



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

**PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES EN CULTIVOS FED-
BATCH DE *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE* Y *ESCHERICHIA COLI***

MARTÍN RODRIGO CÁRCAMO BEHRENS

Tesis para optar al grado de
Magister en Ciencias de la Ingeniería

Profesor Supervisor:
EDUARDO AGOSIN TRUMPER

Santiago de Chile, Junio, 2013

© 2013, Martín Rodrigo Cárcamo Behrens



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

**PRODUCCION DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES EN CULTIVOS FEDBATCH
DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y
*ESCHERICHIA COLI***

MARTÍN RODRIGO CÁRCAMO BEHRENS

Tesis presentada a la Comisión integrada por los profesores:

EDUARDO AGOSIN TRUMPER

RICARDO PÉREZ-CORREA

JAIME TOBAR RUBIO

CARLOS BONILLA MELÉNDEZ

Para completar las exigencias del grado de
Magister en Ciencias de la Ingeniería

Santiago de Chile, Junio, 2013

A mi familia, polola y amigos, que
me apoyaron mucho

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todos mi familia, polola y amigos por el apoyo incondicional en la preparación del presente trabajo. Sin ellos este trabajo no habría sido posible. Me gustaría agradecerles a Samuel Torres, José Gómez y Mauricio Almonacid, por la colaboración y paciencia. También a Pedro Saa y Jorge Torres por el incondicional apoyo, la paciencia y contribución en este trabajo. También, a Felipe, Cristóbal, Mariana, Martín, Benjamín, Paulina, Sebastián y Carlos por el ánimo, motivación y la compañía en los largos turnos de trabajo.

Particularmente estoy muy agradecido de todo el apoyo, confianza y sabiduría del profesor Eduardo Agosin. También me gustaría agradecer la claridad y enseñanzas del profesor Ricardo Pérez. Y también agradecer a la gente de Centrovét con quienes se trabajó en el proyecto, particularmente Patricio Mandujano, Jaime Tobar, Rodrigo Orellana, Francisca Samsing y Miguel Arriagada.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1. Introducción	1
1.2. Objetivos	5
2. ESTADO DEL ARTE	6
2.1. Variables de Operación	6
2.1.1. Variables Físico-químicas	6
2.1.2. Medios de Cultivo.....	20
2.1.3. Factorías Celulares Microbianas.....	27
2.1.4. Metabolismo de sobreflujo	33
2.2. Cultivo Celular	41
2.2.1. Cultivo Batch	41
2.2.2. Cultivo Continuo	42
2.2.3. Cultivo Fed-batch	43
2.2.4. Modelación	44
2.3. Cultivos de Alta Densidad Celular.....	55
3. MATERIALES Y METODOS.....	62
3.1 Instrumentación y Control.....	62
3.2 Muestreo y Análisis.....	67

3.3	Medios de Cultivo	68
3.4	Políticas de Alimentación	71
3.4.1	pH-stato.....	71
3.4.2	Fed batch limitados en glucosa (GLFB).....	72
3.5	Modelación del Metabolismo de Sobreflujo	76
3.6	Calibración de Parámetros	81
4.	RESULTADOS	82
4.1.	<i>Escherichia coli</i>	82
4.1.1.	Scale-down proceso productivo.....	83
4.1.2.	Caracterización del metabolismo de sobreflujo.....	87
4.1.3.	Diseño del Medio de Cultivo	96
4.1.4.	Cultivos Fed batch Limitados en Glucosa	104
4.2.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	112
4.2.1.	Scale-down del proceso productivo.....	113
4.2.2.	Caracterización del metabolismo de sobreflujo.....	117
4.2.3.	Definición de Medio de Cultivo	122
4.2.4.	Cultivos Fed batch Limitados en Glucosa	129
5.	DISCUSION, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	136
5.1.	Discusión.....	136
5.2.	Conclusiones	143
5.3.	Perspectivas.....	145
	BIBLIOGRAFIA	146
	A N E X O S	154
	Anexo A. Effective dissolved oxygen control strategy for high-cell-density cultures. Artículo aceptado para publicación en International Journal of Computers Communications & Control – IJCCC (ISI).....	155
	Anexo B: Armado, Automatización y Control de Bioreactores UC.....	173

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 2- 1. Composición elemental y de macromoléculas de bacterias y levaduras. Extraído de Peppler (1967).	22
Tabla 2- 2. Principales nutrientes, sus fuentes y funciones fisiológicas en medios de cultivo celular. Extraída de (Todar, 2006)	23
Tabla 2- 3. Vías metabólicas, generación de ATP, coenzimas y rendimiento en la respiración aeróbica.	37
Tabla 2- 4. Estrategias de control en cultivos continuo. Extraído de Enfors (2011)	43
Tabla 4- 1 Concentración final, tiempo y productividad volumétrica para cultivos fed batch y pH-stato de E. coli cepa BL21 (DE3) en medio de cultivo Centrovét.	86
Tabla 4- 2. Parámetros calibrados de modelo dinámico con formación y consumo de acetato para cultivos batch de cepas JM109 (D3) y BL21 (D3).	91
Tabla 4- 3. $\mu_{m\acute{a}x}$, $\mu_{cr\acute{i}t}$ e $q_{cO,m\acute{a}x}$ de cepas JM109 (D3) y BL21 (D3)	92
Tabla 4- 4. Definición medios de cultivo de quimiostatos para el cálculo de rendimientos.	97
Tabla 4- 5. Rendimientos biomasa/sustrato limitante en quimiostatos.	99
Tabla 4- 6. Rendimientos de biomasa en glucosa, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio y magnesio [g DCW/g sustrato limitante] para E. coli. PUC: Resultados experimentales; Yee & Blanch: Literatura consultada.	99
Tabla 4- 7. Rendimientos sustrato/glucosa para E coli cepa BL21 (DE3).	100
Tabla 4- 8. Medio de Cultivo Definido PUC para cepa recombinante BL21 (DE3) de E coli.	101
Tabla 4- 9. Masa nutriente suministrada/masa nutriente requerida según rendimientos calculados.	103
Tabla 4- 10. Parámetros productivos para el cultivo de S. cerevisiae N30 utilizando protocolo Centrovét inicial ($\mu_{m\acute{a}x}$), y protocolo Centrovét modificado ($\mu_{decreciente}$).	117
Tabla 4- 11. Parámetros calibrados de modelo dinámico con sobreflujo metabólico para S. cerevisiae N30 en medio definido y semi-definido.	120

Tabla 4- 12. $q_{S,crít}$, $\mu_{máx}$, $\mu_{crít}$ e $Y_{OX_{ox}}$ de <i>S. cerevisiae</i> N30 en medio definido y semi-definido	122
Tabla 4- 13. Medios para Cálculo de rendimiento en quimiostatos para la cepa <i>S. cerevisiae</i> N30. Tasa de Dilución 0,14 h ⁻¹ , 30°C pH=5, KOH control básico.....	124
Tabla 4- 14. Concentración de sustrato limitante, biomasa en estado estacionario y rendimientos calculados a partir de quimiostatos.	125
Tabla 4- 15. Medio de cultivo para <i>S. cerevisiae</i> N30 en quimiostato limitado en nitrógeno (aportado a través de Bacto-Peptone)	126
Tabla 4- 16. Variables en estado estacionario en quimiostato limitado en peptona	127
Tabla 4- 17. Medios batch y de alimentación elaborado para <i>S. cerevisiae</i> N30. Si varía la concentración en el medio semi-definido se muestra en paréntesis.....	128
Tabla 4- 18. Estrategias de Alimentación definidas para <i>S. cerevisiae</i> N30.....	130

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2- 1. Clasificación de microorganismos según utilización de oxígeno molecular.	8
Figura 2- 2. Dinámica de oxígeno molecular en cultivos microbianos. 1-8 fases que debe atravesar la molécula de oxígeno desde la burbuja hasta el lugar de reacción en el interior de la célula.....	9
Figura 2- 3. Puntos cardinales de crecimiento microbiano: ejemplo de temperatura. Modificado de Madigan et al., (2008).....	12
Figura 2- 4. Tasas específicas de crecimiento según temperatura en cultivos de <i>Lactobacillus plantarum</i> . ●, corresponden a los datos experimentales; --, modelo Ratkowsky modificado. Modificado de Zwietering et al. (1991).	14
Figura 2- 5. Efecto de la concentración de cloruro de sodio en el crecimiento celular microbiológico. Modificado de Madigan et al., (2008)	17
Figura 2- 6. Microscopia electrónica de <i>Escherichia coli</i> . Extraída de Kar et al., (2005) ...	28
Figura 2- 7. Microscopía Electrónica de Barrido de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Fuente: Beer Street Journal	31
Figura 2- 8. Principio de la fermentación microbiana. Modificado de Madigan et al., (2008)	36
Figura 2- 9. Tasa específica de crecimiento crítica en la que ocurre fermentación mixta. Modificado de Eiteman & Altman (2006)	38
Figura 2- 10. Fermentación alcohólica en <i>S. cerevisiae</i>	39
Figura 2- 11. Producción de hidrógeno, acetato y ATP a partir del piruvato en <i>E. coli</i> . Modificado de Madigan et al., (2008).....	41
Figura 2- 12. Modelo cinético de sobreflujo metabólico en <i>E. coli</i> Modificado de Xu et al. (1999)	48
Figura 3- 1. P&ID del sistema utilizado.....	66
Figura 3- 2. Estrategia de alimentación exponencial decreciente comparada con μ constante.....	75

Figura 4- 1. Scale down pH-stato E. coli. Dinámica de biomasa, glucosa y ácido acético vs tiempo desde inoculación	84
Figura 4- 2. Scale-down Fed batch exponencial E. coli. Dinámica de biomasa, glucosa y acetato vs tiempo de inoculación; μ_{set} 0,35 hr ⁻¹	85
Figura 4- 3. Calibración de un modelo de 4 variables del cultivo batch de E. coli cepa JM109 (DE3), medio de cultivo CV, pH=7.0, T=30°C, Flujo Aire 1 VVM y agitación 800 rpm.	88
Figura 4- 4. Calibración de un modelo de 4 variables del cultivo batch de E. coli cepa BL21 (DE3), medio de cultivo CV, pH=7.0, T=30°C, Flujo Aire 1 VVM y agitación 800rpm.	89
Figura 4- 5. Simulación de tasa global de consumo biológico de oxígeno en cultivos fed batch limitados en glucosa de E. coli BL21 (DE3). Comparación con capacidades de transferencia máximas sin (OTR _{máx,1}) y con enriquecimiento de oxígeno (OTR _{máx,2}) .	94
Figura 4- 6. Estimación de biomasa máxima admisible según capacidad de transferencia máxima de oxígeno en cultivos fed batch limitados en glucosa a tasas específicas de crecimiento constante de E. coli BL21 (DE3). Simbología: (■) biomasa alcanzada con OTR _{máx,1} ; (◆) biomasa alcanzada con OTR _{máx,2}	95
Figura 4- 7. Determinación biomasa de E coli cepa BL21 (DE3) en estado estacionario para quimiostatos limitados en glucosa, nitrógeno, fosforo y azufre.....	97
Figura 4- 8. Validación de la limitación en glucosa en quimiostato con E. coli BL21 (DE3) determinado según la composición en CO ₂ de la corriente gaseosa.	98
Figura 4- 9. Quimiostato con medio definido UC: Pulsos validan que el medio está óptimamente definido.....	104
Figura 5- 10. Biomasa experimental y simulada de E. coli BL21 (DE3) en la fase alimentada en GLFB a $\mu_{set} = 0.245$ h ⁻¹ con diferentes agentes de control básico.	106
Figura 4- 11. Evolución de la Biomasa y del ácido acético experimental en la fase alimentada en GLFB a $\mu_{set}=0.245$ h ⁻¹ de E. coli BL21 (DE3).....	107
Figura 4- 12. Evolución de biomasa y ácido acético experimental en la fase alimentada en GLFB a $\mu_{set}=0.21$ h ⁻¹ en E coli BL21 (DE3).	108

