés respecto del resto de componentes, mediante la extracción líquido-líquido, la adsorción o la destilación.

- La purificación del producto implica el empleo de operaciones altamente selectivas como la precipitación, la cromatografía o la ultrafiltración para separarlo de impurezas de propiedades físicas y funcionalidad química similares.
- La última etapa del proceso de separación viene determinada por el uso final del producto. En muchos casos, es necesario obtener una preparación final mediante cristalización y secado.

Los métodos de ruptura celular pueden clasificarse en métodos mecánicos y no mecánicos. La aplicación industrial de estos métodos está restringida a los métodos mecánicos, mientras que los no mecánicos se utilizan principalmente a pequeña escala [18].

3.4.1. Métodos mecánicos

Los métodos mecánicos someten a las células a una deformación, ya sea en fase sólida (molienda, prensa) o en fase líquida (ultrasonidos, homogeneizador a presión)

Homogeneizador a presión

Consiste en una bomba de pistón de desplazamiento positivo, que impulsa la suspensión celular a través de una válvula de descarga ajustable, con un orificio de restricción.

La presión de descarga se puede regular a partir de la posición de la válvula. Debido a la compresión adiabática, se produce un aumento de temperatura, por lo que se debe enfriar la suspensión antes de entrar al sistema y entre pasos, para evitar la desnaturalización de las proteínas [18].

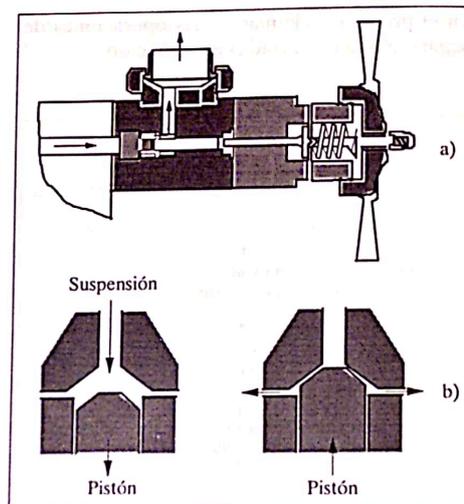


FIGURA 13.3. a) Válvula de descarga de un homogeneizador a presión. b) Posición del pistón y circulación de la suspensión de biomasa.

Figura 8. Métodos mecánicos de ruptura celular [18]

Ultrasonidos

Consiste en aplicar sonidos de frecuencia superior a 15-20 kHz, inaudibles para el oído humano, que producen, a potencias elevadas, la disrupción celular de una suspensión. Basándose en el fenómeno de cavitación, a potencias acústicas elevadas se forman microburbujas en diversos sitios de nucleación en el fluido, que crecen y se rompen, produciendo una onda violenta que se propaga a través del medio.

Su utilización no está extendida a nivel industrial., debido a su escasa eficacia en la disrupción de suspensiones fúngicas, o a que parte de la energía absorbida por la suspensión genera calor, por lo que precisa un buen control de temperatura, así como la formación de radicales libres [18].

Molino de bolas

Se emplean diseños de cámara vertical u horizontal, con un eje central que soporta una colección de discos u otro elemento agitador. La cámara se llena, hasta el nivel deseado, de bolas de vidrio o de acero, normalmente de diámetros comprendidos entre 0,1 y 0,5 mm. La carga de bolas se retiene mediante un plato perforado en los molinos verticales.

La configuración horizontal conduce a una mayor eficacia, debido a que el flujo ascendente en los molinos verticales tiende a una cierta fluidización de las bolas, reduciendo el efecto de molienda [18].

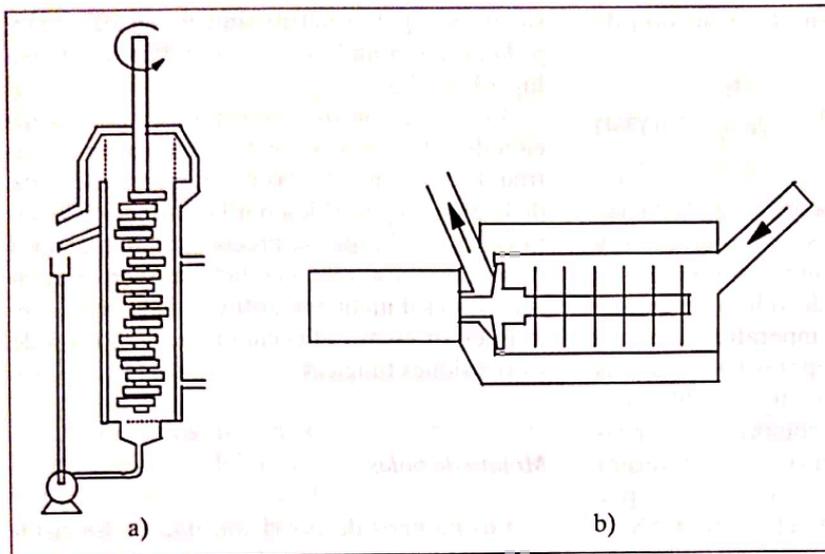


FIGURA 13.4. Esquema de un molino de bolas vertical (a) y horizontal (b).

Figura 9. Esquema de un molino de bolas [18]

Prensas

Se hace pasar una pasta de células a través de un estrechamiento u orificio. Si se utiliza un abrasivo, suele trabajarse a temperaturas poco inferiores a 0°C, mientras que en su ausencia se hace a temperaturas del orden de -25°C [18].

3.4.2. Métodos no mecánicos

La lisis no mecánica se puede clasificar en tres grupos principales: físico, químico y biológico.

Lisis química

Puede llevarse a cabo utilizando ácidos, bases, disolventes o surfactantes. En el caso de ácidos o bases, la disrupción no es muy selectiva y pueden llegar a desnaturalizarse las proteínas lábiles [18]. En la lisis alcalina, en un rango de pH de 11,5-12,5, los iones OH^- son el componente principal, empleándose una disolución tampón con hidróxido de sodio y dodecil sulfato de sodio (SDS). El ion OH^- reacciona con la membrana celular y rompe los enlaces de éster ácido graso-glicerol y posteriormente hace que la membrana celular sea permeable y el SDS solubiliza las proteínas y la membrana [13].

En cuanto a los detergentes o surfactantes, estos tienen la capacidad de interrumpir las interacciones hidrofóbicas-hidrofílicas de capas bilípidas como la membrana celular. Según su capacidad de carga, se pueden dividir en detergentes catiónicos, aniónicos y no iónicos. Un detergente iónico como el SDS se utiliza ampliamente para la lisis de células debido a su alta afinidad para unirse a las proteínas y desnaturalizarlas rápidamente. Se utiliza en la electroforesis en gel y en las técnicas de electrotransferencia (*western blotting*). La parte hidrófila de un detergente aniónico es principalmente un grupo sulfato o carboxílico, mientras que para el detergente catiónico es un grupo de amonio. Además de los detergentes iónicos y no iónicos, los agentes caotrópicos también se pueden utilizar para la lisis celular, entre los que se incluyen la urea, la guanidina y o el ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), que puede romper la estructura del agua y hacerla menos hidrofílica [13].

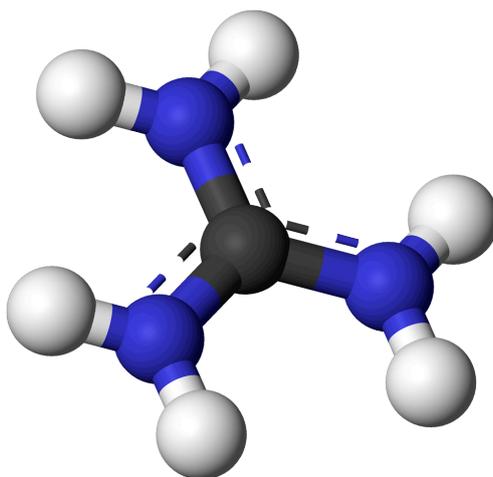


Figura 10. Modelo molecular de la guanidina

Lisis enzimática

Se basa en la acción de enzimas capaces de degradar o modificar la estructura de la pared celular de manera selectiva, como la lisozima, la lisostafina, la zimolasa, la celulosa, la proteasa o la glicanasa. La mayoría de estas enzimas están disponibles comercialmente y se pueden utilizar para la lisis a gran escala. Una ventaja de la lisis enzimática es su especificidad. No obstante, su aplicación a escala de proceso viene limitada por el coste de la enzima, que se pierde con el extracto.

Las lisozimas se utilizan para la lisis de células bacterianas, generalmente a pH 6-7 y a 35°C, mientras que la quitinasa se puede utilizar para la lisis de células de levadura y las pectinasas se utilizan para la lisis de células vegetales. La lisozima reacciona con la capa de peptidoglicano y rompe el enlace glucósido. Por ello, las bacterias grampositivas pueden estar directamente expuestas a la lisozima; sin embargo, la membrana externa de la bacteria gramnegativa debe eliminarse con detergentes antes de exponer la capa de peptidoglicano a la enzima [13].

4. Materiales y métodos

4.1. Materiales

4.1.1. Instrumental del laboratorio

- Uso general
 - Tubos Falcon
 - Tubos Eppendorf de 1,5 mL
 - Pipetas Pasteur
 - Micropipetas regulables
 - Vasos de precipitados
 - Jarras
 - Espátulas
 - Papel parafilm
 - Papel de aluminio
- Bioproducción
 - Placas Petri
 - Asas de siembra
 - Mechero
 - Pinzas
 - Palillos estériles
 - Flask
 - Cubetas de vidrio, para medir la absorbancia
 - Botes y cestos (*buckets*), para centrifugación
 - Placa calefactora
 - Imán agitador
- Diálisis y filtración
 - Depósito de 25 mL
 - Membrana o tripa de diálisis
 - Filtro de vacío

El material reutilizable (jarras, vasos, botes de centrífuga...) se debe lavar adecuadamente para su uso y, en el caso de que sea necesario, esterilizarse en el autoclave (vidrio) o en la estufa (plástico).

Los Flask ya utilizados no se pueden autoclavar, así que deben aclararse con una solución de agua y lejía, que permita eliminar las bacterias restantes, seguido de un lavado con agua y jabón, y finalizando con un proceso de esterilización en campana con etanol al 70% y con agua destilada, para eliminar posibles espumas y restos de alcohol.

4.1.2. Equipos

- Balanza analítica
 - Instrumento de pesaje que, mediante la acción de la gravedad, determina la masa de las sustancias
 - El modelo empleado durante la experimentación es *KERN PFB 6000-1*
- Placa calefactora
 - Equipo que permite calentar muestras líquidas, de forma controlada
 - El modelo empleado durante la experimentación, para el calentamiento de tubos Eppendorf, es *Heidolph MR Hei-Tec*
- Baño termostático
 - Equipo diseñado para atemperar muestras en agua mediante un sistema de control de temperatura, que la mantiene constante.
 - Durante la experimentación, se emplean los siguientes baños:
 - Para calentar a 42°C, modelo *LAUDA E-100*
 - Para calentar a 80°C, modelo *Grant JB-Academy*
- pH-metro
 - Instrumento que mide la actividad del ion hidrógeno en soluciones acuosas, mostrando el pH de la muestra. Previamente a su utilización, es necesario calibrarlo, introduciendo el electrodo en disoluciones tampón para, seguidamente, medir la muestra hasta alcanzar una lectura constante.
 - El modelo empleado durante la experimentación es *Crison GLP 21*
- Agitador magnético
 - Equipo que permite mezclar de manera homogénea una solución líquida contenida en un recipiente, mediante un campo magnético rotatorio que hace girar a un imán magnético
 - El modelo empleado durante la experimentación es *Heidolph MR Hei-Mix L*
- Centrífugas
 - Equipos empleados para separar mezclas que se someten a la acción de la fuerza centrífuga por efecto del giro rápido del tambor, permitiendo así la obtención de distintas fases.
 - Durante la experimentación, se emplean las siguientes centrífugas:
 - Centrífuga fría para botes de altos volúmenes, modelo *Sorvall Bios 16*
 - Centrífuga fría para botes de hasta 250 mL, modelo *Beckman Coulter Avanti J-26 XP*
 - Centrífuga caliente para botes de hasta 250 mL, modelo *Sorvall Legend XTR*



Figura 11. Centrífuga Beckman Coulter Avanti J-26 XP

- Centrífuga fría para Eppendorf, modelo *Sorvall Legend Micro 21-R*
 - Centrífuga a temperatura ambiente para Eppendorf, modelo *MiniSpin Plus F-45-12-11*
- Autoclave
 - Equipo formado por un recipiente en el que el vapor circula a alta presión con la finalidad de la esterilización. Para que sea efectiva, el vapor debe saturarse y por consiguiente debe purgarse todo el aire del interior de la cámara antes de iniciar el proceso.
 - El modelo empleado durante la experimentación es *JP Selecta Autester-E-DRY 75*
- Disruptor
 - Equipo que permite efectuar la lisis bacteriana mediante cambios bruscos de presión, rompiendo la pared celular y liberando las moléculas biológicas.
 - El modelo empleado durante la experimentación es *GEA Niro Soavi Panda Plus*



Figura 12. Autoclave JP Selecta Autester-E-DRY 75



Figura 13. Disruptor GEA Niro Soavi Panda Plus

- Incubador
 - Equipo que permite el crecimiento de cultivos celulares, a unas condiciones óptimas de temperatura, humedad y velocidad de agitación
 - Es importante dejar el tapón semiabierto de los tubos Falcon introducidos, para favorecer el intercambio de gases con el exterior
 - El modelo empleado durante la experimentación es *Certomat Thermo MaxQ 8000*
- Mezclador de vórtice o vórtex
 - Dispositivo que permite la mezcla de sustancias en pequeñas cantidades, contenidas en tubos Eppendorf o Falcon, gracias a su movimiento vibratorio, al presionar el soporte con el tubo.
 - El modelo empleado durante la experimentación es *Heidolph 541-10000-00*
- Espectrofotómetro UV-Vis
 - Equipo que actúa como lector de absorbancia, cuya finalidad es detectar y cuantificar los fotones de luz absorbidos y/o transmitidos por la muestra líquida cuando se expone a la luz de una longitud de onda específica.
 - El modelo empleado durante la experimentación es *Varian Cary 50 Scan*
- Cámara de electroforesis
 - Equipo que permite separar las proteínas según su peso molecular, moviéndose a través de un gel mediante la generación de un campo eléctrico
 - Sus componentes son los siguientes:
 - Dos espaciadores, que son placas planas alargadas de iguales dimensiones y fabricadas con un material flexible, pero resistente. Generalmente, están hechas de teflón o de poliestireno. Su función es determinar el grosor del gel mediante la unión de dos placas de vidrio.
 - Dos placas de vidrio, del mismo grosor y anchura, pero de diferente altura, conteniendo uno de ellos una hendidura donde se coloca el peine que dará forma a los pocillos donde se colocan las muestras. Con una pipeta Pasteur, se depositan en su hueco los geles de poliacrilamida.
 - Una matriz formadora, donde se ensamblan los vidrios con los espaciadores, mediante unas prensas que ejercen presión y mantienen fijo el sistema.



Figura 14. Incubador *Certomat Thermo MaxQ 8000*

- Un peine, cuyos dientes pueden variar en tamaño, número y grosor, que moldea los pocillos donde se depositan las muestras. Se fabrica con el mismo material que los espaciadores.
- Un soporte o base, donde se coloca el sistema de vidrios ensamblados, con los geles ya formados junto con el peine ya colocado. Consta de un pequeño depósito donde se vierte buffer de corrida (*running buffer*) antes de comenzar la electroforesis.
- Un tanque de electroforesis, que contiene un baño de *running buffer*, donde se deposita el soporte o base, y que consta de una tapa superior con unos electrodos que se conectan a la fuente de energía.
- Una fuente de energía, que provee de energía eléctrica a la cámara de electroforesis. Permite regular el voltaje, el amperaje y el tiempo según las necesidades pertinentes.

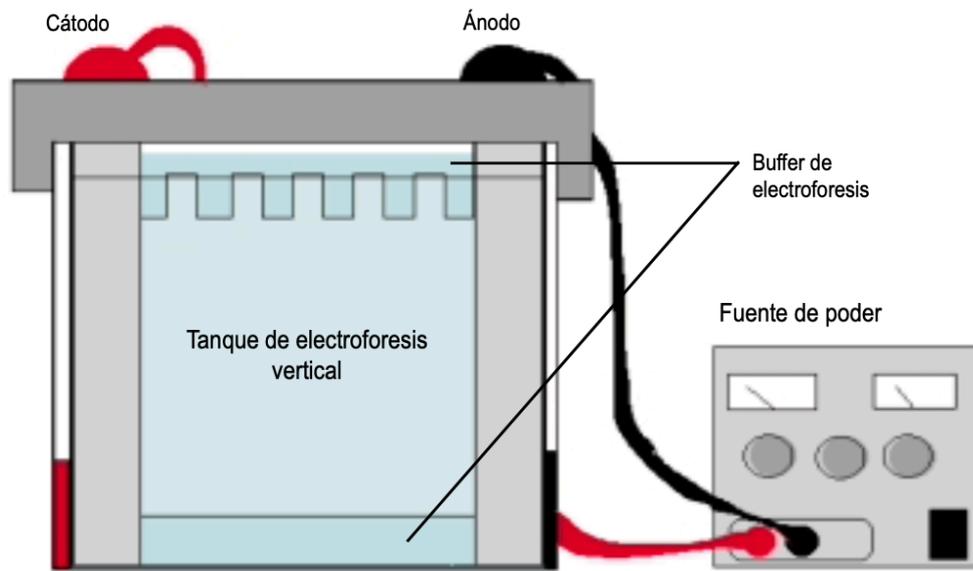


Figura 15. Componentes de una celda de electroforesis [25]

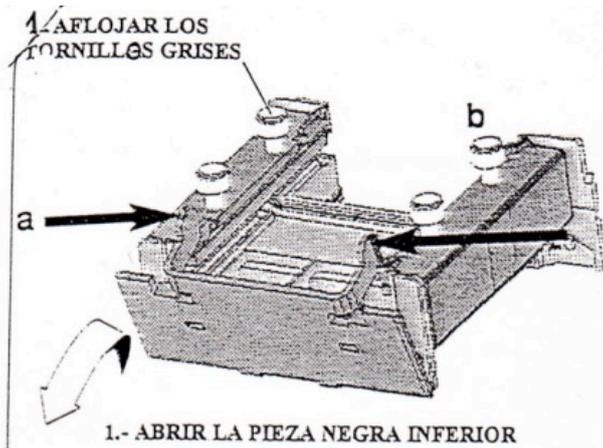


FIGURA 1

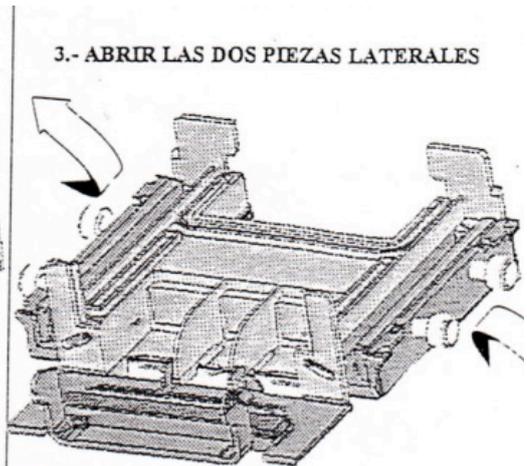
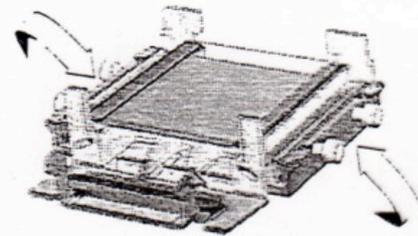


FIGURA 2



FIGURA 3

4.- CERRAR LAS DOS PINZAS LATERALES (atornillar primero una pieza sin apretar a tope, luego la otra y por último cerrar firmemente todos los tornillos)



5.- CERRA LA PIEZA INFERIOR (presionar las dos piezas laterales hacia dentro hasta la posición más alta)

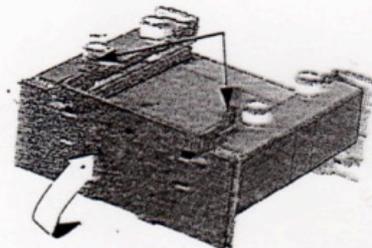


FIGURA 4

Figura 16. Procedimiento de montaje de la cubeta de electroforesis [imagen tomada de protocolo del grupo de investigación BIOFORGE]

4.1.3. Reactivos químicos

A continuación, en la Tabla 2, se recogen los reactivos químicos empleados durante la experimentación (ya sea destinados a la preparación de medios de cultivo, proceso de bioproducción, electroforesis...), así como sus empresas proveedoras:

REACTIVO	PROVEEDOR
Etanol	MERCK
Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)	FISHER
Acilamida 40%	FISHER
Dodecilsulfato sódico (SDS)	FISHER BioReagents
Acilamida 40%	VWR
Tetrametilendiamina (TEMED)/25 mL	FISHER
n-butanol	MERCK
Marcador de proteínas	FISHER
Cloruro cúprico	FISHER
Glicerol	FISHER BioReagents
Antiespumante	Sigma-Aldrich
Cloruro sódico	FISHER BioReagents
Ampicilina	IBIAN
Glucosa	FISHER
Hidróxido sódico	FISHER
Ácido clorhídrico	FISHER
Isopropanol	FISHER BioReagents

Tabla 2. Reactivos químicos

4.1.4. Soluciones de aplicación general

Se elaboraron las siguientes soluciones de aplicación. Las tres primeras se emplearon en la elaboración de geles para electroforesis, mientras que las dos siguientes fueron requeridas para las etapas de lavado y ruptura de bacterias durante la bioproducción:

SOLUCIÓN	CANTIDADES
TRIS 1,5M pH 8,8	<ul style="list-style-type: none">▪ 60,6 g de TRIS/base▪ 1 L de agua destilada
TRIS 0,5M pH 6,8	<ul style="list-style-type: none">▪ 121,2 g de TRIS/base▪ 500 mL de agua destilada
<i>Running buffer 5x</i>	<ul style="list-style-type: none">▪ 15,1 g de TRIS/base▪ 71 g de glicerol▪ 5 g de SDS 10% (w/v)
Tampón de lavado x20	<ul style="list-style-type: none">▪ 242 g de TRIS/base▪ 1170 g de NaCl▪ 5 L de agua destilada
Tampón de sonicación x10	<ul style="list-style-type: none">▪ 242 g de TRIS/base▪ 500 mL de EDTA 0,5M pH 8,0▪ 10 L de agua MQ
EDTA 0,5M pH 8,0	<ul style="list-style-type: none">▪ 186,12 g de EDTA▪ 1 L de agua MQ

Tabla 3. Soluciones de aplicación general

Se debe ajustar el EDTA a pH 8, adicionando unos 24 g de NaOH, mientras que los tampones de lavado y de sonicación deben estar a pH 7,5, añadiendo unos 140 mL de HCl al 37%.

4.1.5. Medios de cultivo bacteriano

Los medios de cultivo son soluciones preparadas y esterilizadas, bien en autoclave a 1 atm y 120°C (LB y TB) con el objetivo de promover el crecimiento y transformación de las bacterias, o bien filtradas en campana (ampicilina y glucosa)

MEDIO	CANTIDADES
<i>Terrific Broth</i> (TB)	<ul style="list-style-type: none">▪ 55,85 g de TB Formedium▪ 1 L de agua destilada▪ 8 mL de glicerol▪ 100 µl de antiespumante
<i>Luria Broth</i> (LB)	<ul style="list-style-type: none">▪ 25 g de LB Conda▪ 1 L de agua destilada
<i>Luria Broth Agar</i> (LB-Agar)	<ul style="list-style-type: none">▪ 12,5 g de LB Conda▪ 7,5 de agar
Glucosa al 20%	<ul style="list-style-type: none">▪ 20 g de glucosa▪ 100 mL de agua MQ
Ampicilina de 100 mg/mL	<ul style="list-style-type: none">▪ 5 g de ampicilina▪ 50 mL de agua MQ

Tabla 4. Medios de cultivo bacteriano

4.2. Bioproducción

El proceso de bioproducción de ELRs a escala de laboratorio se lleva a cabo mediante las siguientes etapas:

- 1) Sembrado de la placa, desde el glicerol stock
- 2) Screening: selección de la colonia de la placa con mayor producción
- 3) Preparación del cultivo: preinóculo, subcultivo e inóculo
- 4) Producción en flask o en fermentador
- 5) Lavado de células
- 6) Ruptura celular
- 7) Purificación del polímero
- 8) Diálisis
- 9) Filtración
- 10) Liofilización

La sexta y la séptima etapa, donde se llevan a cabo la lisis bacteriana y purificación del polímero (producto biotecnológico), constituyen una parte crítica del proceso de producción. Las operaciones de separación constituyen una parte importante del coste del producto y, en algunos casos, abarcan el coste principal.

4.2.1. Sembrado de la placa bacteriana

La placa Petri se prepara previamente con LB-Agar junto con un antibiótico frente al cual la bacteria presenta resistencia, siendo en este caso la ampicilina, en una relación de 1:1000.

Es imprescindible trabajar en todo momento en condiciones estériles, dentro de la campana de flujo laminar. Se toma, mediante un asa de siembra previamente esterilizada, una pequeña cantidad de suspensión celular contenida en el recipiente del plásmido, guardada a -80°C , y se extiende por una tercera parte de la superficie de la placa, realizando una serie de estrías paralelas no superpuestas. Se continúa efectuando una serie de estrías en dirección perpendicular a la anterior, empezando en la zona donde termina la última estría. Este procedimiento se repite varias veces.

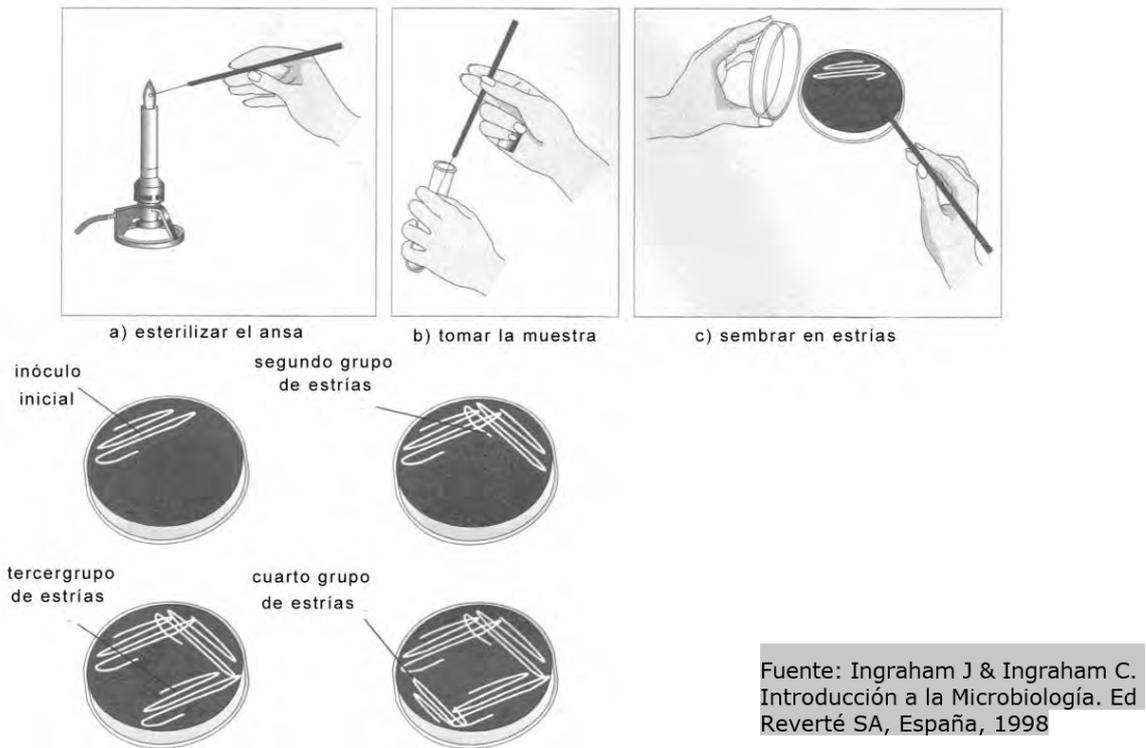


Figura 17. Procedimiento de siembra de placa bacteriana [15]

Una vez finalizado, la placa se envuelve en papel de aluminio y se deja incubar durante la noche (O/N). De esta manera, la bacteria se reproduce y se divide en múltiples copias del plásmido introducido, quedando agrupadas en colonias.

4.2.2. Screening

Este procedimiento permite comprobar cuáles son las colonias más productoras de la placa ya sembrada.

Pasado el tiempo de incubación, se seleccionan 8 colonias de la placa que estén aisladas y sin satélites alrededor. A continuación, se preparan 8 cultivos en tubos Falcon, añadiendo 5 mL de medio TB y 5 μ L de ampicilina (relación 1:1000), junto con un palillo estéril con el que se ha pinchado cada una de las colonias seleccionadas. Finalmente, se dejan creciendo O/N en el incubador, a una temperatura de 37°C y con agitación a 250 rpm.

Al día siguiente, mediante la realización de una electroforesis, se comprueba cuál es la colonia más productora.

4.2.3. Crecimiento de la bacteria: preparación del preinóculo, subcultivo e inóculo

Preinóculo

Se selecciona una de las colonias con mayor producción de la placa preparada previamente y se inocula en 5 mL de LB con antibiótico al 1% (5 µL de ampicilina) y glucosa 20% estéril al 1% (250 µL de glucosa) en un falcon de 50 mL. Se deja incubando a 37°C en agitación a 250 rpm entre 16 y 18 horas.

Los cálculos de las cantidades de glucosa y de antibiótico, tanto en esta etapa como en las posteriores, se han realizado mediante la ecuación de dilución:

$$C \cdot V = C' \cdot V' \quad (\text{Ec. 1})$$

Subcultivo

Se preparan 30 mL de LB con antibiótico y glucosa al 1% (30 µL y 1,5 mL, respectivamente) junto con 1 mL de la suspensión celular del preinóculo, en un Erlenmeyer de 250 mL previamente esterilizado. Se introduce al incubador para que permanezca entre 5 y 6 horas a 37°C y en agitación a 250 rpm.

Inóculo

En este trabajo, el cultivo se ha realizado directamente en Flask. Por ello, una vez finalizado el paso anterior, se inocula en una relación 1:500 en TB con antibiótico en cada Flask: 1 mL de subcultivo por cada 500 mL de medio TB y 500 µL de ampicilina. El inóculo se deja creciendo en el incubador a 37°C y 250 rpm, mínimo durante 16 horas.

4.2.4. Medición de absorbancia

Una vez pasado el tiempo de incubación del inóculo, se toman muestras para medir su densidad óptica (absorbancia) en el espectrofotómetro y, de esta manera, comprobar que el cultivo ha alcanzado el máximo crecimiento. Además, es conveniente realizar electroforesis SDS-PAGE, para comprobar la presencia de polímero.

Para medir la absorbancia, se toman dos cubetas de 1 mL, uno para el blanco y otro para la muestra. El blanco es el medio, el sobrenadante que se obtiene tras centrifugar durante 45 segundos a 13400 rpm. Se cubre la parte superior de las cubetas con papel parafilm y se homogeneizan, antes de realizar la medición en el espectrofotómetro.

El valor de la absorbancia debe estar comprendido entre 0 y 1. En el caso de obtener un valor superior a la unidad, se diluyen la muestra y el blanco en agua MQ y se repite la medición. Si el siguiente valor obtenido es inferior a 1, la medida real de absorbancia resultará de multiplicar ese valor por el factor de dilución.

La absorbancia se mide dos veces: la primera en el momento en el que termina la incubación O/N, y la segunda 30 o 60 minutos después, comprobando que ambos valores de absorbancia son idénticos o similares, lo cual indicaría que el cultivo se encuentra en la fase de crecimiento estacionario. Si las mediciones son correctas, el cultivo se puede recoger y se junta el contenido de todos los Flask, realizando posteriormente una última medición definitiva.

4.2.5. Lavado de células

Tras finalizar el inóculo y comprobar la fase estacionaria de crecimiento midiendo la densidad óptica, la masa celular se recoge y se somete a un proceso de lavado.

Se trasvasa el contenido del Flask a unos botes. Después de compensarlos, es decir, comprobar que contienen la misma cantidad, se introducen en la centrífuga Sorvall a 4°C y a 4500 rpm durante 15 minutos. Al finalizar, se decanta el sobrenadante y se resuspende en tampón de lavado frío, rascando el precipitado de bacteria sólida de las paredes de los botes con ayuda de unas espátulas y agitando para lograr una buena mezcla. Estos pasos se repiten hasta que el sobrenadante obtenido tras centrifugar sea transparente.