Figura 4- 13. Biomasa, expresada como aumento relativo al final del batch, versus tasa específica de crecimiento especificada según ecuación 3.8, b variable y $\mu_{\text{máx}} = 0,35 \text{ h}^{-1}$; $\mu_{\text{mín}} = 0,175 \text{ h}^{-1}$. (■) Representa la biomasa máxima, con un 20% de holgura, al utilizar alimentaciones a tasas específicas de crecimiento constantes, según Figuras 4-11 y 4-12.	110
Figura 4- 14. Biomasa, glucosa y acetato experimental en cultivos fed batch limitados en glucosa de E coli BL21 (DE3) con estrategia de alimentación a una tasa específica exponencialmente decreciente.	111
Figura 4- 15. Estrategia de alimentación exponencialmente decreciente comparada con μ constante para cultivo fed batch optimizado de E coli BL21 (DE3).....	112
Figura 4- 16. Evolución de la biomasa simulada y experimental según protocolo Centrovet de cultivo fed batch limitado en glucosa de S cerevisiae N30	114
Figura 4- 17. Biomasa experimental y simulada utilizando medio Centrovet y alimentación a tasa específica de crecimiento exponencialmente decreciente.	116
Figura 4- 18. Calibración de sobreflujo metabólico en S. cerevisiae N30 en medio definido.	118
Figura 4- 19. Calibración de sobreflujo metabólico en S. cerevisiae N30 en medio semi-definido.	119
Figura 4- 20. S. cerevisiae biomasa máxima experimental en cultivos fed batch limitados en glucosa con estrategias de alimentación definidas en la Tabla 4-18.....	131
Figura 4- 21. Productividad volumétrica experimental en cultivos fed batch limitados en glucosa de S. cerevisiae 30 con estrategias de alimentación definidas en la Tabla 4-18 en medio definido y semi-definido.	133
Figura 4- 22. Evolución de biomasa, glucosa y etanol experimental en cultivos fed batch de S. cerevisiae N30 limitados en glucosa en medio definido, utilizando estrategia de alimentación decreciente 2.....	134
Figura 4- 23. Evolución de biomasa, glucosa y etanol experimental en cultivos fed batch de S. cerevisiae N30 limitados en glucosa en medio semidefinido, utilizando estrategia de alimentación decreciente 2.	135

RESUMEN

En los últimos años la industria salmonera ha sufrido una fuerte crisis por enfermedades que han afectado a los salmones (ISA, SRS y caligus) generándose una alta demanda por vacunas que prevengan dichas patologías. Las vacunas subunitarias son una alternativa altamente rentable, sin embargo, su principal cuello de botella es el proceso fermentativo. Existen aspectos claves para lograr un proceso fermentativo satisfactorio, tales como el metabolismo de sobreflujo, el medio de cultivo y la capacidad de transferencia de oxígeno. La industria productiva no ha logrado una correcta caracterización de dichos aspectos por lo que les ha sido difícil generar cultivos de alta densidad celular. El objetivo del presente trabajo consiste en desarrollar una plataforma productiva con protocolos optimizados para la generación de cultivos de alta densidad, aplicado a la generación de vacunas subunitarias de salmones, en dos factorías celulares microbianas: *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.

El medio de cultivo fue definido mediante el cálculo empírico de los requerimientos nutricionales de cada factoría celular en distintos sustratos esenciales. A través de una estrategia de control de oxígeno disuelto –que manipula secuencialmente: agitación, flujo gaseoso y concentración de oxígeno en el gas– se liberó la restricción en cuanto a transferencia de oxígeno. La elaboración y calibración de un modelo metabólico de sobreflujo permitió caracterizar los parámetros dinámicos del proceso, particularmente la tasa específica de crecimiento crítica.

Una estrategia de alimentación a tasas específicas de crecimiento decrecientes junto al manejo adecuado de las limitaciones nutricionales permitieron generar cultivos fed batch limitados en glucosa con metabolismo 100% oxidativo. La concentración celular final aumentó de 15 a 65 g DCW/L para *E. coli* y de 14 a 46 g DCW/L para *S. cerevisiae*. La productividad volumétrica obtenida se incrementó de 1.7 a 3.9 g DCW/L/h para *E. coli* y de 0.64 a 1.14 g DCW/L/h para *S. cerevisiae*. Estos resultados serán de utilidad para maximizar la producción de antígenos recombinantes para salmones en la empresa Centrovet logrando tres veces más producto en la mitad del tiempo en comparación con el método anterior.

Palabras Claves: Cultivos de alta densidad celular, concentración final, productividad volumétrica, rendimiento, sobreflujo metabólico, acetato, etanol, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, tasa volumétrica de transferencia de masa, tasa específica de crecimiento crítica.

ABSTRACT

In the past years the Chilean salmon industry has suffered a severe crisis due to several salmon diseases (ISAv, SRS and *Caligus*) that have increased the salmon vaccine demand. Protein subunit vaccines are highly profitable alternatives with productive purposes; nonetheless their main bottleneck is the fermentation process. Overflow metabolism, culture media, and limited oxygen transfer capacity are critical features in fermentation processes which have to be properly characterized to achieve satisfactory results. Chilean biotechnological industries have failed to correctly characterize these aspects and are not fulfilling the complete potential of this technology. The goal of the present work consists on the development of a productive platform with optimized protocols for the production of high cell density cultures, applied to the generation of salmon subunit vaccines, in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*.

Culture media was defined by empirically calculating the nutritional requirements of both microbial cell factories. Limited oxygen transfer capacity was enhanced by the design and implementation of a simple dissolved oxygen control strategy that manipulates three process variables: agitation, aeration and oxygenation. The development and calibration of a dynamic model with overflow metabolism allowed to properly estimate process parameters, particularly, the critical specific growth rate.

A novel strategy that exponentially decreases the specific growth rate together with the release of nutritional bottlenecks allowed generating glucose limited fed batch cultures with oxidative metabolism. Final cell concentration increased from 15 to 65 g DCW/L for *E. coli* and from 14 to 46 g DCW/L to *S. cerevisiae*. Cellular volumetric productivity increased from 1.7 to 3.9 g DCW/L/h for *E. coli* and from 0.64 to 1.14 g DCW/L/h for *S. cerevisiae*. These results will be useful for maximizing Centrovet's salmon vaccine generation capacity.

Keywords: High cell density cultures, final product concentration, volumetric productivity, product yield, overflow metabolism, acetate, ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, volumetric mass transfer capacity, critical specific growth rate.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

La salmonicultura es una rama de la Acuicultura, que consiste en la crianza de manera comercial y productiva de peces salmónidos (trucha, salmón, entre otros). El notable crecimiento que ha tenido la industria salmonera en Chile lo ha llevado a convertirse en el segundo país productor de salmónidos a nivel mundial, tras Noruega. En la actualidad la salmonicultura es una de las actividades más importantes a nivel industrial en Chile, ya que representa el 56% de las exportaciones pesqueras y aporta el 5% de las exportaciones totales del (Doren Daniela & Gabella Juan Pablo, 2001).

Debido a la alta densidad de cultivos en zonas relativamente pequeñas, los peces en cultivo son susceptibles a padecer una amplia variedad de enfermedades, tales como el virus ISA (ISAv), la caligidosis y la septicemia rickettsial salmonídea (SRS). La crisis sanitaria que se desató por el virus ISA el año 2007 provocó el cierre de numerosos centros de cultivo y plantas de proceso, disminuyendo en un 30% la producción de los centros de cultivo de salmónidos en operación en el país. Este hecho ha generado una notoria demanda de productos veterinarios, obtenidos mediante la biotecnología, ya que estas enfermedades han sido importantes cuellos de botella productivos. (Doren Daniela & Gabella Juan Pablo, 2001).

La biotecnología consiste en la aplicación tecnológica de sistemas biológicos, organismos vivos, o sus derivados para generar o modificar productos o procesos para un uso particular (Lee, 1996). Específicamente, los procesos fermentativos consisten en el cultivo de un microorganismo en un medio líquido, en el cual éste prolifera transformando los sustratos iniciales en biomasa y productos secundarios. El uso de los procesos fermentativos se remonta a la antigüedad en la producción de vino, pan y cerveza. Sin embargo el término propiamente tal se empezó a utilizar en el año 1840 (Shurtleff & Aoyagi, 2007).

Con el desarrollo de la ingeniería genética y los avances microbiológicos, los procesos biotecnológicos han elevado notablemente tanto el espectro productivo como la especificidad y productividad del proceso. Por un lado, la modificación genética permitió generar microorganismos con mayores rendimientos, mayores productividades, tolerantes a concentraciones menores de oxígeno y capaces de crecer en medios más concentrados (Bull, 1983). Y por otro, la adición foránea de genes permitió ampliar el espectro productivo del microorganismo según necesidades específicas. Ya es común el término factoría celular microbiana, refiriéndose a la aplicación de dicha tecnología con fines productivos (De Felice et al. 2008).

El alto potencial de la biotecnología de procesos ha revolucionado el mercado, aumentando notoriamente su utilización en diversas áreas tanto médicas como industriales y ambientales (Bull, 1983; Wang & Lee, 1998). Dicha tecnología ha sido aplicada para la síntesis de una gran cantidad de productos como proteínas

recombinantes, antibióticos, aminoácidos, enzimas, polímeros y productos químicos a granel (Petersen et al., 2010). El alto valor agregado de dichos compuestos genera grandes incentivos económicos para optimizar el crecimiento y producción de dicha factoría celular (Lee, 1996)

El proceso fermentativo puede dividirse en tres grandes categorías altamente interconectadas: generación de la factoría celular, crecimiento y producción del producto; y finalmente una etapa de purificación. En primer lugar, la generación de la factoría celular requiere de la genética molecular para crear cepas recombinantes con un metabolismo optimizado para la generación del producto recombinante. Ya optimizada la factoría celular a nivel genético, el proceso fermentativo se centra en la plataforma productiva propiamente tal y busca generar estrategias de cultivo que maximizan la síntesis del producto (proceso fermentativo). En la tercera y última etapa, el producto de interés es extraído del caldo de cultivo, purificado y formulado para generar el producto comercial.

El principal objetivo en la investigación del proceso fermentativo, en la que se centra el presente trabajo, consiste en la producción costo-efectiva del producto deseado, maximizando la productividad volumétrica (cantidad de producto formado por litro por hora), el rendimiento (conversión de sustrato a producto) y la concentración final (cantidad final de producto en el volumen final) (Lee, 1996). Dado que en general las proteínas se acumulan intracelularmente, la productividad es proporcional a la densidad celular final del cultivo y a la productividad específica del producto (cantidad de producto por unidad de biomasa).

Debido a la importancia de la salmonicultura en Chile, mencionada anteriormente, actualmente la empresa Centrovvet desarrolla tres vacunas, mediante tecnología de DNA recombinante, contra tres enfermedades de salmón en dos factorías celulares diferentes. El antígeno ‘SRS’ de *Piscirickettsia salmonis* (responsable de la septicemia rickettsial salmonídea (SRS)) son producidos en la bacteria *Escherichia coli*. Mientras que los antígenos T1, T6, D del piojo marino *Caligus rogercresseyi* y los antígenos HA y NA del virus ISA (ISAv) son producidos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Su comercialización y efectividad tienen un potencial tal, que en situaciones de alta demanda sería complejo y costoso el satisfacer la demanda a nivel nacional.

El presente proyecto tiene como objetivo generar estrategias de cultivos que permitan aumentar la productividad del proceso con el fin de aumentar la capacidad productiva de la empresa y así suplir la creciente demanda generada de la industria salmonera.

El trabajo fue financiado por la ley de incentivo tributario del programa InnovaCorfo, en alianza entre el laboratorio de biotecnología de DICTUC SA y la empresa Centrovvet. Los resultados aquí expuestos son de total confidencialidad dado que corresponden a tecnología de punta propia de la empresa Centrovvet.