Finalmente, se retira el sobrenadante claro y se resuspende en tampón de sonicación frío, según la relación:

$$V_{TS} [mL] = V_{cultivo (TB)} [L] \cdot A600 \cdot 5 \quad (Ec. 2)$$

Inmediatamente, antes de continuar con la lisis celular, se añaden los inhibidores de proteasas pertinentes, en función del polímero, para evitar la ruptura del polímero en puntos específicos por las proteasas endógenas liberadas tras la ruptura.

4.2.6. Lisis bacteriana

Esta etapa constituye el núcleo de este trabajo de fin de grado. La ruptura es el método de ruptura celular más empleado en las instalaciones de BIOFORGE. No obstante, se quiere comprobar si la técnica de ciclos sucesivos de congelación-descongelación resulta más viable en términos económicos y de rendimiento.

4.2.6.1. *Disrupción*

El disruptor ha de encenderse previamente para ponerlo en frío y lavarse con tampón de lavado frío, hasta lograr que el líquido de salida sea transparente.

Posteriormente, se hacen pasar las células ya lavadas y suspendidas en tampón de sonicación a través de la tolva, se enciende el disruptor y se abre la válvula, que genera un aumento rápido de presión hasta 1,4 bar aproximadamente, lo cual permite extraer las proteínas de la membrana celular. Previamente, se añade una pequeña cantidad de isopropanol para eliminar espumas. Cuando la tolva esté a punto de vaciarse completamente, se baja bruscamente la presión cerrando la válvula, se para el equipo y se espera a que evacúe toda la suspensión celular. Después, se vuelve a verter en la tolva y a repetir el mismo procedimiento hasta 5 veces.

Finalmente, se lava el disruptor con tampón de sonicación para arrastrar toda la cantidad posible de polímero.

4.2.6.2. *Congelación-Descongelación ("freeze-thaw")*

Se toma la bacteria sólida, precipitada después de la última centrifuga en frío de la etapa de lavado, y se resuspende en agua MQ, lo que provoca que las bacterias se hinchen. A continuación, se someten a congelación a -20°C y, seguidamente, a descongelación a temperatura ambiente, lo cual irá provocando fracturas en la membrana celular, liberando así el polímero de interés, tras la repetición de varios ciclos.

4.2.7. **Purificación del polímero**

Cada polímero consta de un protocolo de purificación específico, en el cual se suceden varias operaciones de calentamiento y enfriamiento, hasta obtener su máximo grado de pureza. Se van tomando muestras en Eppendorf para poder realizar electroforesis que comprueben la presencia del polímero de interés en cada etapa correspondiente.

En ciertos puntos, se añade cloruro de sodio para lograr que, a altas concentraciones salinas, el polímero precipite mejor. La cantidad de NaCl a adicionar se calcula en función de su peso molecular (58,44 g/mol) y su concentración (1M):

$$M = \frac{n}{V} \quad (\text{Ec. 3})$$

$$n = \frac{m}{Pm} \quad (\text{Ec. 4})$$

Combinando ambas ecuaciones, se tiene:

$$1 \frac{\text{mol}}{L} = \frac{\frac{m}{58,44 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}}{V} \rightarrow m$$

En este trabajo, se ha realizado la purificación del polímero OE50I60:

OE50I60

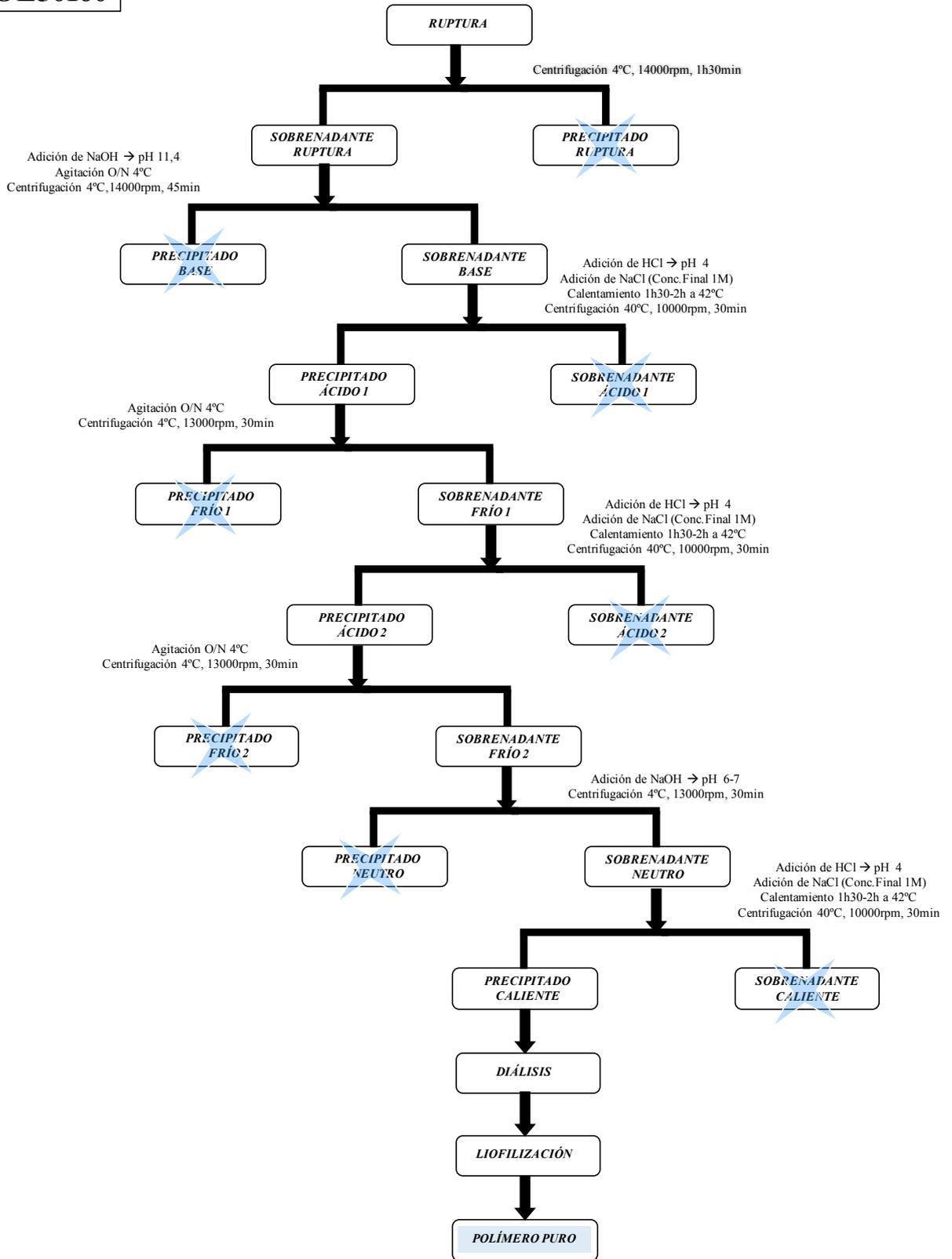


Figura 18. Protocolo de purificación del polímero OE50I60 [imagen tomada de protocolo del grupo de investigación BIOFORGE]

4.2.8. Diálisis

Esta operación se lleva a cabo en la cámara fría y utilizando guantes limpios para evitar posibles contaminaciones. La diálisis es una forma de filtración molecular, separándolas de acuerdo a su tamaño, mediante la utilización de membranas semipermeables (tripas) que contienen microporos.

Se toma la tripa de diálisis, se corta con la longitud adecuada respecto al volumen del polímero purificado y se ata por uno de sus extremos. Es indispensable comprobar que la porción cortada se encuentra en buen estado, sin agujeros, rellenándola primero con agua MQ.

A continuación, se introduce la suspensión por el extremo abierto y se ata, dejando un espacio con aire que le permita flotar en un bidón de 25 L de agua destilada o agua MQ, donde se deposita la tripa, dejándose en agitación con un imán durante varias horas.

Durante este tiempo, las sales atraviesan la membrana y pasan al agua hasta alcanzar el equilibrio, mientras que al polímero se le bloquea el paso, permaneciendo dentro de la tripa. Se debe cambiar el agua de diálisis hasta 4 veces para lograr nuevamente el equilibrio.

4.2.9. Filtración y Liofilización

Finalizada la diálisis, se lleva a cabo la filtración de la muestra. El filtro, que ha de estar frío, habiéndolo dejado previamente en la cámara a 4°C, se conecta mediante un tubo a una bomba de vacío, la cual se enciende una vez se ha vertido el volumen contenido en la tripa de diálisis.

Tras terminar la filtración, se retira el tubo y se desconecta la bomba. La muestra obtenida se lleva al liofilizador y se deja aproximadamente una semana, hasta obtener el polímero seco.

4.3. Caracterización mediante electroforesis con gel de poliacrilamida y SDS (SDS-Page)

Durante todas las etapas de producción y purificación del polímero, éste debe caracterizarse mediante técnicas como la electroforesis, que permitan comprobar su nivel de crecimiento/degradación o analizar su peso molecular.

El peso molecular de una proteína se mide en kilodalton y puede ser determinado comparando la banda con un marcador de peso molecular, es decir, un patrón de proteínas estándar de peso conocido. Algunas proteínas suelen migrar anómalamente y aparecen con un peso mayor del esperado, debido a que presentan modificaciones en su estructura, las cuales podrían retardar el desplazamiento de las demás muestras.

La desnaturalización de las proteínas, generalmente por causa de un agente químico catalizador, como las proteasas, suele dejar manchas difusas en todo el frente de corrida y, a veces suelen confundirse con proteínas de menor peso molecular:

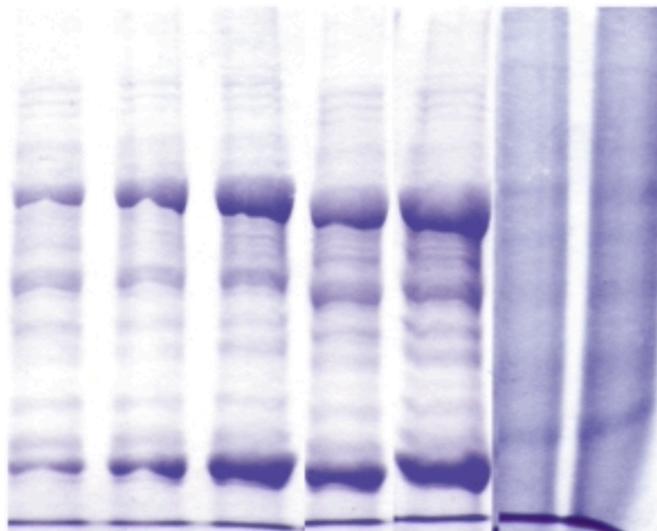


Figura 19. Ejemplo de impresión de foto de SDS-Page [25]

4.3.1. Ensamblaje de los vidrios

Se ensamblan los vidrios mediante dos separadores y se introducen en un formador. Es importante comprobar que el montaje es correcto; para ello, se introduce agua destilada para detectar posibles fugas. En caso de haberlas, se deberá reanudar el ensamblaje.

4.3.2. Preparación del gel de resolución (*resolving gel*)

Consiste en una matriz de poliacrilamida, donde las proteínas se desplazan generando un perfil de bandas, que varía en función del peso molecular de cada una de las moléculas.

Se prepara en un tubo Falcon con la composición que se muestra en la Tabla 5:

GEL DE RESOLUCIÓN	
12%	
MQ	3,25 mL
TRIS 1,5M pH 8,8	1,88 μ l
Acrilamida 40%	2,25 mL
SDS 10%	75 μ l
PSA	37,5 μ l
TEMED	3,75 μ l

Tabla 5. Preparación del gel de resolución

Los catalizadores PSA y TEMED se adicionan en último lugar, para evitar que gelifique de manera instantánea antes de agregar la solución dentro de la cámara. Otra alternativa sería introducir el Falcon con el gel líquido en un baño de hielo, retardando la polimerización.

Se adiciona el gel con una pipeta Pasteur entre las placas de vidrio hasta la altura del formador y, sobre ella, una ligera capa de butanol para evitar la presencia de burbujas de aire que puedan retardar la gelificación.

Cuando ha finalizado la formación del gel, el butanol se descarta y se lava la parte superior del gel con agua destilada mínimo tres veces, para asegurar la completa eliminación de restos de butanol y de acrilamida no polimerizada.

4.3.3. Preparación del gel de empacamiento (*stacking gel*)

Consiste en una matriz de poliacrilamida que retiene las proteínas, manteniéndolas uniformes antes de migrar hacia el gel de resolución antes de comenzar la electroforesis.

Se prepara en un tubo Falcon, con la composición que se muestra en la Tabla 6:

GEL DE EMPACAMIENTO	
4%	
MQ	1,585 mL
TRIS 0,5M pH 6,8	625 µl
Acilamida 40%	250 µl
SDS 10%	18,75 µl
PSA	18,75 µl
TEMED	2,35 µl

Tabla 6. Preparación del gel de empacamiento

4.3.4. Montaje de la cubeta de electroforesis

Finalizada la formación del gel de resolución, el ensamblaje de los vidrios se retira del formador y se traslada a una cubeta negra, colocándolo con su hendidura hacia adentro.

A continuación, se adiciona el gel de empacamiento e inmediatamente se coloca un peine con los pocillos deseados. La gelificación tarda, aproximadamente, entre 15 y 30 minutos.

Una vez formado el gel, la cubeta se introduce dentro de un tanque que contiene buffer de resolución para proteínas 1x. Cuando se ha asegurado que esta solución cubre los pocillos totalmente, se retira el peine cuidadosamente.

4.3.5. Puesta en marcha de la electroforesis

Mediante el uso de micropipetas, se deposita cada muestra en su pocillo correspondiente. Finalizada la colocación, se cubre el tanque con una tapa y se conectan los cables correspondientes de los electrodos a la fuente de energía.

Posteriormente, se inicia la electroforesis en las siguientes condiciones:

- ❖ Voltaje: 300 V. El valor óptimo dependerá de la naturaleza de la proteína.

- ❖ Amperaje: 25 mA (un gel) o 50 mA (dos geles). El valor óptimo dependerá de la fuerza iónica del buffer.
- ❖ Duración: 1h 15 min aproximadamente. El frente de corrida, visualizado como una línea azul por el colorante del buffer, debe llegar a los límites de la parte inferior del gel de resolución.

Una vez terminada la electroforesis, se apaga la fuente de energía y se procede a desmontar el equipo. El buffer puede volcarse en el tanque y utilizarse de nuevo. Se procede a remover el gel cuidadosamente, levantando uno de los espaciadores de tal manera que se vayan separando los vidrios que contienen el gel. Éste se trasvasa a un recipiente conteniendo un colorante azul para su tinción, mientras que el gel *stacking* se puede desechar.

El formador, la cubeta, los espaciadores y los vidrios se lavan con abundante agua y jabón y se aclaran con agua destilada, dejando que se sequen a temperatura ambiente.

4.3.6. Coloración y visualización de las proteínas

El proceso de tinción o se basa en la atracción electrostática del enlace peptídico de las proteínas sobre grupos de ácido sulfónico, encargados de que la proteína se vuelva de color azul.

El gel de resolución se coloca en un recipiente con cloruro de cobre y se deja en rotación suave aproximadamente 20 minutos. El tiempo de coloración dependerá de la concentración del gel y de la sensibilidad del colorante, en función del tiempo que lleva elaborado. Se debe evitar que la coloración del gel se alargue demasiado, ya que se podría generar un fondo oscuro por sobretinción que impida visualizar correctamente las proteínas.

Finalizada la tinción, el colorante se retorna a su frasco original y el gel teñido se deja a remojo en agua destilada y en rotación suave durante unos 30 minutos. Pasado el tiempo, el gel se lava para quitar posibles sales de cobre adheridas a su superficie y se procede a hacer una foto con el software "Image Lab", que permita visualizar las distintas bandas azules con sus correspondientes pesos moleculares.

5. Resultados y discusión

5.1. Número de ciclos de ruptura por congelación-descongelación

Se buscó comprobar la efectividad de los ciclos de congelación-descongelación en base a distintas variables. Se comenzó trabajando con polímeros que estaban ya en fase de producción, siendo el punto de partida la bacteria ya lavada y lista para el proceso de ruptura.