1.2. Objetivos

El objetivo del presente proyecto consiste en la optimización del proceso fermentativo para la producción de antígenos recombinantes de salmones en cultivos celulares de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. Para lograr dicho objetivo, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Revisión bibliográfica y caracterización de las variables operacionales del proceso fermentativo.
- Implementación de una plataforma productiva a escala de laboratorio para generar cultivos de alta densidad celular de los microorganismos en cuestión.
- Scale-down del proceso productivo utilizado por Centrovét para la generación de antígenos recombinantes en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.
- Caracterización de los parámetros cinéticos característicos de las factorías celulares microbianas utilizadas para generar productos recombinantes.
- Generación de una estrategia de control automático de oxígeno disuelto capaz de suplir la creciente demanda biológica de oxígeno generada en cultivos de alta densidad celular.
- Diseño de medios de cultivo según requerimientos nutricionales para cada factoría celular
- Evaluación e implementación de nuevas estrategias de cultivo celular que maximicen la productividad volumétrica y concentración celular en factorías celulares de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.

2. ESTADO DEL ARTE

En la producción de proteínas recombinantes existen ciertos criterios que deben ser cuidadosamente estudiados y escogidos para lograr procesos efectivos y rentables. Estos criterios son revisados exhaustivamente en este capítulo. En primer lugar, es necesario definir las variables físicas y ambientales del proceso y cómo éstas afectan el crecimiento celular. Paralelamente, se revisa el rol del medio de cultivo y el metabolismo de sobreflujo, en el crecimiento celular.

Posteriormente, se define las diferentes estrategias de cultivo celular y cómo es posible acoplar balances de masa dinámicos con ecuaciones estequiométricas de reacción para modelar la dinámica del proceso. Finalmente, se explica brevemente las estrategias que han sido utilizadas para realizar cultivos de alta densidad celular, y cómo éstas combinan las distintas variables antes explicadas.

2.1. Variables de Operación

2.1.1. Variables Físico-químicas

La actividad microbiológica, incluyendo el crecimiento, está altamente influenciada por el estado químico y físico del entorno en el cual el microorganismo es crecido. Entre los diversos factores ambientales que pueden ser relevantes, cuatro son cruciales: la temperatura, el pH, la disponibilidad de agua y el oxígeno. Dichas variables en su conjunto determinan la cinética de crecimiento del microorganismo. Diversos modelos predictivos han sido utilizados para determinar las cinéticas de crecimiento, inhibición y muerte (McMeekin, Ross, &

Olley, 1992; Skinner, Larkin, & Rhodehamel, 1994; Zwietering, Jongenburger, Rombouts, & van 't Riet, 1990). Dado que dichas variables determinan el crecimiento celular, muchas veces han sido exploradas como estrategias de control de cultivos celulares.

a) Oxígeno

El oxígeno es un componente universal en las células y es metabolizado sólo una vez que se haya disuelto en el medio líquido. Los microorganismos poseen un amplio rango de respuestas al oxígeno molecular. Los anaerobios estrictos (aerófilos) no requieren ni utilizan O₂ como nutriente. De hecho, el oxígeno molecular es tóxico, ya sea dañando o inhibiendo el crecimiento. Los anaerobios estrictos obtienen la energía mediante fermentación (molécula orgánica como aceptor electrónico), respiración anaeróbica (molécula inorgánica como aceptor electrónico), fotosíntesis (luz como fuente energética) o metanogénesis (reducción de CO₂). Los aerobios facultativos (o también anaerobios facultativos), son los organismos que pueden cambiar entre metabolismo aeróbico y anaeróbico. En condiciones anaeróbicas, crecen mediante fermentación o respiración anaeróbica, pero en presencia de oxígeno cambian a una respiración aeróbica. Anaerobios aerotolerantes son organismos exclusivamente anaerobios pero insensibles al oxígeno molecular. Crecen exclusivamente mediante fermentación ya sea el oxígeno esté o no presente.

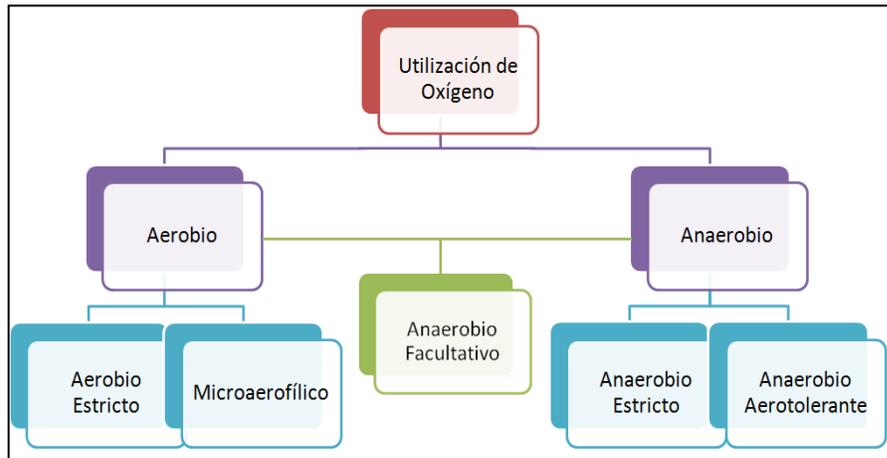


Figura 2- 1. Clasificación de microorganismos según utilización de oxígeno molecular.

En el caso de organismos aeróbicos, dado que el oxígeno es un sustrato del metabolismo, éste debe encontrarse en exceso para no generar cultivos limitados en oxígeno, o con metabolismo mixto. Por otro lado, altas concentraciones de oxígeno disuelto son tóxicas, generando estrés oxidativo y en consecuencia lisis celular (Hassan & Fridovich, 1977). En general se recomienda mantener la concentración de oxígeno disuelto sobre 20% de la saturación con aire durante el cultivo.

La concentración del oxígeno en una suspensión de microorganismos, depende de la tasa de transferencia de masa del oxígeno desde la fase gas a la fase líquida, la tasa a la que el oxígeno es transportado hacia la célula (difusión simple) y la tasa de consumo de oxígeno por el microorganismo para su crecimiento, mantenimiento y producción de metabolitos (Figura 2-2). La transferencia de

masa, además, está fuertemente influenciada por las condiciones hidrodinámicas del bioreactor, las cuales son función principalmente de: la agitación y los parámetros geométricos del bioreactor, las propiedades fisicoquímicas del medio y la presencia de células que consumen oxígeno (Reiling, Laurila, & Fiechter, 1985).

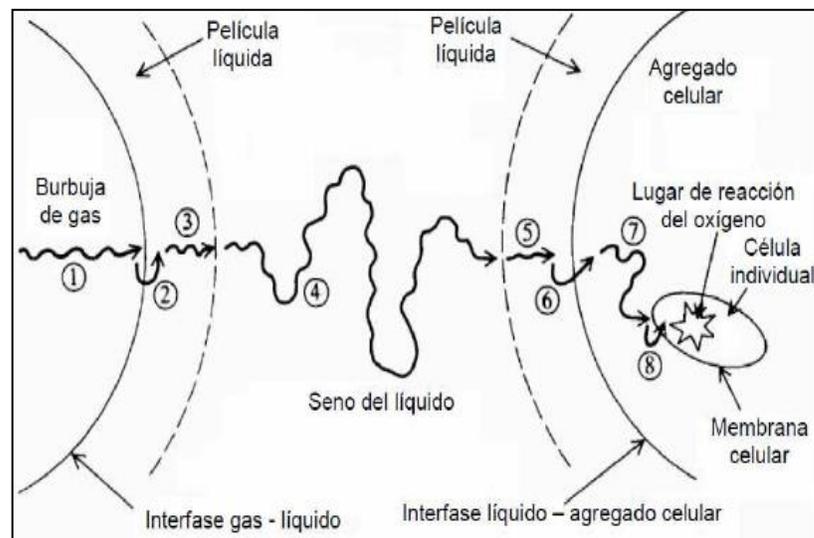


Figura 2- 2. Dinámica de oxígeno molecular en cultivos microbianos. 1-8 fases que debe atravesar la molécula de oxígeno desde la burbuja hasta el lugar de reacción en el interior de la célula.

La concentración de oxígeno disuelto en medios líquidos, a volúmenes y densidades constantes, resulta de la diferencia entre la tasa de transferencia de oxígeno desde la fase gaseosa a la fase líquida (OTR) y la tasa de consumo biológico de oxígeno del microorganismo (OUR) (Félix Garcia-Ochoa & Gomez, 2004):

$$\frac{dDO}{dt} = OTR - OUR \quad (2.1)$$

$$\frac{dDO}{dt} = k_{La} \cdot (DO^* - DO) - \frac{\mu}{Y_{OX}} \cdot X \quad (2.2)$$

En donde DO es la concentración de oxígeno disuelto (mg_{O_2}/L); k_{La} es el coeficiente de transferencia de masa de oxígeno (h^{-1}); DO^* es la concentración de oxígeno disuelto en equilibrio con la fase gaseosa (a veces llamada saturación o solubilidad máxima); μ es la tasa específica de crecimiento del microorganismo; Y_{OX} es el rendimiento de biomasa en oxígeno ($g DCW/mg_{O_2}$); y X es la concentración celular o biomasa ($g DCW/L$). Es posible estimar DO^* a partir de la ley de Henry:

$$DO^* = \frac{P \cdot y_{O_2}}{K_{H,O_2}} \quad (2.3)$$

Donde P es la presión de trabajo, en atm (1 atm); y_{O_2} es la fracción molar de oxígeno en la corriente gaseosa; y K_{H,O_2} es la constante de Henry para oxígeno a 30°C ($0,323 atm \cdot L/mg_{O_2}$).

A medida que aumenta la biomasa del sistema, el OUR aumenta y es necesario aumentar el OTR para mantener el oxígeno disuelto instantáneo en un valor apropiado para el crecimiento celular según el microorganismo de trabajo. El OTR puede aumentarse ya sea aumentando el coeficiente de transferencia de masa, k_{La} , o la concentración de saturación de oxígeno disuelto (DO^*).

El coeficiente de transferencia de masa depende, entre otros factores, de la agitación, tipo de medio de cultivo, volumen y flujo de gas del sistema. En cultivos

celulares se suele manipular la agitación y el flujo de gas para aumentar la transferencia de oxígeno (Nielsen et al. 2002). Sin embargo, existe una limitación física natural del sistema que no permite aumentar más el valor del k_La , ya sea porque se ha alcanzado la velocidad máxima de agitación o bien, porque no se puede adicionar más aire sin comprometer la operación segura del proceso.

De ahí que para aumentar la tasa de transferencia de oxígeno recomienda enriquecer el flujo de aire con oxígeno puro (Nielsen et al., 2002; Enfors 2011). Esta estrategia permite aumentar la solubilidad del oxígeno en la solución, y con ello incrementar el gradiente de oxígeno que a su vez aumenta el OTR.

b) Temperatura

La temperatura afecta de dos maneras a los microorganismos. Por un lado, al aumentar la temperatura las tasas a las que ocurren las reacciones químicas y enzimáticas aumentan; sin embargo, existen temperaturas en las que los componentes celulares son dañados irreversiblemente y en consecuencia el crecimiento celular cesa. Para describir el comportamiento del crecimiento con la temperatura se utilizan tres puntos, conocidos como puntos cardinales: la temperatura mínima, bajo la cual no existe crecimiento; la temperatura máxima, sobre la cual no existe crecimiento; y la temperatura óptima a la cual la tasa de crecimiento es máxima (Figura 2-3).

Según la temperatura óptima de crecimiento, los microorganismos son clasificados en distintas categorías. Por ejemplo, aquellos microorganismos con

temperatura óptima cercana a los 37°C (temperatura corporal de animales de sangre caliente) son llamados mesófilos. Los organismos con temperatura óptima entre 45°C y 70°C son llamados termófilos, y los con temperaturas entre 80°C y 115°C termófilos extremos o hipertermófilos. Los organismos “amantes” del frío (0°C) son conocidos como psicrófilos. Una variante de los psicrófilos (temperatura óptima entre 10-15°C) son los psicrótrofos, capaces de crecer a 0°C pero con un óptimo en el rango mesófilo. Los psicrótrofos son responsables del deterioro de alimentos refrigerados.