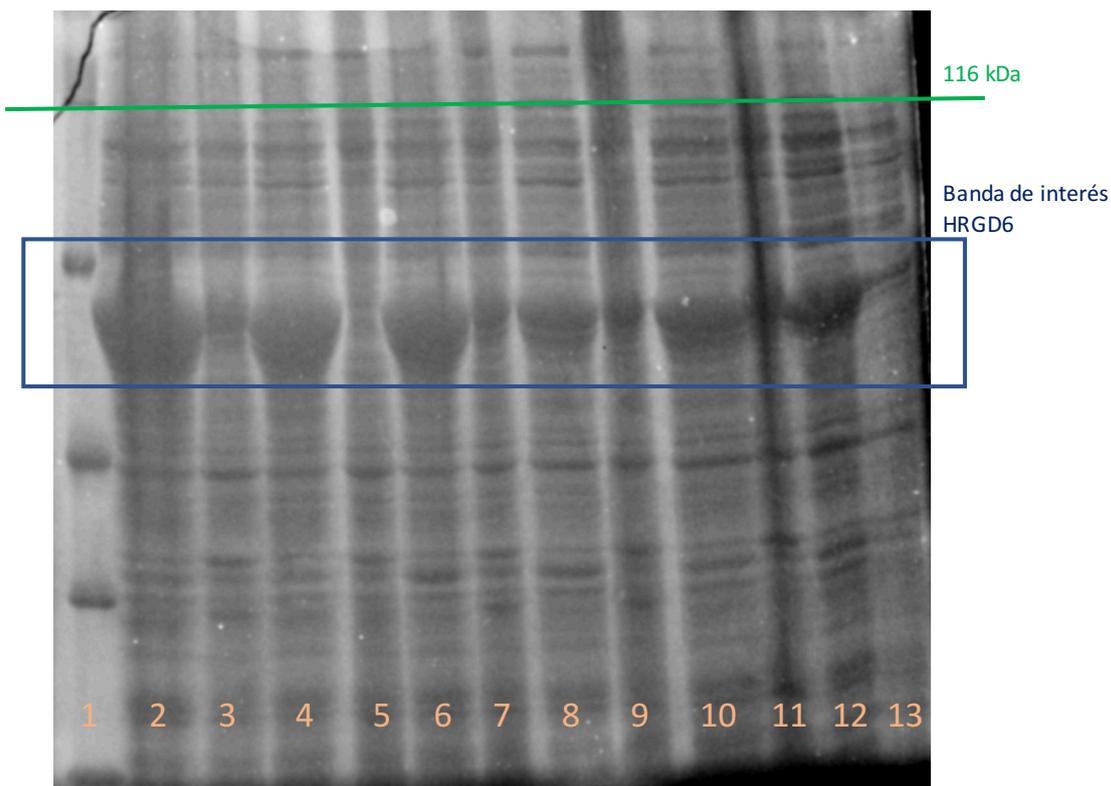


Figura 20. Impresión de SDS Page representando la evolución de ciclos de ruptura por congelación-descongelación del polímero HRGD6, con las siguientes calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Muestra 1, sobrenadante, ciclo 1; 3) Muestra 1, precipitado, ciclo 1; 4) Muestra 1, sobrenadante, ciclo 2; 5) Muestra 1, precipitado, ciclo 2; 6) Muestra 1, sobrenadante, ciclo 3; 7) Muestra 1, precipitado, ciclo 3; 8) Muestra 2, sobrenadante, ciclo 1; 9) Muestra 2, precipitado, ciclo 1; 10) Muestra 2, sobrenadante, ciclo 2; 11) Muestra 2, precipitado, ciclo 2; 12) Muestra 2, sobrenadante, ciclo 3; 13) Muestra 2, precipitado, ciclo 3.

En esta primera electroforesis (Figura 20) se analiza la evolución de ciclos del polímero HRGD6.

Se trabajó con dos muestras diluidas a distintos volúmenes. La primera se diluyó con 10 mL de agua ultrapura “MQ”, mientras que la segunda empleó el doble de cantidad: 20 mL. Ambas permanecieron durante 1h reposando en MQ para lograr que las bacterias se hinchen, y se metieron posteriormente al congelador a -20°C.

Como las centrífugas son llevadas a cabo en frío, el polímero debe quedarse en el sobrenadante.

Respecto a la muestra 1, se observa que en el segundo ciclo casi la totalidad del polímero permanece en el sobrenadante; sin embargo, el precipitado del ciclo 3 contiene más polímero que el del ciclo anterior, lo que podría deberse a un error humano a la hora de depositar las muestras en el gel de electroforesis o una incorrecta separación del sobrenadante y el precipitado tras la centrifugación.

En la segunda muestra, sí que se aprecia una disminución progresiva de la cantidad de polímero en el precipitado. Además, el aumento de volumen de dilución ha permitido mejorar la homogeneización de los precipitados a la hora de preparar las muestras de electroforesis.

Con la siguiente electroforesis (Figura 21), correspondiente al polímero VKV4x24, se buscó continuar comprobando que la bacteria rompía alrededor del segundo o tercer ciclo, contribuyendo a ello un mayor volumen de dilución en MQ.

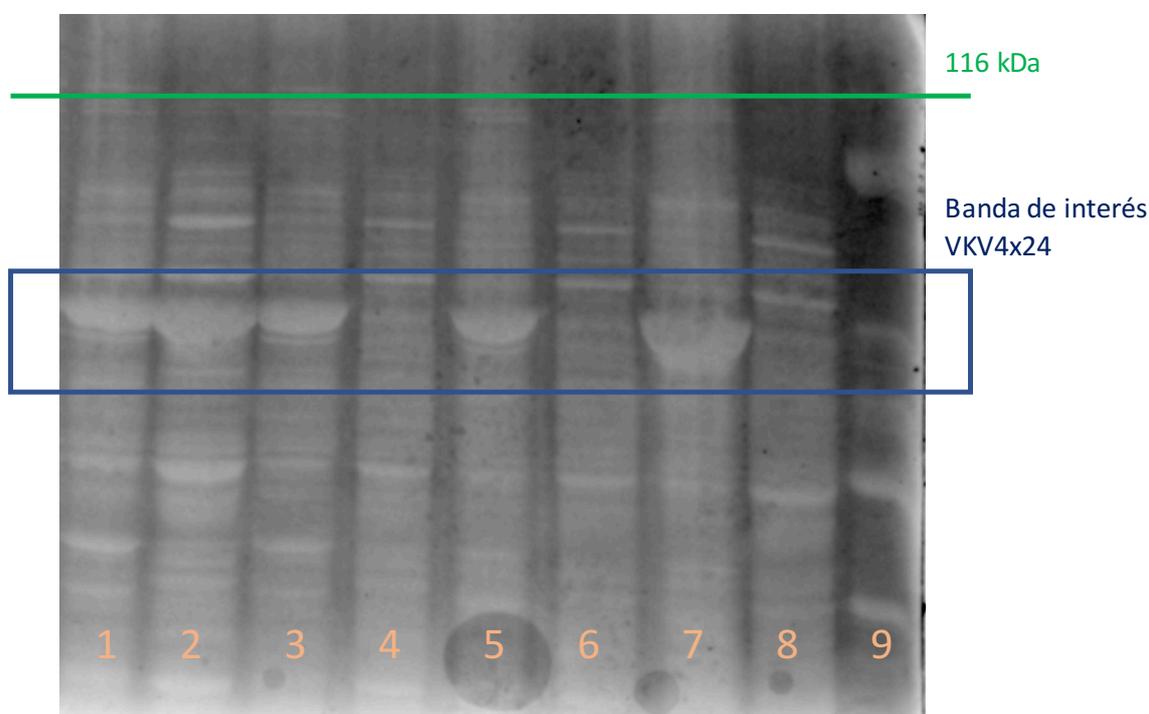


Figura 21. Impresión de SDS Page representando la evolución de ciclos de ruptura por congelación-descongelación del polímero VK4x24, con las siguientes calles: 1) Muestra 1, sobrenadante, ciclo 1; 2) Muestra 1, precipitado, ciclo 1; 3) Muestra 1, sobrenadante, ciclo 2; 4) Muestra 1, precipitado, ciclo 2; 5) Muestra 1, sobrenadante, ciclo 3; 6) Muestra 1, precipitado, ciclo 3; 7) Muestra 1, sobrenadante, ciclo 4; 8) Muestra 1, precipitado, ciclo 4; 9) Marcador de pesos moleculares.

Esta muestra se diluyó en un volumen aún mayor, con 30 mL de MQ. También se dejó en reposo en MQ durante 1h, congelándose posteriormente a -20°C . Se comprobó que a partir del segundo ciclo desaparece el precipitado, aumentando la cantidad de polímero en el sobrenadante con cada etapa.

5.2. Influencia del calentamiento previo y del reposo en MQ

Después de concluir que se necesitaba entre 2 y 4 ciclos para lograr la ruptura de la bacteria, se decidió trabajar con un único polímero: OE50I60, un polímero que apenas se había producido en el grupo BIOFORGE y cuya estructura permite una mejor observación de sus bandas de peso molecular en la electroforesis.

Aquí ya se empezó a realizar el proceso de bioproducción desde el principio, desde la siembra de la placa bacteriana hasta la ruptura de las células.

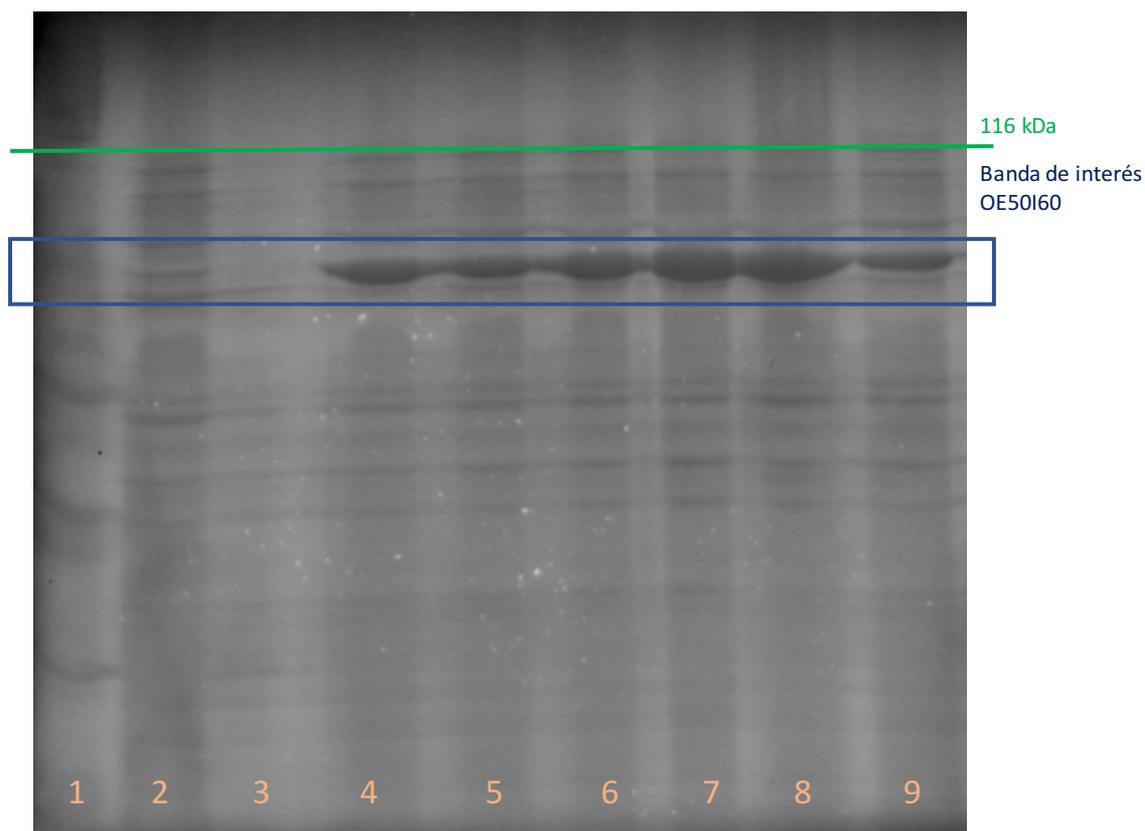


Figura 22. Impresión de SDS Page representando el screening de una producción de polímero OE50I60, donde la primera calle representa el marcador de proteínas, mientras que las siguientes 8 calles representan cada una de las colonias aisladas seleccionadas.

En la Figura 22, se visualizan 8 colonias seleccionadas para el screening más el marcador de proteínas, situado en la primera calle. Se tomó la sexta colonia (calle 7) como la más productora.

Se buscó comprobar si podía repercutir en la lisis bacteriana no dejar previamente las células en agua MQ en reposo, o bien aplicar un calentamiento previo antes de la congelación.

Se plantearon tres vías de estudio:

- Reposo en agua MQ 1h + Congelación a -20°C (realizada con los anteriores polímeros)
- Congelación directa a -20°C

c) Calentamiento previo a 80°C + Congelación a -20°C

Sin embargo, durante la congelación a -20°C, el equipo sufrió una avería y las muestras tuvieron que ser trasladadas a frigoríficos a -80°C. Con esto, se pudo comprobar que, a temperaturas mucho más bajas, la ruptura se produce desde el primer ciclo, independientemente de las condiciones en las que se trabaje.

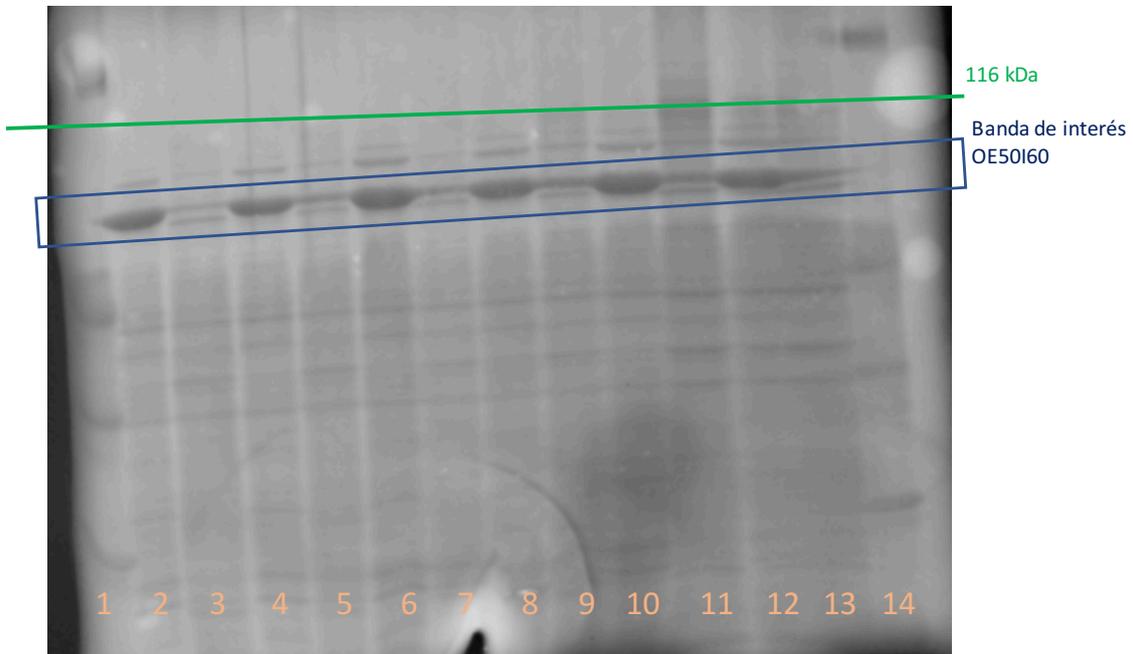


Figura 23. Impresión de SDS Page representando la evolución de ciclos de ruptura por congelación-descongelación del polímero OE50I60, tras haber permanecido la bacteria en reposo durante 1h en agua MQ y posteriormente congelarse a -80°C. Se tienen las siguientes calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Sobrenadante, ciclo 1; 3) Precipitado, ciclo 1; 4) Sobrenadante, ciclo 2; 5) Precipitado, ciclo 2; 6) Sobrenadante, ciclo 3; 7) Precipitado, ciclo 3; 8) Sobrenadante, ciclo 4; 9) Precipitado, ciclo 4; 10) Sobrenadante, ciclo 5; 11) Precipitado, ciclo 5; 12) Sobrenadante, ciclo 6; 13) Precipitado, ciclo 6; 14) Marcador de pesos moleculares.

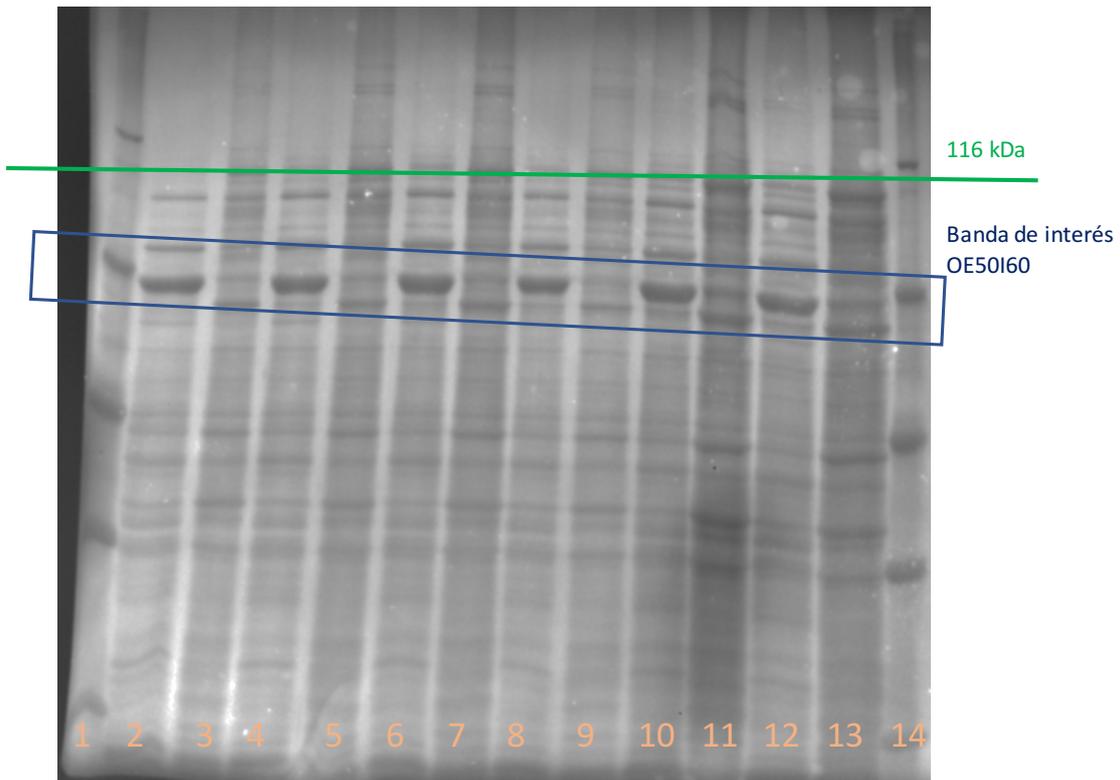


Figura 24. Impresión de SDS Page representando la evolución de ciclos de ruptura por congelación-descongelación del polímero OE50I60, tras haber sometido la bacteria directamente a congelación a -80°C . Se tienen las siguientes calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Sobrenadante, ciclo 1; 3) Precipitado, ciclo 1; 4) Sobrenadante, ciclo 2; 5) Precipitado, ciclo 2; 6) Sobrenadante, ciclo 3; 7) Precipitado, ciclo 3; 8) Sobrenadante, ciclo 4; 9) Precipitado, ciclo 4; 10) Sobrenadante, ciclo 5; 11) Precipitado, ciclo 5; 12) Sobrenadante, ciclo 6; 13) Precipitado, ciclo 6; 14) Marcador de pesos moleculares.

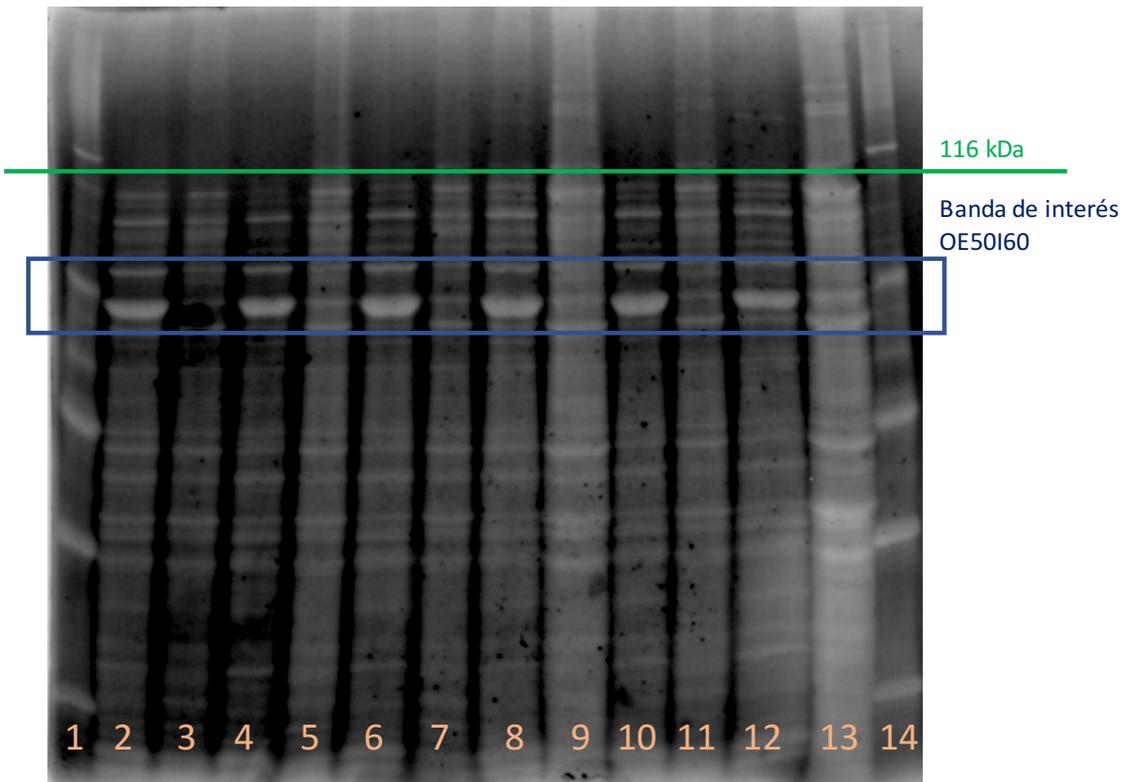


Figura 25. Impresión de SDS Page representando la evolución de ciclos de ruptura por congelación-descongelación del polímero OE50I60, tras haber sometido la bacteria a un calentamiento a +80°C y posteriormente congelarse a -80°C. Se tienen las siguientes calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Sobrenadante, ciclo 1; 3) Precipitado, ciclo 1; 4) Sobrenadante, ciclo 2; 5) Precipitado, ciclo 2; 6) Sobrenadante, ciclo 3; 7) Precipitado, ciclo 3; 8) Sobrenadante, ciclo 4; 9) Precipitado, ciclo 4; 10) Sobrenadante, ciclo 5; 11) Precipitado, ciclo 5; 12) Sobrenadante, ciclo 6; 13) Precipitado, ciclo 6; 14) Marcador de pesos moleculares.

No obstante, conviene señalar que un cambio de temperaturas tan agresivo podría degradar el polímero.

Se volvió a repetir el proceso de producción y se realizan los mismos experimentos, esta vez pudiendo emplear el congelador a -20°C.

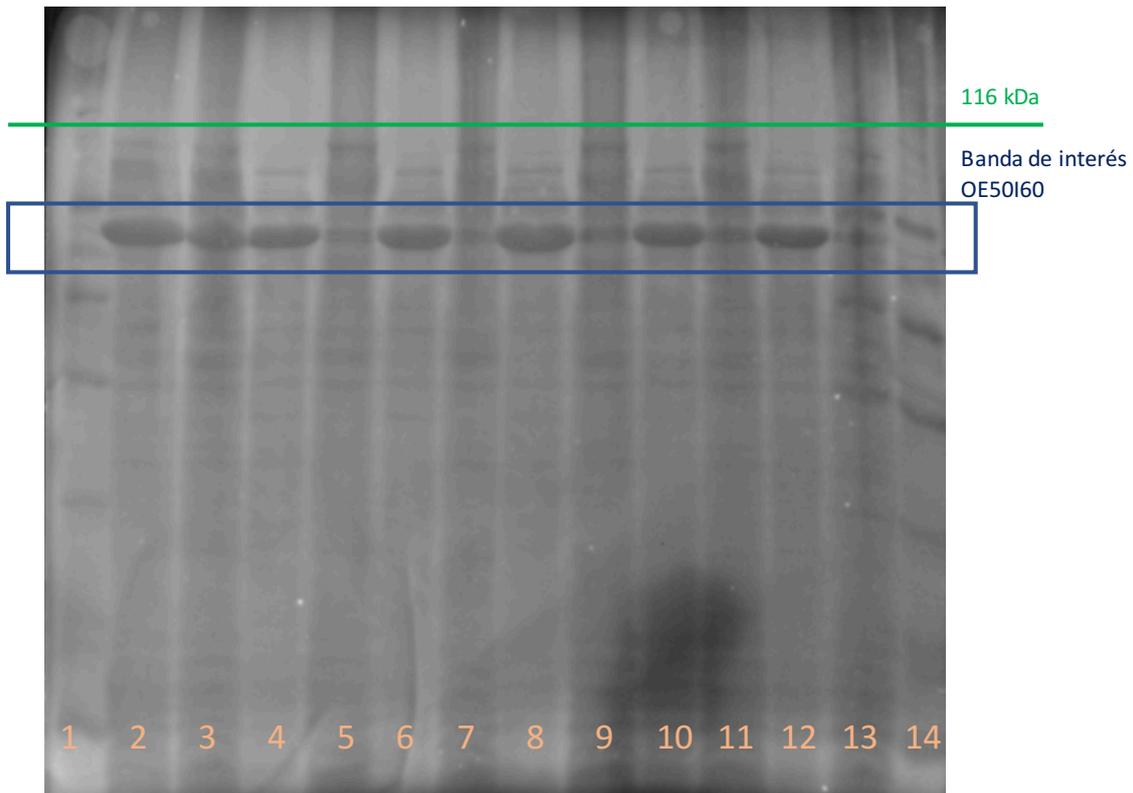


Figura 26. Impresión de SDS Page representando la evolución de ciclos de ruptura por congelación-descongelación del polímero OE50I60, tras haber permanecido la bacteria en reposo durante 1h en agua MQ y posteriormente congelarse a -20°C . Se tienen las siguientes calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Sobrenadante, ciclo 1; 3) Precipitado, ciclo 1; 4) Sobrenadante, ciclo 2; 5) Precipitado, ciclo 2; 6) Sobrenadante, ciclo 3; 7) Precipitado, ciclo 3; 8) Sobrenadante, ciclo 4; 9) Precipitado, ciclo 4; 10) Sobrenadante, ciclo 5; 11) Precipitado, ciclo 5; 12) Sobrenadante, ciclo 6; 13) Precipitado, ciclo 6; 14) Marcador de pesos moleculares.

Al igual que con el HRGD6 y el VKV4x24, la ruptura de las bacterias tiene lugar a partir del tercer ciclo.

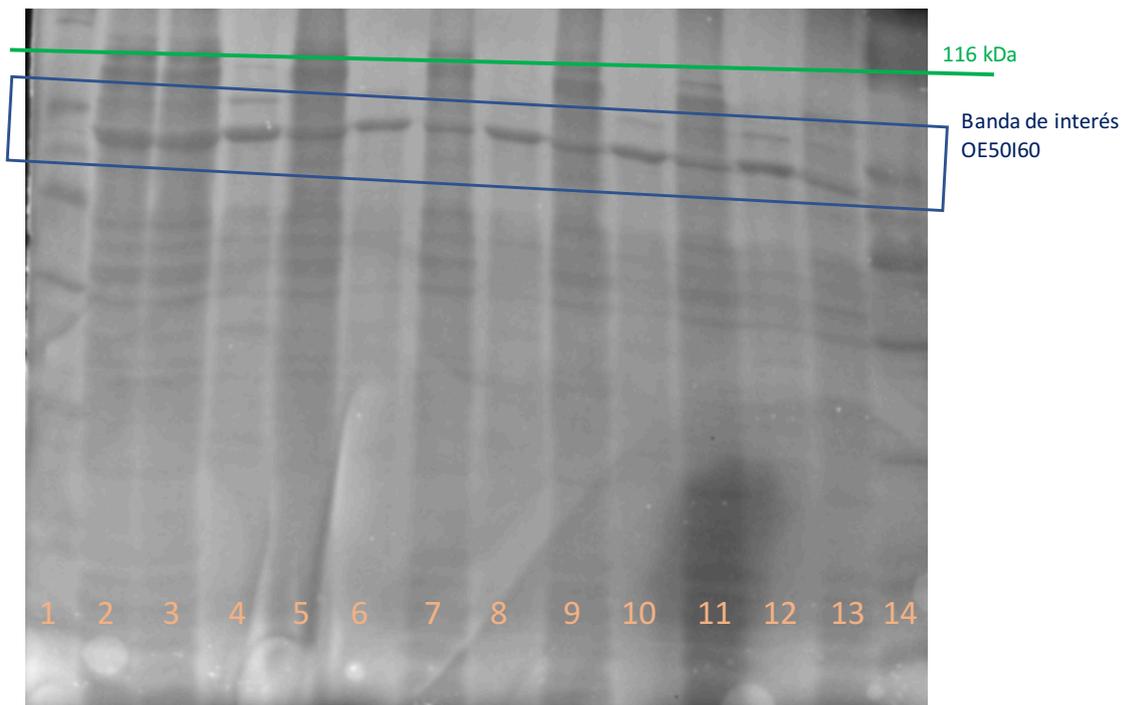


Figura 27. Impresión de SDS Page representando la evolución de ciclos de ruptura por congelación-descongelación del polímero OE50I60, tras haber sometido la bacteria directamente a congelación a -20°C . Se tienen las siguientes calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Sobrenadante, ciclo 1; 3) Precipitado, ciclo 1; 4) Sobrenadante, ciclo 2; 5) Precipitado, ciclo 2; 6) Sobrenadante, ciclo 3; 7) Precipitado, ciclo 3; 8) Sobrenadante, ciclo 4; 9) Precipitado, ciclo 4; 10) Sobrenadante, ciclo 5; 11) Precipitado, ciclo 5; 12) Sobrenadante, ciclo 6; 13) Precipitado, ciclo 6; 14) Marcador de pesos moleculares.

En esta ocasión, la bacteria va desapareciendo del precipitado, pero cada vez más lentamente, llegando al sexto ciclo sin tener todo el polímero en el sobrenadante. Con esto, se comprueba la efectividad de dejar en reposo las bacterias en agua MQ de cara a agilizar el proceso de ruptura.

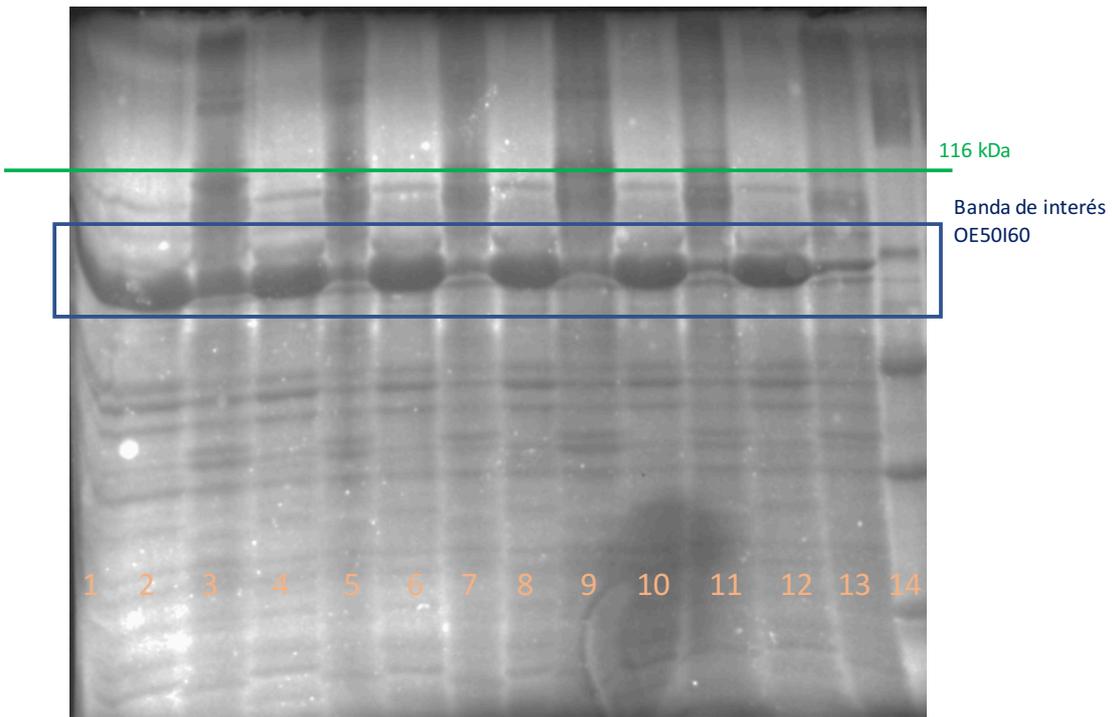


Figura 28. Impresión de SDS Page representando la evolución de ciclos de ruptura por congelación-descongelación del polímero OE50I60, tras haber sometido la bacteria a un calentamiento a +80°C y posteriormente congelarse a -20°C. Se tienen las siguientes calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Sobrenadante, ciclo 1; 3) Precipitado, ciclo 1; 4) Sobrenadante, ciclo 2; 5) Precipitado, ciclo 2; 6) Sobrenadante, ciclo 3; 7) Precipitado, ciclo 3; 8) Sobrenadante, ciclo 4; 9) Precipitado, ciclo 4; 10) Sobrenadante, ciclo 5; 11) Precipitado, ciclo 5; 12) Sobrenadante, ciclo 6; 13) Precipitado, ciclo 6; 14) Marcador de pesos moleculares.