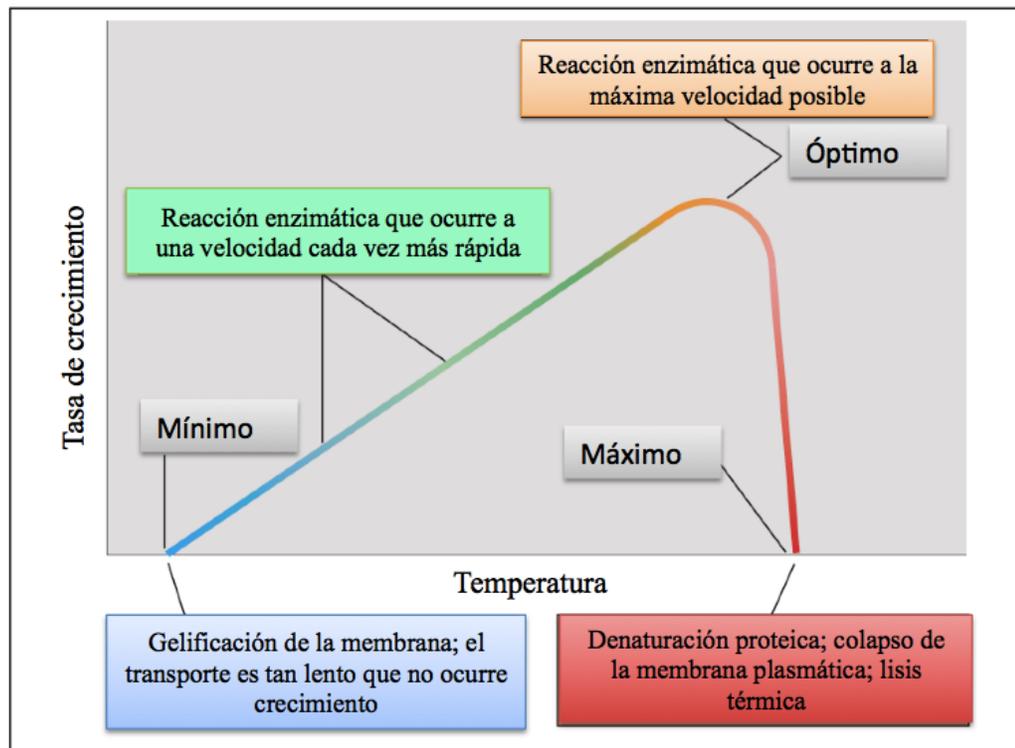


Figura 2- 3. Puntos cardinales de crecimiento microbiano: ejemplo de temperatura. Modificado de Madigan et al., (2008)

Diversos modelos han sido elaborados para explicar la dependencia de la temperatura en la tasa específica de crecimiento. Zwietering et al. (1991) comparó la eficiencia predictiva de diferentes modelos que relacionan la tasa específica de crecimiento con la temperatura del sistema. En ella concluyeron que el mejor modelo consistía de una modificación del modelo expandido de Ratkowsky:

$$\mu_m = (b \cdot (T - T_{\min}))^2 \cdot (1 - \exp(c \cdot (T - T_{\max}))) \quad (2.4)$$

en donde μ_m es la tasa específica de crecimiento (h^{-1}); T es la temperatura del sistema en $^{\circ}\text{C}$; T_{\min} es la temperatura mínima a la que se observa crecimiento ($^{\circ}\text{C}$); T_{\max} es la temperatura máxima a la que se observa crecimiento ($^{\circ}\text{C}$); b y c son dos parámetros de Ratkowsky. La Figura 2-4 muestra la calibración de dicho modelo en cultivos de *Lactobacillus plantarum*.

La bacteria *Escherichia coli* es un microorganismo mesófilo; sus puntos cardinales son 3°C , 41°C y 45°C , respectivamente (Rosso et al 1995a). Por su parte, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* también es mesófila; y sus puntos cardinales son $10\text{-}15^{\circ}\text{C}$ (Arroyo-López et al. 2009; Charoenchai et al. 1998; D'Amato et al. 2006); $25\text{-}37^{\circ}\text{C}$ (Arroyo-López et al., 2009; van Uden & da Cruz Duarte, 1981); y $36\text{-}44^{\circ}\text{C}$ (Van Uden & Da Cruz Duarte, 1981).

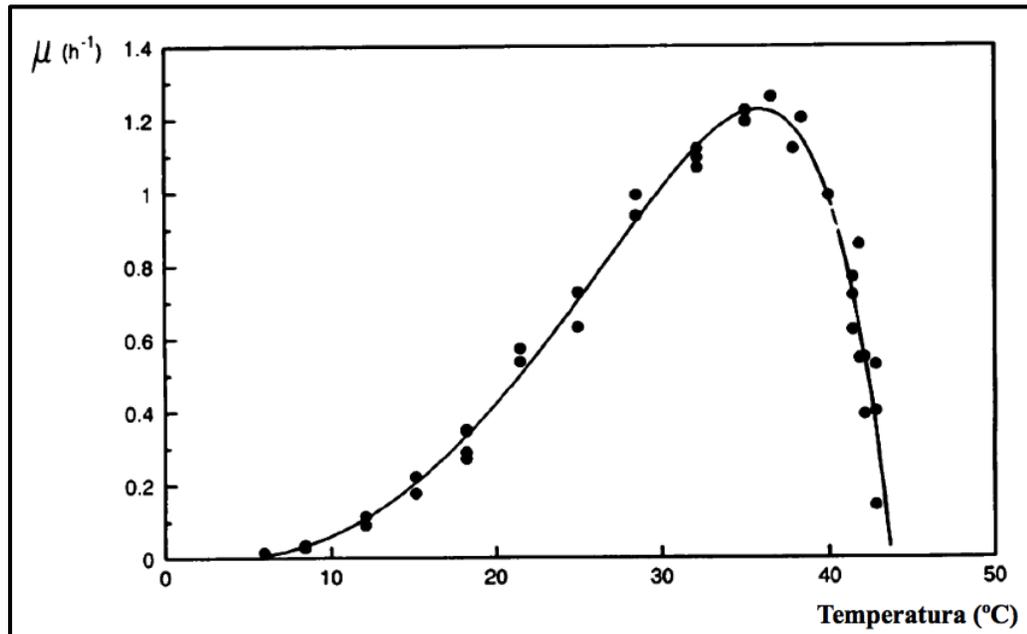


Figura 2- 4. Tasas específicas de crecimiento según temperatura en cultivos de *Lactobacillus plantarum*. ●, corresponden a los datos experimentales; ---, modelo Ratkowsky modificado. Modificado de Zwietering et al. (1991).

c) Disponibilidad de agua

Uno de los métodos más antiguos para conservar los alimentos es la deshidratación. El agua es el solvente universal en el cual las moléculas se encuentran disueltas, y por ende la disponibilidad del agua es un factor crítico para el crecimiento celular. La disponibilidad de agua no solo depende de presencia de agua en la atmósfera (humedad relativa), sino también de la concentración de solutos en el agua. Los solutos disueltos en el agua tienen cierta afinidad por ésta y

por ende hacen al agua menos disponible para el uso microbiano. La actividad de agua, a_w , se define como:

$$a_w = \frac{p}{p^*} \quad (2.5)$$

En donde p es la presión de vapor de la solución, y p^* es la presión de vapor del solvente puro (agua). La actividad de agua pura es 1.0. Dicho concepto está relacionado con la humedad relativa (RH) mediante la siguiente ecuación:

$$RH = a_w \cdot 100 \quad (2.6)$$

El agua difunde desde regiones de baja concentración de solutos a regiones de alta concentración de solutos, en un proceso conocido como osmosis. El citoplasma celular por lo general tiene una concentración de solutos mayor a la de su entorno, y así el agua tiende a difundir hacia la célula. Sin embargo, cuando la célula se encuentra en ambientes cuya concentración de solutos es mayor a la citoplasmática, el agua fluirá fuera de la célula. Para evitar la deshidratación la célula debe aumentar la concentración de solutos intracelular ya sea aumentando el ingreso o la síntesis de solutos citoplasmáticos. *E. coli* sintetiza trehalosa como osmoprotector mientras que *S. cerevisiae* sintetiza glicerol (Jay, Loessner, & Golden, 1992).

Los microorganismos viven en un rango de actividad de agua entre 0,7 y 1,0. Como referencia, la actividad de agua de la sangre es 0,99; el agua de mar 0,98; el pan 0,95; cereales y frutos deshidratados 0,7 y miel de abeja 0,6. Las actividades de agua de los suelos cultivables es de entre 0,9 y 1,0. La mínima actividad de

agua, $a_{w,min}$, encontrada para *E. coli* es de 0,95 (Shadbolt, Ross, & McMeekin, 1999), mientras que para *S. cerevisiae* es de 0,88.

El soluto más comúnmente encontrado en la naturaleza, presente en un amplio rango de concentraciones, es el cloruro de sodio (NaCl), y ciertos microorganismos son clasificados según su respuesta a esta sal. Aquellos microorganismos que requieren NaCl para su crecimiento son llamados halófilos. Los halófilos leves, requieren 10-60 g/L sal; los halófilos moderados entre 60-150 g/L NaCl; y los halófilos extremos entre 150-300 g/L NaCl para un correcto crecimiento. Los microorganismos capaces de crecer a concentraciones de sal moderadas, a pesar de crecer mejor en la ausencia de NaCl, son halotolerantes.

Los organismos capaces de vivir en ambientes de altas concentraciones de azúcar son conocidos como osmófilos, mientras que aquellos capaces de vivir en ambientes secos (ausencia de agua), son conocidos como xerófilos.

La disminución de la actividad de agua para prevenir el crecimiento bacteriano es el principio utilizado en la preservación de alimentos por deshidratación o por la adición de altas concentraciones de sal o azúcar.

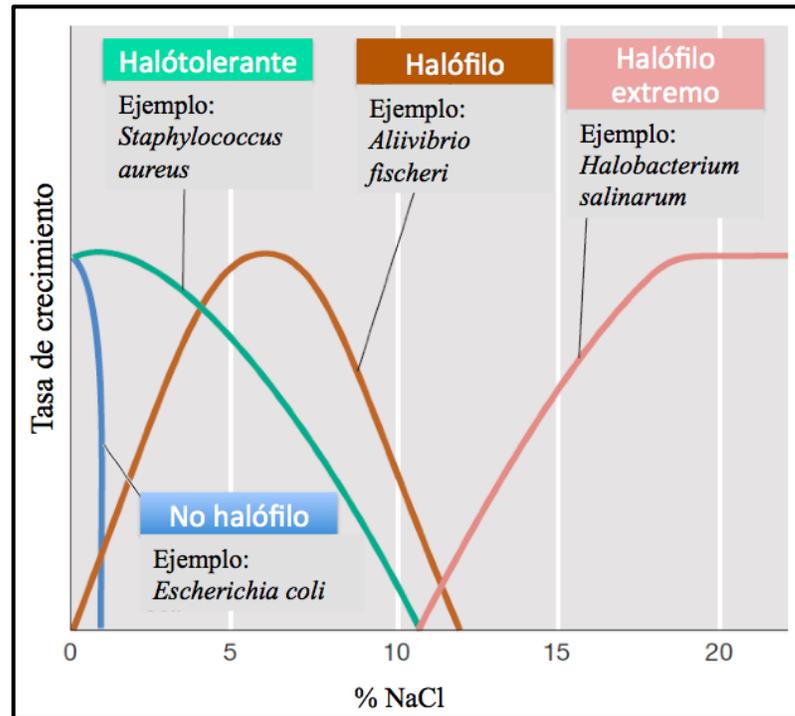


Figura 2- 5. Efecto de la concentración de cloruro de sodio en el crecimiento celular microbológico. Modificado de Madigan et al., (2008)

El efecto combinado de la actividad de agua y la temperatura en la tasa específica de crecimiento fue estudiado en cultivos de *Staphylococcus xylosus* por (McMeekin et al., 1987). Dichos autores utilizaron un modelo de Ratkowsky de dos variables con los puntos cardinales mínimos:

$$\sqrt{\mu_m} = d \cdot \sqrt{(a_w - a_{w,min})} \cdot (T - T_{min}) \quad (2.7)$$

Otras estrategias han sido utilizadas, basándose en modelos de cinéticas tipo Arrhenius (Broughall, Anslow, & Kilsby, 1983) y también modelos probabilísticas basadas en el concepto gama (Garcia, Ramos, Sanchis, & Marín, 2011).

d) pH

La acidez o alcalinidad de una solución se define a través del pH, una medida logarítmica de la concentración de protones en solución. El agua pura posee igual concentración de protones que de iones hidroxilo, y es considerada como una solución neutra con pH 7,0 ($[H^+] = 10^{-7}$ M). Todo microorganismo posee un rango de pH en el cual puede crecer. Al igual que en el caso de la temperatura, el efecto del pH en el crecimiento es cuantificado a través de tres puntos cardinales.