En este tercer experimento (Figura 28), ocurre igual que en el anterior: la bacteria va desapareciendo del precipitado lentamente, llegando al sexto ciclo sin haber finalizado la ruptura, quedando aún restos en el precipitado.

El calentamiento no interviene en los ciclos de lisis bacteriana, sino que únicamente desnaturaliza previamente las proteínas.

5.3. Comparación de rendimientos entre la disrupción y los ciclos *freeze-thaw*

Por último, se propuso comparar la eficacia del método de ruptura por ciclos de congelación-descongelación con el procedimiento empleado en el día a día del laboratorio: el disruptor.

Se llevó a cabo la totalidad del proceso productivo, rompiendo las células por disrupción y congelación simultáneamente, e incluyendo las etapas finales de purificación, diálisis, filtración y liofilización, hasta obtener el polímero final.

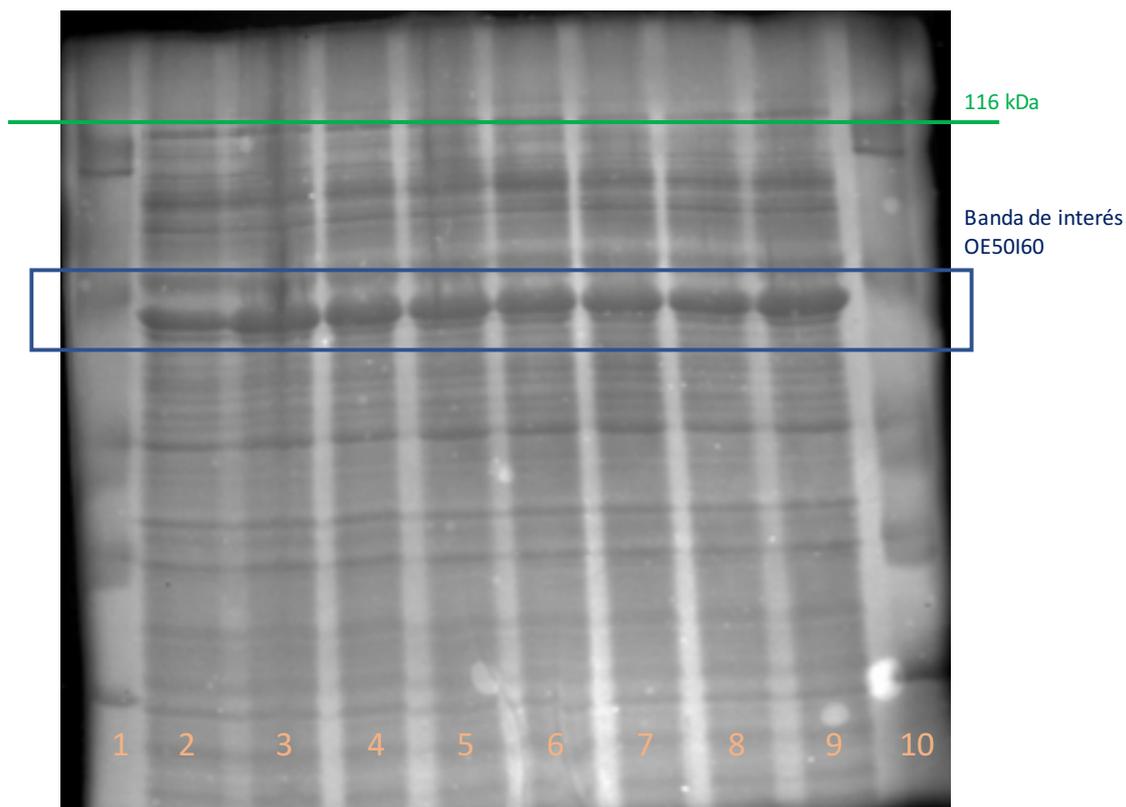


Figura 29. Impresión de SDS Page representando el screening de una producción de polímero OE50I60, donde la primera y la última calle representan el marcador de proteínas, mientras que restantes calles representan cada una de las colonias aisladas seleccionadas.

Exceptuando las colonias 1,7 y 8, las demás presentan una mayor producción. Finalmente, se seleccionó la colonia 3 como la más productora.

La electroforesis resultante de la purificación tras romper mediante disrupción se muestra en la Figura 30:

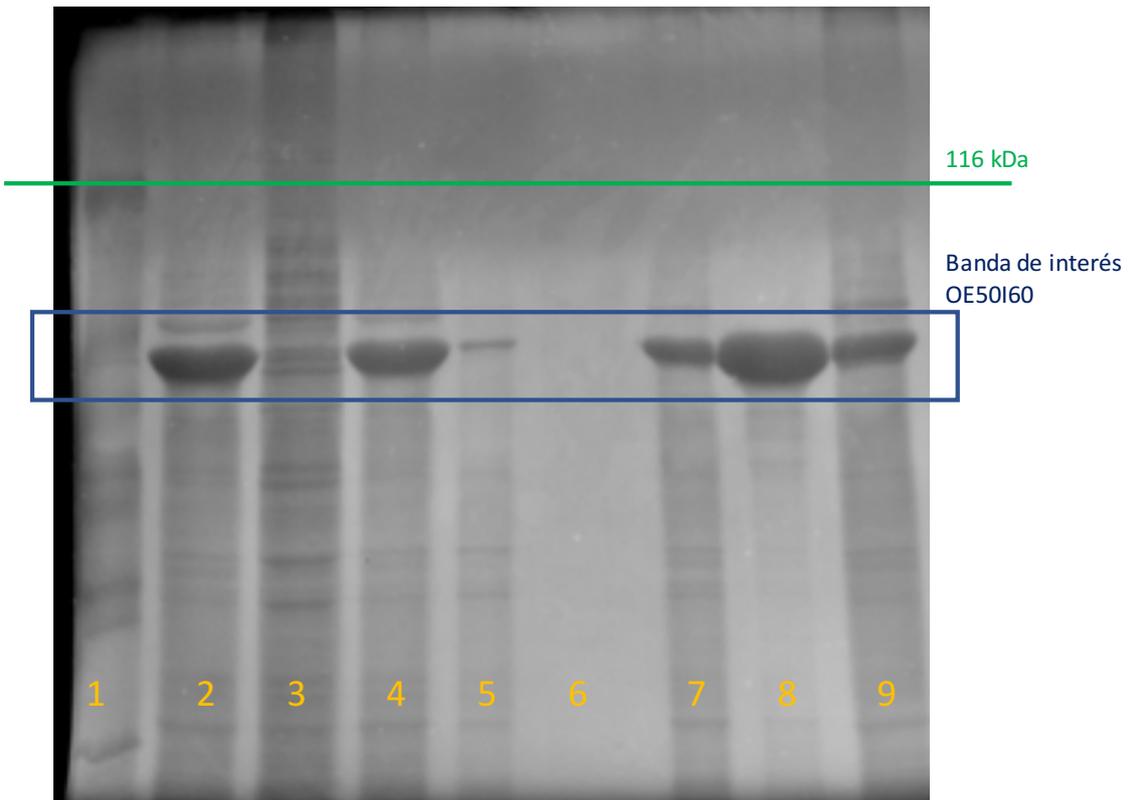


Figura 30. Impresión de SDS Page representando la purificación de una producción de polímero OE50I60 obtenido mediante ruptura por disrupción, con la siguiente representación por calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Sobrenadante de ruptura por disrupción (etapa 1); 3) Precipitado de ruptura por disrupción (etapa 1); 4) Sobrenadante base (etapa 2); 5) Precipitado base (etapa 2); 6) Sobrenadante ácido 1 (etapa 3); 7) Precipitado ácido 1 (etapa 3); 8) Sobrenadante frío 1 (etapa 4); 9) Precipitado frío 1 (etapa 4)

Las tres primeras etapas transcurren correctamente. El disruptor rompe el polímero, que queda en el sobrenadante. Seguidamente, se somete a un enfriamiento (el polímero queda en el sobrenadante base) y a un calentamiento (el polímero queda en el precipitado ácido 1). Sin embargo, tras una centrifuga en frío, en el cuarto paso se produce pérdida de polímero al quedar parte en el precipitado (calle 9). Esto puede deberse a que, tras dejar el precipitado ácido en agitación en la cámara fría el día anterior, éste no haya conseguido diluirse correctamente, ya que quizá el agua ultrapura empleada no estaba lo suficientemente fría.

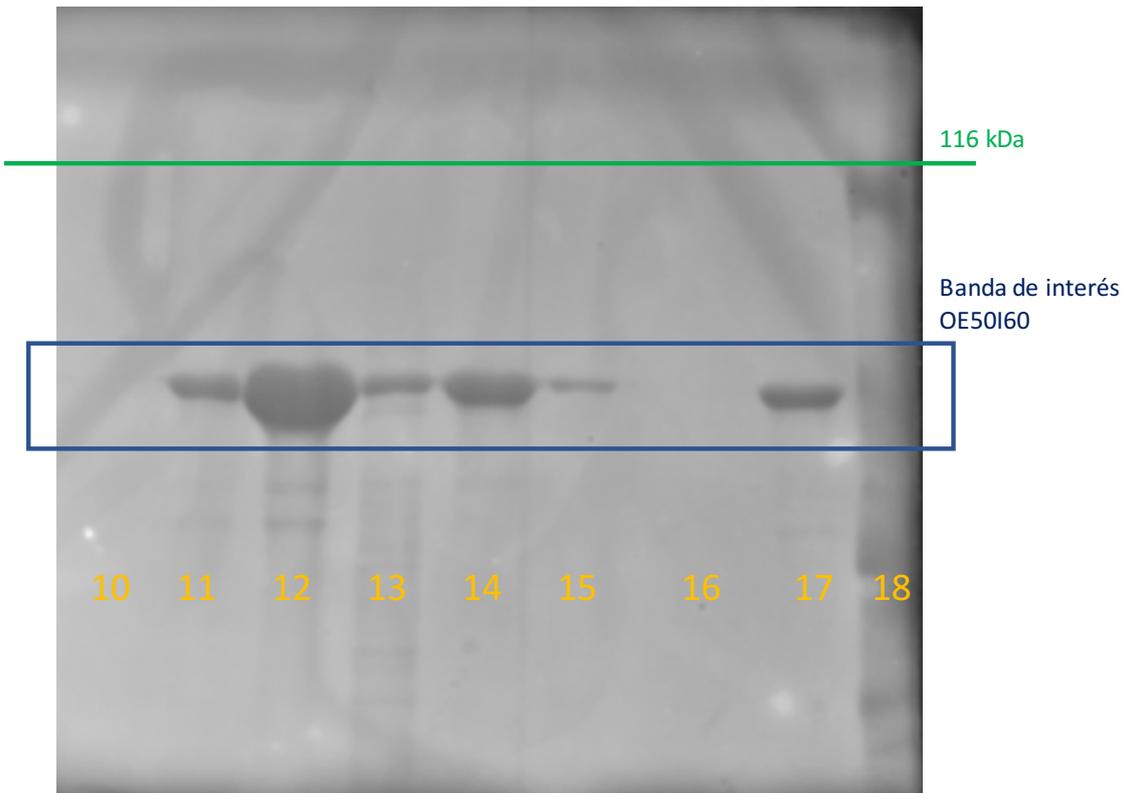


Figura 31. Impresión de SDS Page representando la purificación de una producción de polímero OE50I60 obtenido mediante ruptura por disrupción, con la siguiente representación por calles: 10) Sobrenadante ácido 2 (etapa 5); 11) Precipitado ácido 2 (etapa 5); 12) Sobrenadante frío 2 (etapa 6); 13) Precipitado frío 2 (etapa 6); 14) Sobrenadante neutro (etapa 7); 15) Precipitado neutro (etapa 7); 16) Sobrenadante caliente (etapa 8); 17) Precipitado caliente (etapa 8); 18) Marcador de pesos moleculares

En estas últimas etapas, vuelve a repetirse la misma situación de pérdidas de polímero tras los enfriamientos. Es apreciable cómo se ha reducido considerablemente (calle 17) respecto a los volúmenes iniciales (calle 12)

De manera análoga, la electroforesis resultante de la purificación tras romper mediante congelación-descongelación se muestra en la Figura 32:

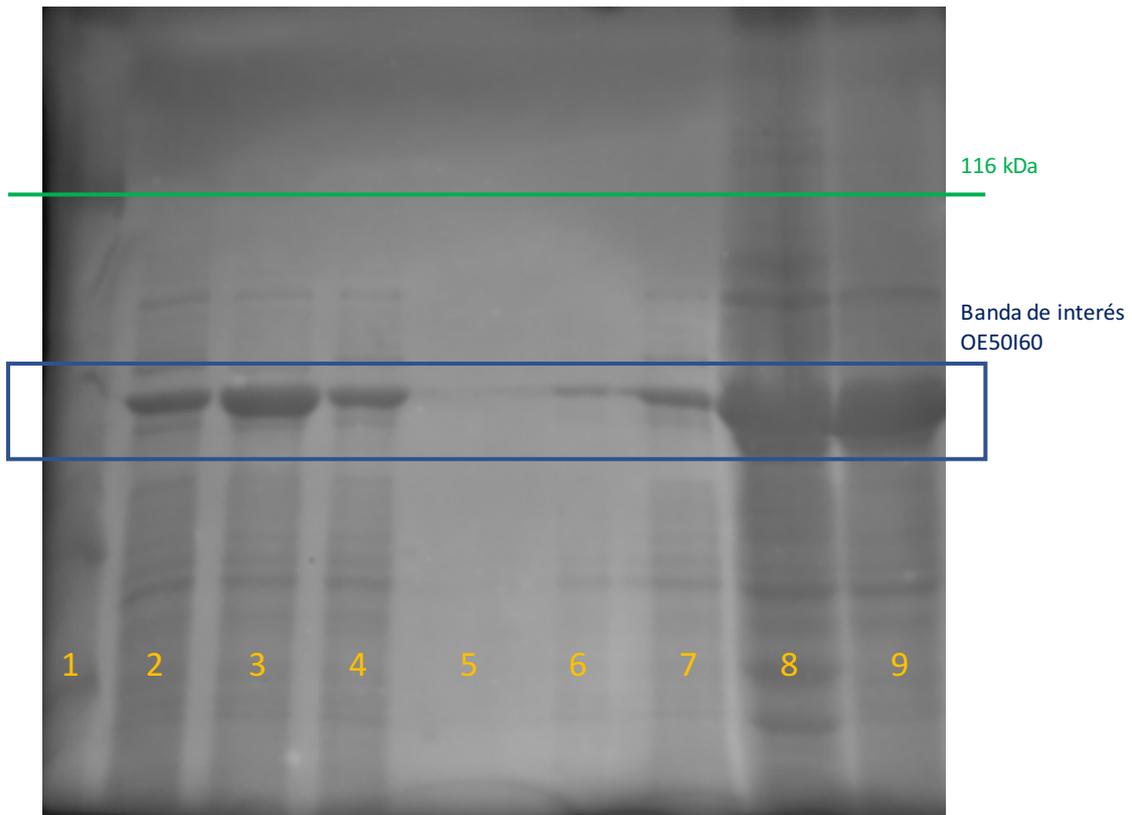


Figura 32. Impresión de SDS Page representando la purificación de una producción de polímero OE50I60 obtenido mediante ruptura por ciclos de congelación-descongelación, con la siguiente representación por calles: 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Sobrenadante de ruptura por congelación-descongelación (etapa 1); 3) Precipitado de ruptura por congelación-descongelación (etapa 1); 4) Sobrenadante base (etapa 2); 5) Precipitado base (etapa 2); 6) Sobrenadante ácido 1 (etapa 3); 7) Precipitado ácido 1 (etapa 3); 8) Sobrenadante frío 1 (etapa 4); 9) Precipitado frío 1 (etapa 4)

Debido a que la lisis celular no se ha efectuado completamente (queda todavía bacteria en el sobrenadante), las pérdidas de polímero han ido sucediendo desde más temprano. En el primer enfriamiento (etapa 2), el polímero sí ha logrado permanecer en el sobrenadante; sin embargo, con el primer calentamiento (etapa 3), se puede apreciar una ligera banda de polímero en el sobrenadante que indica una pérdida mínima de polímero. Esto se acentúa en la siguiente centrifuga en frío (etapa 4), donde la cantidad retenida de polímero en el precipitado es mucho mayor.

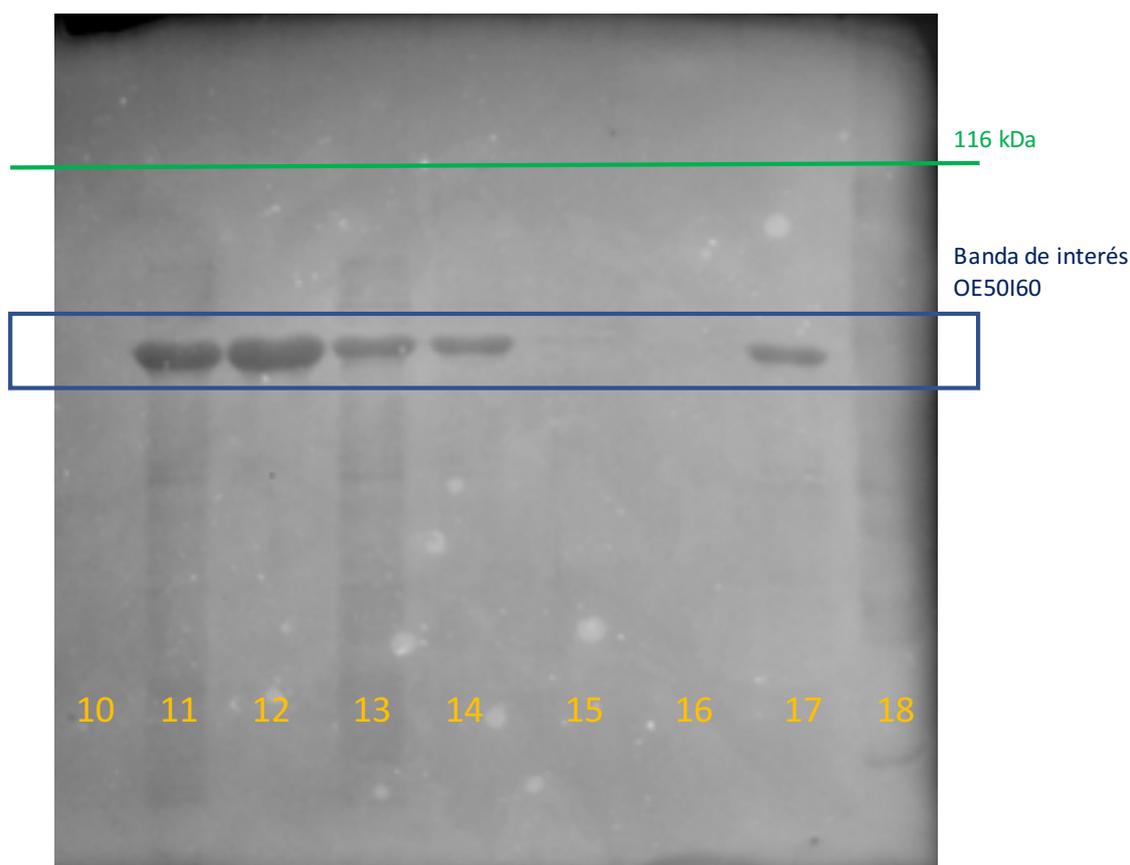


Figura 33. Impresión de SDS Page representando la purificación de una producción de polímero OE50I60 obtenido mediante ruptura por disrupción, con la siguiente representación por calles: 10) Sobrenadante ácido 2 (etapa 5); 11) Precipitado ácido 2 (etapa 5); 12) Sobrenadante frío 2 (etapa 6); 13) Precipitado frío 2 (etapa 6); 14) Sobrenadante neutro (etapa 7); 15) Precipitado neutro (etapa 7); 16) Sobrenadante caliente (etapa 8); 17) Precipitado caliente (etapa 8); 18) Marcador de pesos moleculares

Las etapas 5, 7 y 8 transcurren con normalidad y el polímero aparece en la banda que le corresponde. La etapa 6 sí pierde una cantidad de polímero.

Finalizado el proceso de bioproducción, la cantidad de polímero obtenida es:

- ❖ Mediante ruptura por disrupción: **185,4 mg**
- ❖ Mediante ruptura por congelación-descongelación: **38,4 mg**

Al romper mediante la sucesión de ciclos de congelación-descongelación, se han producido mayores pérdidas de polímero en ciertas etapas de la purificación, posiblemente debido a que la ruptura no se produjo completamente en los ciclos establecidos y hubiese requerido de alguno adicional, o a posibles fallos humanos, como no colocar la muestra de precipitado en la cámara fría en la posición correcta de agitación para lograr una mezcla óptima.

6. Análisis medioambiental

La biotecnología ambiental puede definirse como la aplicación de las herramientas y métodos biotecnológicos a la resolución de los problemas ambientales, naciendo de la unión de dos disciplinas: la biotecnología, con sus procesos y herramientas (ingeniería genética, biocinética, etc.) y la ecología (depredación, ciclos biogeoquímicos, etc.)

La producción de ELRs cuida especialmente la gestión de residuos biológicos, que se introducen en bolsas de esterilización que se llevan al autoclave. Posteriormente, y tras secar el material, éste se podrá retirar como residuo sólido urbano.

Los fertilizantes químicos suponen un alto coste medioambiental, ya que contaminan agua y suelos, consumen muchos recursos naturales y emiten óxidos de nitrógeno, con un efecto invernadero hasta trescientas veces mayor que el del CO₂ [46]. Por ello, el aprovechamiento de bacterias y residuos orgánicos para la elaboración de biofertilizantes implica una gran alternativa.

En el caso de la bioproducción de recombinámeros tipos elastina, se puede emplear el precipitado de la disrupción como fertilizante, que queda tras romper la bacteria y centrifugar en frío a 4°C, donde se supone que no habrá polímero, pero sí otras proteínas de interés. De esta manera, se puede reducir la cantidad de agua de riego necesaria para las plantas.

7. Análisis de rentabilidad

Se ha comprobado la rentabilidad del proceso mediante la experimentación en el laboratorio. No obstante, conviene analizar y discutir el mismo desde las perspectivas de tiempo y costes que se detallan a continuación.

En las siguientes tablas, se recogen los costes de las materias primas necesarias para llevar a cabo el proceso de bioproducción de ELRs, incluyendo disoluciones para limpieza y medios antibióticos; y de los distintos equipos empleados, desde los más elementales, como las balanzas analíticas, a los más complejos, como las centrifugas o el autoclave.

REACTIVO	PROVEEDOR	COSTE (€)
Etanol	MERCK	40,50
Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)	FISHER	113,00
Acrilamida 40%	FISHER	128,00
Dodecilsulfato sódico (SDS)	FISHER BioReagents	48,30
Acrilamida 40%	VWR	75,00
Tetrametilendiamina (TEMED)/25 mL	FISHER	53,20
n-butanol	MERCK	63,72
Marcador de proteínas	FISHER	66,96
Cloruro cúprico	FISHER	18,33
Glicerol	FISHER BioReagents	20,65
Antiespumante	Sigma-Aldrich	55,00
Cloruro sódico	FISHER BioReagents	77,65
Ampicilina	IBIAN	76,00
Glucosa	FISHER	36,50
Hidróxido sódico	FISHER	11,20
Ácido clorhídrico	FISHER	34,58
Isopropanol	FISHER BioReagents	34,65
	TOTAL	953,24 €

Tabla 7. Costes de las materias primas (productos químicos)

EQUIPO	MODELO	COSTE (€)
Balanza analítica	KERN PFB 6000-1	272,13
Placa calefactora	Heidolph MR Hei-Tec	416,50
Baño termostático 1	LAUDA E-100	850,00
Baño termostático 2	Grant JB-Academy	882,71
pH-metro	Crison GLP 21	1296,00
Agitador magnético	Heidolph MR Hei-Mix L	497,00
Centrífuga 1	Sorvall Bios 16	53500,00
Centrífuga 2	Beckman Coulter Avanti J-26 XP	8750,75
Centrífuga 3	Sorvall Legend XTR	9145,00
Centrífuga 4	Sorvall Legend Micro 21-R	6680,00
Centrífuga 5	MiniSpin Plus F-45-12-11	1185,00
Autoclave	JP Selecta Autester-E-DRY 75	20322,00
Disruptor	GEA Niro Soavi Panda Plus	20000,00
Incubador	Certomat Thermo MaxQ 8000	4299,00
Vórtex	Heidolph 541-10000-00	707,00
Espectrofotómetro UV-Vis	Varian Cary 50 Scan	4950,00
Congelador	Thermo Scientific TSG	6240,00
Liofilizador	Labconco FreeZone	198614,00
TOTAL		338607,09 €

Tabla 8. Costes de los equipos de proceso empleados en el laboratorio

Observando los precios, a primera vista, la opción de ruptura celular parece la más económicamente viable. El congelador cuesta alrededor de una cuarta parte que el disruptor y no es necesaria la preparación adicional de disoluciones tampón. Sin embargo, en cuanto al tiempo, la operación con disrupción resulta más rápida.

El diagrama de Gantt mostrado a continuación recoge la planificación en días del proceso productivo. Independientemente de si las bacterias se rompen por disrupción o por ciclos de congelación-descongelación, la etapa de lisis bacteriana se lleva a cabo en un único día y tras finalizar el inóculo y lavar posteriormente las células. Respecto a la liofilización, su duración podrá aumentar si se obtiene una mayor cantidad de polímero tras la purificación, llevándose a cabo entre 7 y 10 días.

ETAPA	DÍA																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Sembrado de placa																	
Screening																	
Preinóculo																	
Subcultivo																	
Inóculo																	
Lavado																	
Ruptura																	
Purificación																	
Diálisis																	
Liofilización																	
Pesada de polímero																	

Figura 34. Diagrama de Gantt de la planificación por días del proceso de producción de ELRs

Los ciclos de congelación-descongelación duran alrededor de 2 horas, incluyendo el tiempo que se deja las células en agua ultrapura, la congelación y la posterior descongelación. Para que la lisis celular sea óptima, se deben llevar a cabo entre 3 y 4 ciclos de operación, lo cual supone un retraso en las etapas venideras y, en consecuencia, más horas requeridas por los trabajadores.

La ruptura mediante el disruptor supone una vía más tediosa, pero más rápida. Es importante asegurarse de que el equipo queda perfectamente limpio tras su utilización, para evitar que permanezcan restos de polímero de interés o residuos que puedan afectar a su próxima utilización. Además, se deberá ahorrar tiempo preparando previamente, durante el funcionamiento de las centrífugas en la etapa de lavado, la disolución de tampón de sonicación requerida para la limpieza del disruptor. Cabe señalar que es un equipo de complejidad mayor, que requiere de un elevado número de revisiones para su mantenimiento o arreglo.

Tal y como se muestra en los diagramas de Gantt de la Figura 35 y de la Figura 36, que representan la organización de actividades del día de ruptura celular suponiendo que se ha contratado a un técnico de laboratorio durante una jornada de mañana de 7 horas y media de duración (para llevar a la práctica este proceso, no sería necesario más de una persona), la operación con disruptor resulta más rápida que los ciclos de congelación-descongelación, lo cual en principio se traduce a su vez en disminución de costes de personal, al requerir menos horas laborables.

DÍA	ETAPA	HORA															
		8:00	8:30	9:00	9:30	10:00	10:30	11:00	11:30	12:00	12:30	13:00	13:30	14:00	14:30	15:00	15:30
1	Medición absorbancia																
	Lavado																
	Disrupción																
	Purificación																
	Limpieza lab / otros																

Figura 35. Diagrama de Gantt de la planificación por horas del proceso de lisis bacteriana empleando el disruptor

DÍA	ETAPA	HORA															
		8:00	8:30	9:00	9:30	10:00	10:30	11:00	11:30	12:00	12:30	13:00	13:30	14:00	14:30	15:00	15:30
1	Medición absorbancia																
	Lavado																
	Ciclo 1																
	Ciclo 2																
	Limpieza laboratorio																
2	Ciclo 3																
	Ciclo 4																
	Purificación																
	Limpieza lab / otros																

Figura 36. Diagrama de Gantt de la planificación por horas del proceso de lisis bacteriana empleando ciclos de congelación-descongelación

No obstante, el disruptor requiere implicación total del trabajador durante su funcionamiento, mientras que los ciclos de congelación-descongelación únicamente requieren atención durante su inicio y final. Aunque esta operación requiera de un día adicional, esas 2 horas que dura cada ciclo no se invierten realmente en el proceso.

De media, un técnico de laboratorio en España gana aproximadamente 11,49 €/h [67]. Si se llevara a cabo la operación de lisis bacteriana empleando el disruptor, se trabajaría las 7 horas y media durante 17 días, mientras que si se realizasen los ciclos de congelación-descongelación, la jornada duraría un día adicional, 18 días, pero restando las 8 horas que duran los 4 ciclos.

Por tanto, el coste de personal estimado sería:

- ❖ Llevándose a cabo la ruptura por disrupción: **1464,98 €/producción**
- ❖ Llevándose a cabo la ruptura por congelación-descongelación: **1459,23 €/producción**

La segunda vía de trabajo supondría un ahorro de 5,75€ que, en comparación con el ahorro en tiempo, no parecería especialmente rentable.

En cuanto al gasto energético, los baños termostáticos consumen diariamente alrededor de 2 kW, mientras que las centrifugas y el resto de equipos más grandes unos 3-4 kW. Los demás equipos, al ser de menor tamaño, no llegan a un consumo superior a 0,5 kW.

Excepto el congelador y el liofilizador, el resto de equipos se mantienen encendidos únicamente durante su uso en horario laboral.

EQUIPO	MODELO	POTENCIA (KW)	Horas encendido/d	17 días
Balanza analítica	KERN PFB 6000-1	0,5	7,5	63,75
Placa calefactora	Heidolph MR Hei-Tec	0,5	7,5	63,75
Baño termostático 1	LAUDA E-100	2	7,5	255
Baño termostático 2	Grant JB-Academy	2	7,5	255
pH-metro	Crison GLP 21	0,5	7,5	63,75
Agitador magnético	Heidolph MR Hei-Mix L	0,5	7,5	63,75
Centrífuga 1	Sorvall Bios 16	4	7,5	510
Centrífuga 2	Beckman Coulter Avanti J-26 X	4	7,5	510
Centrífuga 3	Sorvall Legend XTR	4	7,5	510
Centrífuga 4	Sorvall Legend Micro 21-R	1	7,5	127,5
Centrífuga 5	MiniSpin Plus F-45-12-11	1	7,5	127,5
Autoclave	JP Selecta Autester-E-DRY 75	4	7,5	510
Disruptor	GEA Niro Soavi Panda Plus	4	7,5	510
Incubador	Certomat Thermo MaxQ 8000	4	7,5	510
Vórtex	Heidolph 541-10000-00	0,5	7,5	63,75
Espectrofotómetro UV	Varian Cary 50 Scan	1	7,5	127,5
Congelador	Thermo Scientific TSG	4	24	1632
Liofilizador	Labconco FreeZone	4	24	1632
	Precio kWh	0,158 €/kWh		7535,25
			TOTAL	1190,57 €

Tabla 9. Costes energéticos

Sabiendo que en la península está a 0,158 €/kWh [68], aproximadamente el consumo eléctrico supondrá alrededor de **1190,57€**.

Respecto al consumo de agua, los equipos que requieren este servicio son el autoclave y los baños termostáticos, que se van a emplear 7 días de los 17 en total que dura el proceso productivo. Estos últimos se llenan hasta el total de su capacidad: 2,5 L, para el modelo LAUDA E-100; y 8 L, para el modelo Grant JB-Academy; mientras que el autoclave es de 75 L, pero debe acumular un nivel del agua aproximadamente del 20% de su capacidad (hasta que supere la franja de orificios metálicos)

Según el Boletín Oficial de Castilla y León, el suministro de agua en Valladolid es de 1,44€/m³ junto con una tarifa fija mensual de 4,61€ [69].