Aquellos microorganismos cuyo pH de crecimiento óptimo está bajo el pH neutro (7,0) se conocen como acidófilos. Aquellos cuyo óptimo crecimiento ocurre a pH neutro se conocen como neutrófilos; mientras que aquellos que crecen mejor en condiciones alcalinas se conocen como alcalófilos.

En el diseño y uso de un medio de cultivo, se debe considerar el pH óptimo de crecimiento para el microorganismo en cuestión e, idealmente, se deben incorporar tampones para mantener el pH constante ante variaciones originadas por el metabolismo celular.

Adams et al (1991) calibró un modelo análogo al de McMeekin et al. (1987), considerando el efecto del pH en vez de a_w , en cultivos de *Yersinia enterocolitica*.

Sin embargo, modelos que consideran en su conjunto temperatura, pH y a_w han sido propuestos (McMeekin et al., 1992):

$$\sqrt{\mu_m} = f \cdot \sqrt{(a_w - a_{w,min}) \cdot (pH - pH_{min}) \cdot (T - T_{min})} \quad (2.8)$$

Presser et al. (1998) utilizó un modelo similar que consideraba adicionalmente el efecto inhibitorio del ácido láctico en cultivos de *E. coli*.

En términos fisiológicos, el efecto del pH citoplasmático y su regulación en bacterias ha sido evaluado en extenso (Booth, 1985). El pH, además de ser fundamental para la actividad enzimática, es un importante factor de regulación de la homeostasis. En efecto, el gradiente de protones intra/extracelular es sumamente importante en las vías energéticas, y en consecuencia la regulación de la permeabilidad de la membrana a protones es crucial. A su vez, en el caso de organismos fermentativos (o de fermentación mixta) la producción y acumulación de compuestos ácidos conlleva una disminución del pH extracelular, hasta un punto en el cual el microorganismo es incapaz de mantener el pH intracelular constante. A su vez, es posible asociar la variación del pH al metabolismo y crecimiento celular. Por ejemplo, el consumo celular de amonio como fuente de nitrógeno, genera la liberación neta de protones al medio, disminuyendo el pH proporcionalmente a la asimilación de nitrógeno y por ende al crecimiento celular. *E. coli* es clasificada como un microorganismo neutrófilo; sus puntos cardinales del pH son 3.9, 7.2 y 9, respectivamente (“Factors that Influence Microbial Growth,” 2003; Jay et al., 1992; Rosso et al. 1995b). Por otro lado, *S. cerevisiae* es un acidófilo y sus puntos cardinales son 2,5; 5 y 8 (Praphailong & Fleet, 1997).

2.1.2. Medios de Cultivo

Para que un microorganismo pueda crecer óptimamente, éste debe encontrar en el medio todas las sustancias necesarias tanto para generar energía como para la biosíntesis celular. Los nutrientes y especies químicas utilizadas para el crecimiento microbiano se conocen como nutrientes. Los microorganismos son capaces de crecer en los medios de cultivo de laboratorio siempre y cuando contenga los nutrientes esenciales estén en solución (Todar, 2006).

Los nutrientes requeridos para el crecimiento pueden ser clasificados como macroelementos, micro-elementos y elementos traza. Adicionalmente, ciertos factores orgánicos de crecimiento pueden ser requeridos. Los macroelementos clásicos son C, H, O, N, y P, los que representan una fracción importante del peso seco celular (Tabla 2-1).

Microelementos como S, Mg y K son compuestos requeridos en concentraciones intermedias. Por su parte, los elementos traza son componentes inorgánicos requeridos en muy bajas concentraciones, dado que son utilizados como cofactores enzimáticos. Finalmente, los factores de crecimiento son compuestos orgánicos requeridos para un crecimiento eficiente, y en general corresponden a vitaminas (Enfors, 2011). La Tabla 2-2 resume los principales nutrientes de un medio de cultivo, las distintas fuentes disponibles como también las funciones fisiológicas que estos cumplen en la célula.

Por lo tanto, el medio debe contener todos los componentes necesarios para la proliferación celular. Además, según sea el caso, debe contener los precursores necesarios para la formación del producto de interés.

La fuente de carbono es administrada mayoritariamente como carbohidratos, en general glucosa. La fuente de carbono en fermentaciones industriales es también la fuente energética, y por ende muchas veces se le llama la fuente de C/energía (Enfors, 2011). Los aminoácidos son otra fuente de carbono y energía, sin embargo raramente son utilizados dado que su costo es notoriamente superior al de los carbohidratos. Otros tipos de carbohidratos más complejos (*e.g.* almidón o celulosa) también pueden ser utilizados, siempre y cuando el microorganismo posea la capacidad metabólica de utilizar dichos sustratos. La energía como fuente carbonada durante el crecimiento aeróbico se obtiene de la combustión biológica de los carbohidratos.

Tabla 2- 1. Composición elemental y de macromoléculas de bacterias y levaduras. Extraído de Peppler (1967).

Elemento	% en peso, base seca	
	Bacterias	Levaduras
Carbono	46-53	46-51
Hidrógeno	6.5-7.5	6-8
Oxígeno	18-32	28-35
Nitrógeno	10-14	6-10
Magnesio	0.1-0.5	0.1-0.5
Fósforo	2.0-3.0	0.8-2.6
Azufre	0.1-1.0	0.01-0.24
Calcio	0.01-1.1	0.1-0.3
Potasio	1.0-4.5	1.0-4.0
Hierro	0.02-0.2	0.01-0.5
Compuesto		
Proteínas	45-60	35-45
Carbohidratos	6-15	30-45
Lípidos	5-10	5-10
Ácidos Nucleídos	15-25	5-15
Cenizas	4-10	4-10

Tabla 2- 2. Principales nutrientes, sus fuentes y funciones fisiológicas en medios de cultivo celular. Extraída de (Todar, 2006)

Nutriente	Fuente	Función Fisiológica
Carbono	Compuestos orgánicos o CO ₂	Constituyente principal del material celular. Además, generalmente corresponde a la fuente energética.
Oxígeno	Compuestos orgánicos, CO ₂ y O ₂ y H ₂ O	Constituyente del material celular y agua. Aceptor electrónico en respiración celular aeróbica
Nitrógeno	NH ₄ , NO ₃ , compuestos orgánicos, N ₂	Constituyente de aminoácidos, ácidos nucleídos y coenzimas
Hidrógeno	Agua, Compuestos orgánicos, H ₂	Constituyente principal del material celular y agua.
Fosforo	Fosforo inorgánico (PO ₄)	Constituyente de ácidos nucleídos, nucleótidos, fosfolípidos, LPS.
Azufre	SO ₄ , H ₂ S, S ₀ , Compuestos orgánicos sulfatados	Constituyente de cisteína, metionina, glutatión, y diversas coenzimas
Potasio	Sales de Potasio	Principal catión inorgánico en la célula, cofactor enzimático.
Magnesio	Sales de Magnesio	Catión inorgánico celular, cofactor enzimático.
Calcio	Sales de Calcio	Catión inorgánico celular, cofactor enzimático, componente de endoesporas
Hierro	Sales de Hierro	Componente de citocromos, cofactor enzimático
Restantes (Elementos Traza)	Sales inorgánicas	Cofactores enzimáticos

Los medios de cultivo pueden ser clasificados en diversas categorías dependiendo de su composición y uso. Un medio químicamente definido (sintético) es aquel medio cuya composición química es conocida con exactitud. Los medios complejos, por otro lado, son medios cuya composición química no es conocida con exactitud. Los medios definidos se componen de compuestos bioquímicos puros, mientras que los medios complejos contienen materiales complejos de origen biológico (e.g. sangre, leche, extracto de leche, extracto de carne) cuya composición es variable e indeterminada. Los medios de cultivo definidos son de valor al estudiar los requerimientos nutricionales y fisiológicos de microorganismos, como también para tener un mejor control del proceso. Se prioriza el uso de medios complejos para cultivar microorganismos desconocidos o cuyos requerimientos nutricionales son complejos. Muchos microorganismos pueden crecer en medios definidos, sin embargo, por lo general crecen más rápidamente en medios complejos.

Bacto TM Peptone es un medio de cultivo semidefinido producido a partir de la digestión enzimática de proteínas animales. Dicho medio contiene formas de nitrógeno rápidamente asimilables por bacterias y levaduras. Además de contener nitrógeno posee calcio, magnesio, potasio, sodio, cloro, sulfato y fosfato.

Otro concepto utilizado en la elaboración de medios de cultivo es el de selección.

Un medio selectivo es aquel medio que contiene uno o varios componentes adicionados para inhibir o prevenir el crecimiento de ciertos microorganismos y/o para promover el crecimiento de especies deseadas. Generalmente los nutrientes

incorporados en los medios selectivos están asociados a la presión selectiva para seleccionar la proliferación de las cepas recombinantes (*e.g.* ampicilina, Ura-).

a) Definición de Medio de Cultivo

La elaboración del medio cultivo es crucial para definir estrategias óptimas de cultivo. Mantener el crecimiento celular a altas velocidades con un metabolismo adecuado sin sobreflujo es el objetivo principal en este estudio. Suplir al microorganismo con los cofactores enzimáticos, o bien aminoácidos permite al microorganismo ahorrarse el tedioso y lento proceso de su elaboración. Determinar los requerimientos exactos de cada uno de los sustratos es altamente laborioso. Procariontes simples son bastante eficientes en ese aspecto y mediante la adición de sustratos simples son capaces de hacerlo a altas velocidades. Sin embargo, en los eucariontes dicho proceso es mucho más lento debido a la complejidad adicional que intrínsecamente tienen. Por lo mismo el tiempo necesario para lograr productividades significativas es mucho mayor. Así, es mucho más común observar que dichos microorganismos sean cultivados en medios altamente suplementados, y principalmente por su costo, los medios complejos son la elección de preferencia.

La elaboración del medio batch ha sido muy estudiada, y diversas estrategias han sido utilizadas con dicho propósito. En cambio, la definición del medio de alimentación para cultivos fed batch no es tan directa. El cambio metabólico asociado al crecimiento a altas densidades celulares y alta concentración de

sustrato es importante y por ende las necesidades del microorganismo varían notablemente. Por lo mismo, el desarrollo de dicho medio en general es definida mediante ensayo y error.

Una de las estrategias clásicas para definir el medio de cultivo consiste en la aplicación de la formula elemental de la factoría celular (Enfors, 2011). Para estimar la composición elemental las muestras celulares son completamente combustionadas. La cantidad de gases de combustión (e.g. CO₂, SO₂, H₂O, NO₂, etc.) más cenizas (compuestos inorgánicos) es cuantificada y normalizada en relación al peso seco total. Con ello se estima la cantidad de cada elemento en la célula. Conociendo el porcentaje de cada elemento en peso seco, es posible estimar el rendimiento de cada elemento en biomasa. A partir de dichos rendimientos se puede correctamente definir un medio de cultivo para los principales macronutrientes (no es posible cuantificar el requerimiento en elementos traza). Es importante recalcar que el rendimiento estimado de la fuente de carbono solo corresponde al carbono para anabolismo y no al requerimiento de carbono como fuente energética o catabolismo, y como tal debe ser considerado.

Mateles y Battat (1974) definieron una estrategia dinámica empírica para caracterizar correctamente los medios de cultivos. A partir de un medio base y mediante quimiostatos determinaron el sustrato limitante en dicho medio de cultivo. Para liberar dicha restricción aumentaron la concentración del sustrato limitante en el medio y repitieron el experimento. Repitiendo el experimento una

serie de veces fueron capaces de formular un medio de cultivo óptimo para cultivos de *Pseudomonas C*.

Yee y Blanch (1993), por otro lado utilizaron una estrategia similar para calcular los rendimientos en diferentes sustratos. En ella buscaron calcular los rendimientos en los principales nutrientes del metabolismo celular de la factoría en cuestión. Así, formularon diferentes medios de cultivo limitantes en dichos sustratos, y mediante quimiostatos, asegurando que no existiera metabolismo de sobreflujo, calcularon los rendimientos. Utilizando dichos rendimientos, y estableciendo un sustrato limitante, definieron medios de cultivo óptimos para el microorganismo en cuestión.

2.1.3. Factorías Celulares Microbianas

La selección del microorganismo es el primer paso al momento de escoger una tecnología con propósitos productivos. Primero debe estudiarse cabalmente el producto a sintetizar, con las modificaciones post-transcripcionales necesarias. El microorganismo debe ser capaz de realizar todas las modificaciones requeridas para sintetizar proteínas biológicamente activas. A su vez el microorganismo debe ser capaz de producir altas concentraciones del producto, y almacenarlo o exportarlo sin dañar ni la estructura del producto ni afectar el crecimiento del microorganismo.

Diferentes microorganismos han sido utilizados con fines productivos. Según la complejidad del producto a sintetizar se han utilizado desde procariontes (e.g. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) a eucariontes simples (e.g. *Saccharomyces*

cerevisiae, *Pichia pastoris*) hasta células más complejas (e.g.: células de insecto o mamíferas (*CHO*)). El presente trabajo se centra en el estudio de dos factorías celulares clásicas: la bacteria *E. coli* y la levadura *S. cerevisiae*.

a) *Escherichia coli*

E. coli es uno de los microorganismos más estudiados. Es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo no esporulante (Figura 2-6). Comúnmente se encuentra en el intestino y por ende abunda en las aguas servidas (Riesenberg et al., 1991). Puede vivir de una gran variedad de sustratos, y es capaz de realizar fermentación ácido-mixta en condiciones anaerobias, produciendo acetato, lactato, succinato, etanol y dióxido de carbono (Paalme, Tiisma, Kahru, Vanatalu, & Vilu, 1990).

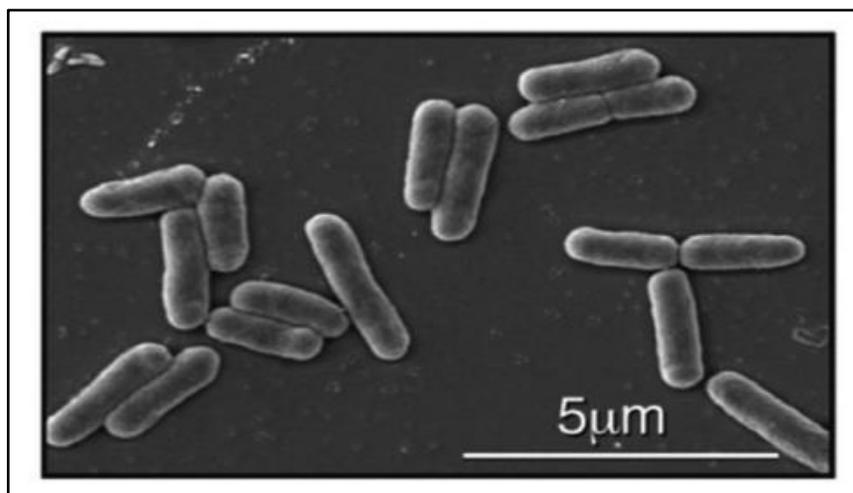


Figura 2- 6. Microscopía electrónica de *Escherichia coli*. Extraída de Kar et al., (2005)

Su crecimiento óptimo ocurre a 37°C y puede ser mediante respiración aeróbica o anaeróbica utilizando una gran variedad de pares redox, al oxidar el ácido pirúvico, ácido fórmico, hidrógeno y amino ácidos y la reducción de sustancias como oxígeno, nitrato y fumarato entre otras (Beom Soo Kim et al., 1994).

E. coli es el microorganismo más utilizado como factoría celular, debido a que está muy bien caracterizado, posee una alta tasa de crecimiento, altos niveles de expresión y escasos requerimientos nutricionales (Korz, Rinas, Hellmuth, Sanders, & Deckwer, 1995). Sin embargo, *E. coli* no puede ser utilizada para producir ciertas proteínas complejas (e.g. que contengan múltiples puentes disulfuro y en particular tioles libres) o proteínas que requieran modificaciones post-transcripcionales para su correcta actividad. Otras proteínas, como interferones, hormonas de crecimiento, factores de crecimiento similares a la insulina o seroalbúmina humana han sido exitosamente producidas en *E. coli* recombinante (G L Kleman, 1991). Adicionalmente, *E. coli* no es un microorganismo GRAS (Generally Regarded as Safe) (FDA, 2013), por lo que la producción de productos de grado médico, y particularmente alimenticio, en esta factoría debe ser cuidadosamente considerada.

La mayoría de estas proteínas son producidas en forma insoluble, integrada a cuerpos de inclusión, biológicamente inactivos, de las cuales las proteínas biológicamente activas son recuperadas mediante procesos complicados y costosos. Sin embargo, recientes avances en el entendimiento del plegamiento proteico y el rol de chaperonas moleculares y foldasas en el proceso han

posibilitado el diseño de cepas de *E. coli* que acumulan proteínas de forma soluble, y cepas que secretan proteínas (Cutayar & Poillon, 1989).

b) *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae es una levadura unicelular. Es posiblemente el organismo eucariótico modelo más estudiado a nivel molecular, similar a *E. coli* como microorganismo modelo bacteriano. Es el microorganismo clásico de la fermentación, siendo utilizado en la elaboración de vino, pan y cerveza desde la antigüedad (Pan, Rhee, & Lebeault, 1987). *S. cerevisiae* es un anaerobio facultativo, sus células son redondas u ovoides, de 5-10 micrómetros de diámetro (Figura 2-7).

Existen dos formas celulares de levadura capaces de proliferar y reproducirse, haploide y diploide. Ambas se reproducen por un proceso asexual de gemación. Sin embargo, bajo condiciones de estrés las células haploides generalmente mueren mientras que aquellas diploides son capaces de esporular en un proceso meiótico produciendo 4 esporas haploides que posteriormente pueden recombinar (Yee & Blanch, 1993a).

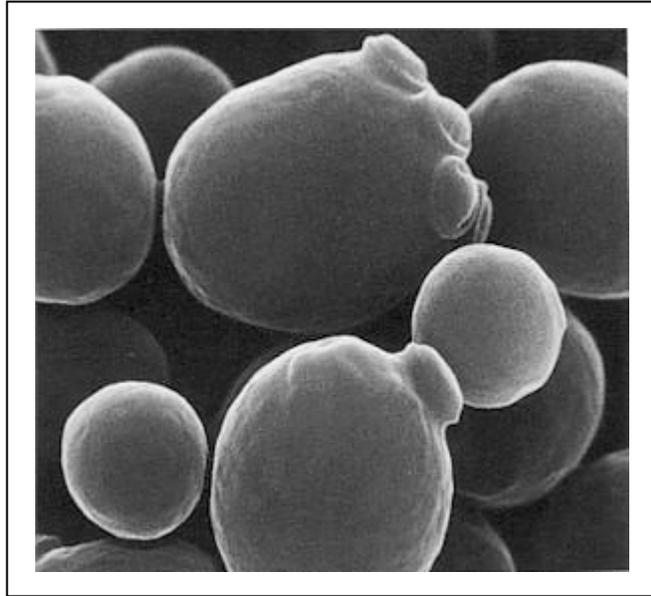


Figura 2- 7. Microscopía Electrónica de Barrido de *Saccharomyces cerevisiae*.

Fuente: Beer Street Journal

S. cerevisiae es un atractivo candidato como factoría celular microbiana. A diferencia de los sistemas procariontes, su estructura subcelular le permite llevar a cabo el correcto plegamiento, procesamiento y modificaciones post-transcripcionales (e.g. glicosilaciones, puentes disulfuro), necesarios para producir proteínas bioactivas. Adicionalmente la posibilidad de secretar proteínas al medio genera una disminución considerable de los costos relacionados a la posterior purificación del producto de interés. A su vez mantiene las ventajas en términos de crecimiento y facilidad de manipulación genética de los microorganismos unicelulares (Yee & Blanch, 1993a). *S. cerevisiae* es clasificado como un microorganismo GRAS.

c) Transformación Celular

Para generar proteínas recombinantes es necesario clonar secuencias genéticas de diferentes organismos en una secuencia híbrida artificial que codifica para un producto de interés. Para ello se utilizan vectores de clonamiento. Los vectores de clonamiento son moléculas de DNA que actúan como vehículos transportadores de DNA a una célula huésped, en donde pueden ser replicados y/o expresados. Los vectores comúnmente utilizados son derivados de plásmidos o virus, y son moléculas pequeñas de DNA que contienen la información genética necesaria para su replicación en la célula huésped (origen de replicación), elementos propios para la inserción del gen foráneo (sitios de clonación múltiples o sitios de corte mediante enzimas de restricción), algún mecanismo para identificar la presencia del DNA recombinante (marcadores de selección) y, de ser necesario, la expresión del gen foráneo (promotores: inducibles o constitutivos) (Mateles & Battat, 1974).

El sistema pET es uno de los sistemas más poderosos desarrollados para el clonamiento y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. El gen blanco se clona en el plásmido pET bajo el fuerte control de las señales de transcripción y traducción del bacteriófago T7, la expresión se induce al proveer una fuente de la RNA polimerasa T7 en la célula huésped. Dicha polimerasa es tan selectiva y activa que gran parte de los sustratos celulares se convierten en la proteína blanco (hasta 50% de las proteínas totales). Ya establecido el vector, éste es transferido al microorganismo huésped, el cual contiene una copia cromosomal del gen de la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor lacUV5, y su expresión es

inducida mediante la adición del compuesto isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), análogo no hidrolizable de la lactosa. Existen diversos marcadores de selección en el sistema pET, siendo el gen de resistencia a ampicilina aquel comúnmente utilizado. El sistema pET está comercialmente disponible a través de la empresa Novagen (Yee & Blanch, 1993a).

En el caso de *S. cerevisiae* se utiliza comúnmente el marcador de selección dado por el gen URA3. Este último codifica para orotidina 5-fosfato descarboxilasa (ODCasa), responsable de la síntesis de purinoribonucleótidos en levadura. La ausencia de la actividad de la ODCasa conlleva a la incapacidad de las células para crecer a menos que se adicione uracilo al medio (auxotrofia en uracilo). Al adicionar el gen del URA3, las células son capaces de crecer sin suplementación adicional de uracilo (selección positiva). El sistema pLEV fue utilizado como vector genético para la transformación celular de *S. cerevisiae*. Dicho sistema consiste de un plásmido con un promotor inducible por lactosa y el gen URA3. Luego la selección de las cepas transformadas fue mediada por un medio carente de uracilo (solo las cepas transformadas son capaces de crecer en ausencia de uracilo).