EQUIPO	MODELO	CAPACIDAD (L)	LITROS a llenar	€/m3 (7 días)
Baño termostático 1	LAUDA E-100	2,5	2,5	0,0252
Baño termostático 2	Grant JB-Academy	8	8	0,08064
Autoclave	JP Selecta Autester-E-DRY 75	75	15	0,1512
	Tarifa fija	4,6065 €		
	Precio m3	1,44 €/m3		
			TOTAL	4,86 €

Tabla 10. Costes de agua

Haciendo una estimación, el coste total de agua será de unos **4,86€**.

8. Conclusiones

Una vez finalizado el proceso de producción, la cantidad de polímero obtenida por disrupción es alrededor de un 21% superior a la lograda con el método de ciclos *freeze-thaw*.

Se concluye, por tanto, que la lisis bacteriana por congelación-descongelación no es un método eficaz de cara a la producción de polímeros, debido a que es una operación más lenta y se obtienen menores cantidades.

La congelación-descongelación logrará una ruptura más completa diluyendo la bacteria a mayores volúmenes y manteniéndolas alrededor de 1 hora en agua MQ, lo que requerirá de mayor tiempo. Por lo general, la bacteria se romperá en torno al cuarto ciclo.

A escala de laboratorio, aunque supondría mayor coste de personal, las ventajas que presentan los ciclos *freeze-thaw* frente a la disrupción son el ahorro en tampón de sonicación y tampón de lavado, junto con el tiempo requerido para la limpieza.

En un hipotético escalado a industria, el homogeneizador a presión o la prensa serían idóneos cumpliendo el papel análogo al disruptor, resultando económicamente viables a largo plazo en base a su tiempo de vida estimado.

9. Bibliografía

- [1] Díaz Fernández, J. M. Ingeniería de bioprocesos. Ed. Paraninfo, 2012, Capítulos 1 y 2
- [2] Doran, P. M., Principios de ingeniería de los bioprocesos., Ed. Acribia, 1998, Capítulo 1
- [3] Scragg, A., Huerta. L. Biotecnología para ingenieros: sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Ed, Limusa, 1996, Capítulo 1
- [4] Ward, O. P., Calvo Rebollar, M., Sevillano Calvo, E. Biotecnología de la fermentación: principios, procesos y productos. Ed. Acribia, 1989, Capítulo 2
- [5] Najafpour, G. D. Biochemical Engineering and Biotechnology, Ed. Elsevier B.V., 2015, Capítulo 1.2
- [6] Vogel, H., Todaro, C., Fermentation and Biochemical Engineering Handbook: Principles, Process Design and Equipment. Ed. Noyes Publications, 2010
- [7] Manuel Rendueles, Mario Díaz, “BIOTECNOLOGÍA ESPAÑOLA: BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL”, <https://arbor.revistas.csic.es/index.php/arbor/article/view/1957/2287>, consultada el 03/03/2024
- [8] Agrawal, C. M., Ong, J. L., Appleford, M. R., Mani, G. Introduction to Biomaterials Basic Theory with Engineering Applications., Ed Cambridge, 2014, Capítulos 1 y 3
- [9] Park, J. B., Bronzino, J. D. Biomaterials: Principles and Applications., Ed. CRC Press, 2003, Capítulos 3, 6 y 7
- [10] Merck Spain, “Lisis y extracción de proteínas”, <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/applications/protein-biology/lysis-and-protein-extraction#freeze>, consultada el 23/09/2023
- [11] López Santín, J., Gòdia, F. Ingeniería bioquímica., Ed. Síntesis, 1999, Capítulos 1 y 13
- [12] Narjis Fikri-Benbrahim, “Tecnología del ADN recombinante: aplicaciones y riesgos”, <https://www.inesem.es/revistadigital/biosanitario/adn-recombinante/>, consultada el 23/08/2024
- [13] Islam, M. S., Aryasomayajula, A., Selvaganapathy, P.R., “A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods”, consultada el 23/08/2024
- [14] Estructura de la Guanidina, <https://wiki2.org/es/Guanidina>, consultada el 23/08/2024
- [15] María M. Reynoso, Carina E. Magnoli, Germán G. Barros, Mirta S. Demo, “Métodos de siembra y cultivo de microorganismos”, https://espanol.libretexts.org/Biología/Microbiología/Manual_de_microbiología_general/04%3AMetodos_de_siembra_y_cultivo_de_microorganismos, consultada el 09/03/2024

- [16] Santos García, M. M., Serrano Dúcar, S., González Valdivieso, J., Vallejo Vicente, R., Girotti, A., Cuadrado Curto, M. P., Arias Vallejo, F. J. “Genetically Engineered Elastin-based Biomaterials for Biomedical Applications”, 2018
- [17] Ibáñez-Fonseca, A., Flora, T., Acosta, S., Rodríguez Cabello, J. C. “Trends in the design and use of elastin-like recombinamers as biomaterials. Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology”, 2019
- [18] VerHeul, R., Sweet, C., Thompson, D. H. “Rapid and simple purification of elastin-like polypeptides directly from whole cells and cell lysates by organic solvent extraction”, 2018
- [19] Mevada, J., Devi, S. Pandit, A. “Large scale microbial cell disruption using hydrodynamic cavitation: Energy saving options”, 2019
- [20] Sinnott, R.K. Coulson & Richardson’s Chemical Engineering Design. Vol. 6, Ed. Elsevier, 2005, Capítulo 6
- [21] Perry, R. H., Green, D. W., Perry's Chemical Engineer's Handbook. Ed. Textbook, 2007, Capítulo 2
- [22] Johnson, B. H., Hecht, M. H. “Recombinant Proteins Can Be Isolated from E. coli Cells by Repeated Cycles of Freezing and Thawing”, 1994
- [23] Neves, N. M., Reis, R. L., Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies (Wiley-Society for Biomaterials), Ed. Wiley, 2016, Capítulo 24
- [24] Cipriani, F., González de Torre, I., Alonso Rodrigo, M., Pooza, L., “Elastin-Like Polymers: Properties, Synthesis, and Applications
- [25] Instituto Nacional de Perú (INS), “Manual de Procedimientos de Electroforesis para Proteínas y ADN”, 2003
- [26] Jordan, S. W., Haller, C. A., Sallach, R. E., Apkarian R. P., Hanson, S. R., Chaikof, E. L. “The effect of a recombinant elastin-mimetic coating of an ePTFE prosthesis on acute thrombogenicity in a baboon arteriovenous shunt”, 2007
- [27] “Role of bacterial cellulases in the transition from free living to root endophytes in rapeseed crops and in the design of efficient biofertilizers”, <https://cordis.europa.eu/article/id/413365-bacteria-as-crop-biofertilisers/es>, consultada el 15/06/2024
- [28] Huebsch, N., Mooney, D. J., “Inspiration and application in the evolution of biomaterials”, 2009
- [29] Ratner, B. D., Bryant, S. J., “Biomaterials: where we have been and where we are going”, 2004
- [30] Baltatu, M. S., Vizureanu, P., Sandu, A. V., “Special Issue on Modern Biomaterials: Latest Advances and Prospects”, 2023
- [31] Ratner, B. D., Zhang, G., 2A History of Biomaterials”, 2020
- [32] Paulini, M. Camal Ruggieri, I. N., Ramallo, M., Alonso Rodrigo, M., Rodríguez Cabello, J. C., Esbrit, P., Mardegan Issa, J. P., Feldman, S., “Recombinant Proteins-Based Strategies in Bone Tissue Engineering”, 2022
- [33] Abascal, N. C., Regan, L., “The past, present and future of protein-based materials”, 2018

- [34] Rodríguez Cabello, J. C., Reguera, J., Girotti, A., Alonso Rodrigo, M., Testera, A. M., “Developing functionality in elastin-like polymers by increasing their molecular complexity: the power of the genetic engineering approach”, 2005
- [35] Williams, D. F., “On the mechanisms of biocompatibility”, 2008
- [36] García Arévalo, C., Girotti, A., López, I. M., Rodríguez Cabello, J. C., “Obtención de un polímero de tipo Elastina modificado con secuencias Bioactivas y Biodegradables, para su aplicación en ingeniería”, 2009
- [37] “Elastin”, <https://my.clevelandclinic.org/health/body/22482-elastin>, consultada el 27/04/2024
- [38] Iñaki Tuñón, “Problemas de Polímeros”, https://www.uv.es/Tunon/pdf_doc/prob_polim_res.pdf, consultada el 19/07/2024
- [39] Liu, Y., Li, D., Ding, J., Chen, X., “Controlled synthesis of polypeptides”, 2020
- [40] National Human Genome Research Institute, “Recombinant DNA Technology”, <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Recombinant-DNA-Technology#:~:text=Recombinant%20DNA%20technology%20involves%20using,referred%20to%20as%20recombinant%20DNA>, consultada el 19/07/2024
- [41] Khan, S., Wajid Ullah, M., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., Hou, H., “Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life”, 2016
- [42] Phark, R., “Recombinant DNA – the Pros and Cons”, 2023
- [43] Li, B., Alonso, D. O., Daggett, V., “The molecular basis for the inverse temperature transition of elastin”, 2001
- [44] Pielichowski, K., Majka, T. M., “Mechanisms of thermal degradation of polymers”, 2023
- [45] González de Torre, I., Wolf, F., Santos, M., Rongen, L., Alonso, M. Jockenhoevel, S., Rodríguez Cabello, J. C., Mela, P., “Elastin-like recombinamer-covered stents: Towards a fully biocompatible and non-thrombogenic device for cardiovascular diseases”, 2015
- [46] Marín, I., Sanz, J. L., Amils, R. Biotecnología y medioambiente. Ed. Ephemera, 2014, Capítulo 1
- [47] Jiménez Rosado, M., Rubio Valle, J.F., Pérez Puyana, V., Guerrero, A., Romero, A., “Eco-friendly protein-based materials for a sustainable fertilization in horticulture”, 2021
- [48] Rittmann, B. E., McCarty, P. L., Environmental Biotechnology: Principles and Applications. Ed. McGraw Hill Education, 2001
- [49] Precio de la balanza analítica, modelo KERN PFB 6000-1, https://www.pce-instruments.com/espanol/index.htm?id=google-es&artnr=99307&p=272.13&pmode=0&pbexkey=56&date=20240909012527&pbhash=0df4782ba5e18c22696f5c71c9858636dfc677e160d4093495707e5d23efc5a1&gad_source=1&gbraid=0AAAAAD-5Llv7B6uJ0gmuVTFJKliLg3Caw, consultada el 05/08/2024

- [50] Precio de la placa calefactora, modelo Heidolph MR Hei-Tec, https://profcontrol.de/Heidolph-MR-Hei-Tec-Heated-Magnetic-Stirrer-Hotplate-Heizruehrer-Magnetruhrer_1, consultada el 05/08/2024
- [51] Precio del baño termostático, modelo LAUDA E-100, <https://www.labx.com/item/lauda-e100-ecoline-20-liter-circulating-heating-water-bath-w-warranty/scp-58904-577b145c-6a38-4702-b591-ef5501f258b0>, consultada el 05/08/2024
- [52] Precio del baño termostático, modelo Grant JB-Academy, <https://www.fishersci.es/shop/products/unstirred-water-baths-2/p-8014662>, consultada el 05/08/2024
- [53] Precio del pH-metro, modelo Crison GLP 21, <https://www.vidrafoc.com/ph-metro-de-sobremesa-serie-glp-21-crison.html>, consultada el 05/08/2024
- [54] Precio del agitador magnético, modelo Heidolph MR Hei-Mix L, https://www.letsrab.es/agitador-hei-mix-l.lab?gad_source=1&gbraid=0AAAAADqt4hNw4fuMxIByK6oYmmeUNqUqZ, consultada el 05/08/2024
- [55] Precio de la centrífuga, modelo Sorvall Bios 16, <https://www.fishersci.es/shop/products/sorvall-bios-16-bioprocessing-centrifuge/15550204>, consultada el 05/08/2024
- [56] Precio de la centrífuga, modelo Beckman Coulter Avanti J-26 XP, <https://www.labx.com/item/beckman-coulter-avanti-j-26-xp-high-speed-floor-centrifuge/DIS-76406-beckman-coulter-avanti-j-26-xp-standard-high-speed-floor-centrifuge-1>, consultada el 05/08/2024
- [57] Precio de la centrífuga, modelo Sorvall Legend XTR, <https://www.marshallscientific.com/Thermo-Sorvall-Legend-XTR-Refrigerated-Centrifuge-p/tso-legxtr.htm>, consultada el 05/08/2024
- [58] Precio de la centrífuga, modelo Sorvall Legend Micro 21-R, <https://www.fishersci.es/shop/products/sorvall-legend-micro-21r-microcentrifuge-3/10756090>, consultada el 05/08/2024
- [59] Precio de la centrífuga, modelo MiniSpin Plus F-45-12-11, <https://www.fishersci.es/shop/products/centrifuge-minispin-g-2/15805083>, consultada el 05/08/2024
- [60] Precio del autoclave, modelo JP Selecta Autester-E-DRY 75, https://www.profishop.es/p/sanoclav-autoclav-vertical-ae-75-seco-75l-17005?number=W03-5&gad_source=1&gbraid=0AAAAABx4S3-E3TAVR_1gJXGFsdQfbKaKu#msg=%3Cdiv%3E10&euro:%20Cupón%3C/div%3E%3Cspan%3EEI%20código%20de%20bono%20%3Ci%3EOFFERCODE10ES0924%3C/i%3E%3Cspan%3E%3Cem%3Ese%20ha%20agregado%20a%20osu%20carrito%20de%20compras.#msgtype=success, consultada el 05/08/2024
- [61] Precio del disruptor, modelo GEA Niro Soavi Panda Plus, <https://www.ebay.com/itm/116281357255>, consultada el 05/08/2024

- [62] Precio del incubador, modelo Certomat Thermo MaxQ 8000, <https://www.thelabworldgroup.com/product/thermo-incubator-shaker-maxq-420hp/>, consultada el 05/08/2024
- [63] Precio del vórtex, modelo Heidolph 541-10000-00, <https://www.fishersci.es/shop/products/vortex-top-mix-stirrer/10212931>, consultada el 05/08/2024
- [64] Precio del espectrofotómetro UV-Vis, modelo Varian Cary 50 Scan, <https://www.bidservice.com/cart/view-product.aspx?product=cary-50-scan-57267>, consultada el 05/08/2024
- [65] Precio del congelador, <https://www.fishersci.es/shop/products/tsg-general-purpose-freezers/p-9379002>, consultada el 05/08/2024
- [66] Precio del liofilizador, <https://ctrscientific.com/products/liofilizadora-freezone-de-mesa-1lt-con-colector-recubierto-ptfe-115v-60hz-ea-con-1-labconco>, consultada el 05/08/2024
- [67] Salario medio para Técnico De Laboratorio en España, 2024, https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://es.talent.com/salary%3Fjob%3Dt%25C3%25A9cnico%2Bde%2Blaboratorio%23:-:text%3DEl%2520salario%2520t%25C3%25A9cnico%2520de%2520laboratorio,hasta%2520%25E2%2582%25AC%252027.500%2520a%25C3%25B1o.&ved=2ahUKEwiXvV_Fp72IAxUvUqQEHRwsJkEQFn_oECCAQAw&usg=AOvVaw2uPdCtOxKQeQb0YTzBhvld, consultada el 11/09/2024
- [68] Precio de la luz en España, <https://luz.es/precio-luz-hoy-valladolid>, consultada el 10/09/2024
- [69] Boletín Oficial de Castilla y León: Abastecimiento de Agua Potable a Poblaciones, publicado 29/12/2023
- [70] Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. “Fichas Internacionales de Seguridad Química. FISQ”. https://www.insst.es/documentacion/colecciones-%20%20tecnicas/fisq?p_p_id=es_insst_buscadores_web_BuscadoresMVCPortlet&p_p_lifecycle%20%20e=1&p_p_state=normal&p_p_mode=view&es_insst_buscadores_web_BuscadoresMVCPortlet_javax.portlet.action=search&p_auth=4NveDBBi, consultada el 04/07/2024

10. Nomenclatura

C	Concentración [mol/L, %]
V	Volumen [mL]
TL	Tampón de lavado
TS	Tampón de sonicación
Sb	Sobrenadante
↓	Precipitado

Subíndices

S	Sonicación
----------	------------