2.1.4. Metabolismo de sobreflujo

El metabolismo celular es el conjunto de reacciones químicas y procesos físico-químicos altamente interrelacionados que ocurren en las células biológicas y organismos vivos (Madigan et al., 2008). Dicho proceso global permite a la célula

crecer, reproducirse, mantener sus estructuras, y responder a estímulos, entre otras. El metabolismo puede dividirse en dos procesos acoplados: el catabolismo y el anabolismo. Las reacciones catabólicas son aquellas que liberan energía a través de la degradación de compuestos orgánicos (organismos heterótrofos) o inorgánicos (organismos litotróficos) o bien la transformación de una fuente de energía ambiental como la luz (organismos fototróficos). Las reacciones anabólicas, por otro lado, utilizan la energía liberada en las reacciones catabólicas para recomponer enlaces químicos y construir las biomoléculas básicas antes mencionadas.

En general se suelen agrupar todos los sustratos del proceso en un único sustrato que es, o sería, el sustrato limitante. Dado que la glucosa es la fuente energética de preferencia de la mayor parte de los organismos vivos, los medios son comúnmente diseñados de modo tal que el resto de los sustratos se encuentren en exceso relativo a la glucosa, es decir, se diseña el medio de modo tal que la glucosa sea el sustrato limitante.

En relación con la fuente energética, el microorganismo debe ser capaz de extraer la mayor cantidad de energía de la glucosa. La célula oxida la molécula generando dos tipos de '*monedas energéticas*'. La primera, consiste en la fuente principal de energía a nivel intracelular, y corresponde a la energía química utilizada metabólicamente, que es la molécula ATP. La segunda es la energía derivada del poder reductor y se encuentra principalmente en la forma de NADH. Siempre y cuando exista un aceptor electrónico fuerte (oxígeno en organismos aeróbicos) la

célula es capaz de transformar la energía del poder reductor a energía química, *i.e.* $\text{NADH} \rightarrow \text{ATP}$, restableciendo así su balance redox y generando su fuente energética de preferencia.

Esquemáticamente, existe dos procesos catabólicos de compuestos orgánicos: la fermentación y la respiración. En la respiración, aeróbica o anaeróbica, aceptores electrónicos exógenos son requeridos para aceptar los electrones generados en la oxidación de la molécula orgánica. En la fermentación, este no es el caso y los electrones (o el poder reductor) son utilizados reduciendo el compuesto orgánico residual, el cuál es posteriormente excretado (Figura 2-8).

Ambos microorganismos utilizados en esta tesis son aeróbicos facultativos, por lo que se describirá exclusivamente la respiración aeróbica. Según la presencia o ausencia de oxígeno molecular como aceptor final electrónico se clasifica el catabolismo de la glucosa en “respiración aerobia” y “fermentación”, respectivamente. Existe también la posibilidad de que ambas clases de catabolismo ocurran simultáneamente, en lo que se conoce como fermentación mixta.

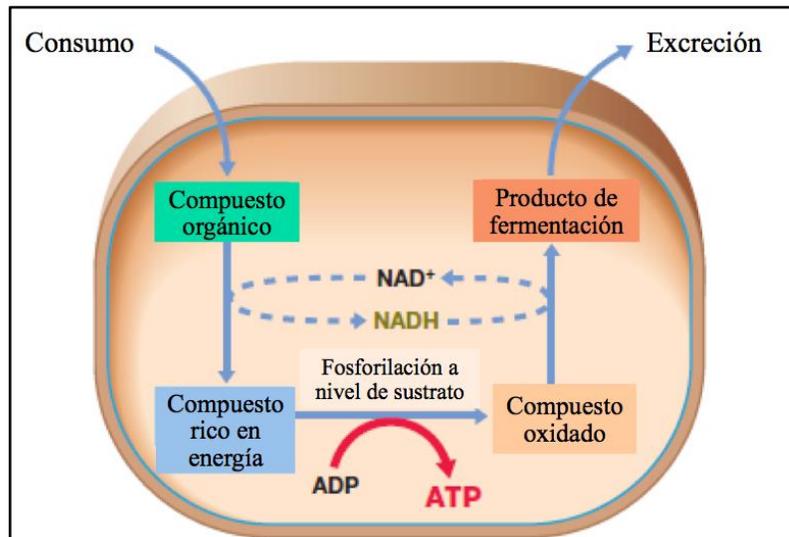


Figura 2- 8. Principio de la fermentación microbiana. Modificado de Madigan et al., (2008)

En la respiración aerobia, el consumo oxidativo de la glucosa sigue tres grandes vías metabólicas: la glucólisis, la descarboxilación oxidativa del piruvato y el ciclo de Krebs. Cada una se diferencia en localización y en la cantidad de ATP y coenzimas generadas. Finalmente, en lo que se conoce como fosforilación oxidativa, el poder reductor es transferido secuencialmente en pares redox en las cuales la energía liberada de las reacciones es utilizada para bombear protones generando un gradiente protón-motriz que posteriormente será utilizado para sintetizar ATP a partir de los sustratos ADP y Pi.

La Tabla 2-3 muestra la generación de ATP y Coenzimas en cada una de las etapas antes descritas. A su vez muestra el rendimiento ATP/Coenzima, calculado en base a la capacidad de transferir protones según lugar de reducción de la coenzima.

Tabla 2- 3. Vías metabólicas, generación de ATP, coenzimas y rendimiento en la respiración aeróbica.

Vía Metabólica	ATP Generado	Coenzima Generada (NADH; FADH ₂)	Rendimiento ATP/NADH ; ATP/FADH ₂	ATP Total
Glicólisis	2	2 ; 0	1,5 o 2,5 ; -	5 o 7
Descarboxilación Oxidativa del Piruvato	0	2 ; 0	2,5 ; -	5
Ciclo de Krebs	2	6 ; 2	2,5 ; 1,5	20
Total	4	10 ; 2	-	30 o 32

De la Tabla 2-3 se desprende que en la respiración aeróbica ocurre la siguiente reacción:



Notar que esto corresponde a la oxidación completa de la glucosa, salvo que en vez de calor hay generación de energía química (ATP) catalizada celularmente. Es importante recalcar que dicha reacción está catalizada por la célula y en consecuencia la velocidad a la que ocurre dependerá de la cantidad de biomasa presente y la velocidad a la que dicha biomasa puede catalizar la reacción.

Ahora bien, en ausencia de oxígeno, no es posible oxidar la glucosa completamente. En ausencia de oxígeno, el NADH generado empieza a

acumularse, y la célula reordena su metabolismo para generar ATP con una producción neta de NADH nula, en lo que se conoce como fermentación. Así, el catabolismo de la glucosa sigue la primera vía glicolítica y luego utiliza el poder reductor para reducir a la molécula residual. Notar que en el catabolismo anaeróbico de la glucosa el producto es una molécula carbonada generalmente soluble en agua, a diferencia del CO_2 , que tiene una mayor afinidad por la fase gaseosa. En consecuencia de no consumir dicho producto, este comienza a acumularse. A su vez, la acumulación de los subproductos metabólicos producen la inhibición del crecimiento celular y expresión de proteínas recombinantes (M Akesson, Karlsson, Hagander, Axelsson, & Tocaj, 1999; Bauer, Ben-Bassat, Dawson, de la Puente, & Neway, 1990; Luli & Strohl, 1990).

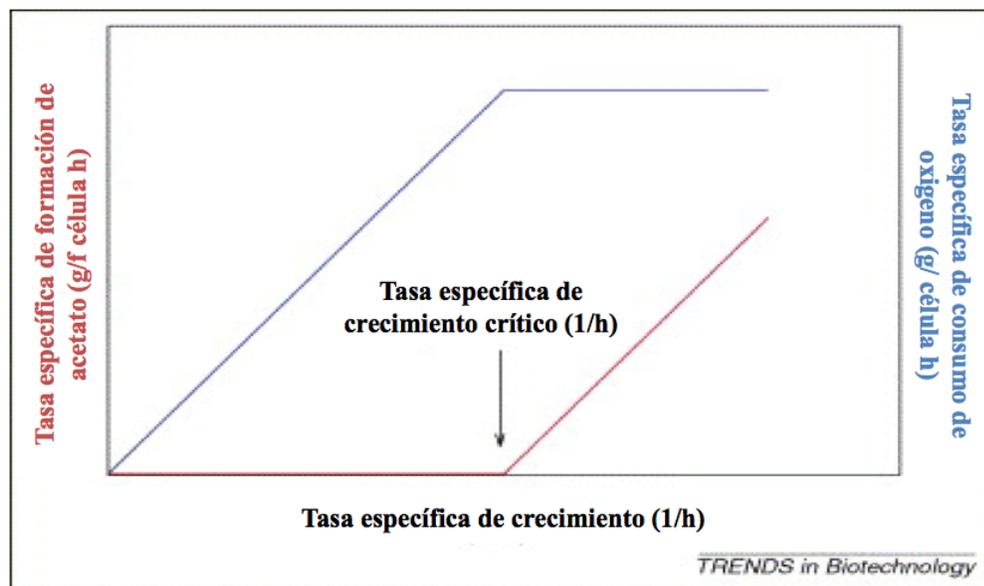


Figura 2- 9. Tasa específica de crecimiento crítica en la que ocurre fermentación mixta. Modificado de Eiteman & Altman (2006)

Si bien la limitación en oxígeno genera la fermentación mixta, es posible que dicho fenómeno ocurra en otras condiciones. A altas tasas específicas de crecimiento las vías metabólicas río abajo de la glicólisis se saturan y en consecuencia no es posible regenerar el poder reductor generado. En consecuencia, el balance redox es restablecido de manera análoga a la carencia de oxígeno; de hecho, se estima que posiblemente la tasa máxima de consumo de oxígeno sería la responsable de la fermentación mixta (Eiteman & Altman, 2006). Así, se define el concepto de tasa específica de crecimiento crítica (Figura 2-9), sobre la cual no es posible consumir más oxígeno y la glucosa remanente es consumida de manera fermentativa.

S. cerevisiae es un microorganismo de fermentación alcohólica. El proceso fermentativo es relativamente simple, y consiste en la reducción y posterior descarboxilación del piruvato, producto principal de la glicólisis (Figura 2-10).

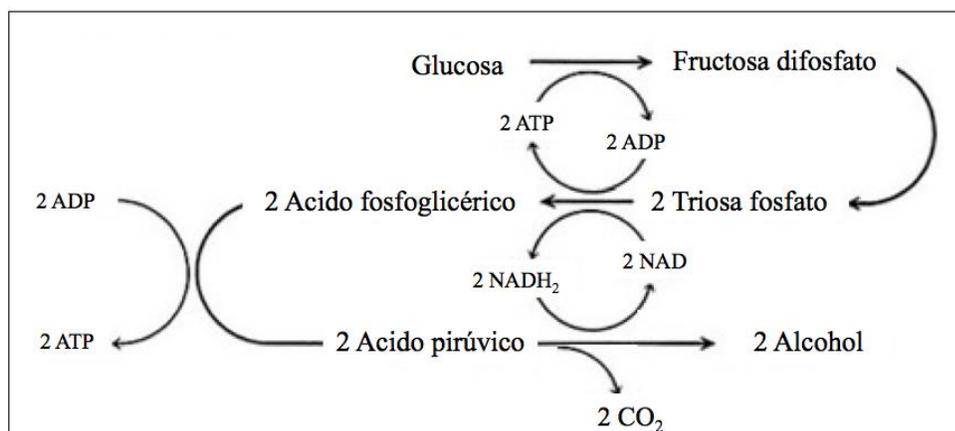
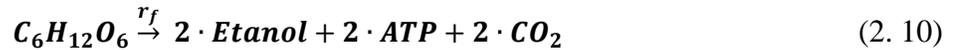


Figura 2- 10. Fermentación alcohólica en *S. cerevisiae*.

La reacción genera 4 ATP en la glicolisis, de los cuales dos son posteriormente consumidos para generar etanol. Luego la generación neta de ATP por molécula de glucosa es dos más dos moléculas de CO₂ y dos moléculas de etanol:



El caso de *E. coli* es un poco más complejo. *E. coli* se clasifica como un microorganismo de fermentación ácido-mixta. En las fermentaciones ácido-mixtas se genera ácido acético, láctico, succínico, además de etanol, dióxido de carbono e hidrógeno. Por un lado, la oxidación redox-balanceada de la glucosa es o bien homofermentativa (generación de 2 ácido láctico + 2 ATP) o heterofermentativa (ácido láctico + etanol + CO₂ + ATP). Dichas reacciones son capaces de producir o bien 2 o 1 molécula de ATP y en consecuencia su rendimiento energético es bajo (Madigan et al., 2008). Adicionalmente, *E. coli* es capaz de generar otra reacción en la cuál es posible obtener una mayor generación de ATP a partir del piruvato a través de dos vías metabólicas diferentes (Figura 2-11Figura 2- 11). El detalle de la fisiología del metabolismo del acetato se detalla en (Wolfe, 2005).

Dada la mayor eficiencia energética de dicha reacción, el ácido acético es el principal indicador de la saturación de las vías metabólicas río abajo de la glicólisis, y la fuerte inhibición que ejerce en el crecimiento la hacen el principal producto del metabolismo de sobreflujo en cultivos de *E. coli*.

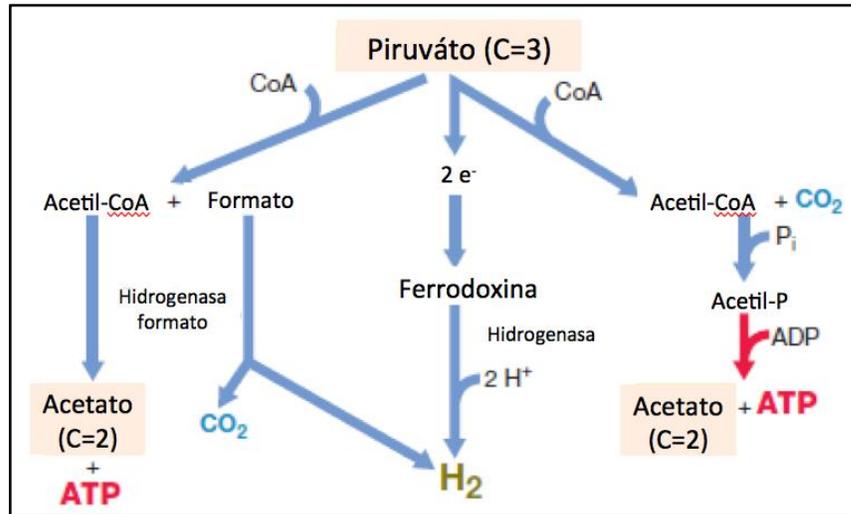


Figura 2- 11. Producción de hidrógeno, acetato y ATP a partir del piruvato en E. coli. Modificado de Madigan et al., (2008)

2.2. Cultivo Celular

Las estrategias de cultivo celular se pueden clasificar – según las corrientes líquidas de entrada (F_{in}) y salida (F_{out}) – en cultivos batch ($F_{in}=F_{out}=0$), cultivos fed-batch ($F_{in} > 0$; $F_{out} = 0$), y cultivos continuo ($F_{in} > 0$; $F_{out} > 0$).

2.2.1. Cultivo Batch

En la fermentación batch todos los sustratos - excepto el oxígeno en procesos aeróbicos - se encuentran disponibles en concentraciones suficientemente altas para que permitan el crecimiento celular no restringido en sustratos. La biomasa en un proceso batch crece exponencialmente al máximo permisible dependiendo del microorganismo, las condiciones físicas y ambientales. Dicho crecimiento

exponencial ocurre a una tasa específica de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$, función del medio de cultivo, temperatura y pH), hasta que algún factor, como concentración inhibitoria de un compuesto secundario, baja concentración del sustrato limitante, o el cambio metabólico a una fuente alternativa de sustrato (en medios complejos) reducen la tasa específica de crecimiento (Enfors, 2011). El sistema batch corresponde a un sistema cerrado, a excepción de sustratos gaseosos (e.g. oxígeno o gases inertes para desorber CO_2), agentes controladores de pH y a veces antiespumante. La fermentación batch es iniciada por la adición de un inóculo celular al medio de cultivo. El inóculo es un cultivo celular con el que se inicia la proliferación celular.

2.2.2. Cultivo Continuo

En un cultivo continuo, el sistema es alimentado con el medio de cultivo completo, y el contenido del reactor es continuamente extraído al mismo flujo, afín de mantener el volumen del reactor constante (Enfors, 2011). Al mantener el cultivo continuamente alimentado es posible prolongar el crecimiento celular; a su vez, con la extracción del medio de cultivo, es posible extraer los subproductos metabólicos generados. Una vez el sistema alcanza el estado estacionario, las variables del proceso permanecen constantes en el tiempo (Madigan et al., 2008).

Los cultivos continuos pueden ser controlados de diversas maneras. En la mayoría de las aplicaciones el flujo de entrada es controlado por alguno de los principios de control mostrados en la Tabla 2-4, mientras el flujo de salida es controlado por algún dispositivo, como por ejemplo control de nivel o de peso.

Tabla 2- 4. Estrategias de control en cultivos continuo. Extraído de Enfors (2011)

Estrategia de Control	Flujo de Alimentación	Biomasa determinada por	μ determinado por
Quimiostato	Constante	Si	F/V
Turbidostato	Controlado según Densidad Óptica (OD)	OD _{set point}	$\mu_{\text{máx}}$
pH-auxostato	Controlado según pH	Razón H_i/H^+	$\mu_{\text{máx}}$
Nutristato	Controlado según concentración del Sustrato S	Si y S _{setpoint}	S _{setpoint} y K _s

2.2.3. Cultivo Fed-batch

En los sistemas de cultivo fed batch una solución concentrada del sustrato limitante es alimentada al sistema con el fin de aumentar el crecimiento celular más allá del permisible en la fase batch (S-O Enfors 2011).

El medio de alimentación es comúnmente una solución concentrada de la fuente de carbono/energía (en vez del medio completo utilizado para cultivos continuos), comúnmente la concentración máxima posible, de modo de minimizar el aumento del volumen del medio de cultivo. A su vez se suele complementar con elementos trazas y vitaminas.

La fermentación fed batch en general es la estrategia de elección con fines productivos. Sin embargo, dicha técnica posee una serie de desventajas, como la inhibición por sustrato, transferencia de oxígeno limitada, formación de

compuestos secundarios inhibitorios y limitaciones de disipación de calor (Wang & Lee, 1998).

La acción de control sigue una estrategia fija, que generalmente consiste en controlar la tasa específica de crecimiento a un valor lo más grande posible evitando el metabolismo de sobreflujo (ocasionado por una fermentación mixta). En la fermentación mixta, posiblemente por una limitación río abajo de la glicólisis, la fuente carbonada no es completamente oxidada produciendo compuestos secundarios, que a su vez son inhibidores del crecimiento celular. Al restringir su formación es posible prolongar el crecimiento celular y aumentar los parámetros productivos. En caso de existir restricciones físicas de transferencias de oxígeno, el control debe considerar dicha restricción adicional mediante una estrategia de control diferente.

2.2.4. Modelación

Se presume que el objetivo principal del metabolismo celular es maximizar la producción de biomasa minimizando el gasto energético. Dado que el propósito del industrial es la generación de la proteína recombinante, resulta crucial tener variables empíricas indicativas del metabolismo celular. Conociendo dichas variables es posible diseñar estrategias óptimas que optimicen el flujo metabólico hacia el producto de interés.

Esquemáticamente, el metabolismo celular puede ser visto como una caja negra de reacciones que ocurren intracelularmente. De dicho modo, el metabolismo celular

global puede ser simplificado mediante una reacción biológica global que define al sistema:



En donde, S_i , X , y P_j son la concentración molar instantánea del sustrato i , la biomasa y el producto j . k_i , k_x , y k_j corresponden a los coeficientes estequiométricos del sustrato i , la biomasa y el producto j . v corresponde a la velocidad a la que ocurre la reacción global.

La derivada temporal de la concentración de sustratos y productos se conoce como la tasa volumétrica de consumo (r_s) y formación (r_p), respectivamente. La tasas volumétricas de consumo y producción, normalizadas por la biomasa (r/X), corresponde a la tasas específicas de formación (q_s) y consumo (q_p), respectivamente. Particularmente, la tasa específica de formación de biomasa (q_x) tiene una nomenclatura diferente y se le identifica con la letra griega μ .

Dado el carácter biológico del sistema, existe una velocidad máxima a la que una reacción ocurre, determinada por cuellos de botella intracelulares. Adicionalmente, como en toda reacción, la velocidad de la reacción también depende de la presencia de sustratos limitantes del proceso o bien productos inhibitorios. De no existir cuellos de botella a nivel de sustrato o productos inhibitorios, la velocidad de la reacción ocurre al máximo permisible según el microorganismo y las condiciones físico-ambientales. En general, se suele modelar la velocidad de la

reacción global a través de la velocidad de consumo del sustrato limitante mediante una cinética tipo Monod:

$$q_s = \frac{q_{s,m\acute{a}x} \cdot S}{K_s + S} \quad (2.12)$$

En donde $q_{s,m\acute{a}x}$ corresponde a la tasa específica de crecimiento máxima permisible según el microorganismo y las condiciones físicas ambientales; S , corresponde a la concentración del sustrato limitante (en general la fuente de carbono/energía); y K_s es una medida inversa de la afinidad por el sustrato. También, es posible utilizar cinéticas de crecimiento que consideren inhibición de dicha reacción por la presencia de algún producto inhibitorio.

Habiendo definido la velocidad de la reacción limitante del proceso es posible calcular la velocidad de formación y consumo de cada uno de los sustratos y productos. Para relacionar las tasas de consumo/formación se definen los rendimientos:

$$Y_{a,b} = \frac{k_b}{k_a} = \frac{q_b}{q_a} = \frac{r_b}{r_a} \quad (2.13)$$

Luego, conociendo los rendimientos y la velocidad a la cuál ocurre la reacción es posible modelar el proceso de manera dinámica. Acoplando las reacciones celulares con los balances de masa, se tiene:

$$\frac{d(C \cdot V)}{dt} = F_{in} \cdot C_{in} - F_{out} \cdot C(t) + q_c \cdot X \cdot V \quad (2.14)$$

En donde C , corresponde a la concentración instantánea del sustrato/producto; V corresponde al volumen del medio de cultivo; F_{in} y F_{out} corresponden a los flujos de entrada y salida al sistema; C_{in} es la concentración del sustrato/producto en la alimentación; y q_c corresponde a la tasa específica de formación/consumo del sustrato o producto c .

a) Metabolismo de Sobreflujo

- Modelo de Xu:

Xu *et al.* (1999) elaboraron un modelo dinámico de sobreflujo en *E. coli* que considera la generación y consumo de acetato. En dicho modelo los autores diferenciaron el consumo de la glucosa (sustrato limitante) hacia vías anabólicas (generación de biomasa) y catabólicas (generación de energía para crecimiento y mantención). El consumo de la fuente de carbono puede ocurrir de manera 100% oxidativa o respiro-fermentativa (metabolismo de sobreflujo) según una restricción en la tasa específica de consumo ($q_{O_S} \leq q_{O_{m\acute{a}x}}$) (Figura 2-12). El consumo de glucosa (S) es modelado mediante una cinética tipo Monod con inhibición del producto fermentativo, Acetato (A):

El consumo de glucosa (S) es modelado mediante una cinética tipo Monod con inhibición del producto fermentativo, Acetato (A):

$$q_S(S, A) = q_{S_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot \frac{1}{1 + \frac{A}{K_{I,A}}} \quad (2. 15)$$

en donde, S y A son las concentraciones glucosa y acetato, respectivamente. $q_S \left(\frac{g_S/g_{DCW}}{h} \right)$ es la tasa específica de consumo de glucosa; y $q_{S_{m\acute{a}x}}$ es la tasa específica de consumo máxima de glucosa. $K_S \left(\frac{g_S}{L} \right)$ es la constante de velocidad media de consumo de glucosa y $K_{I,A} \left(\frac{g_A}{L} \right)$ la constante de inhibición para de ácido acético en el consumo de glucosa.

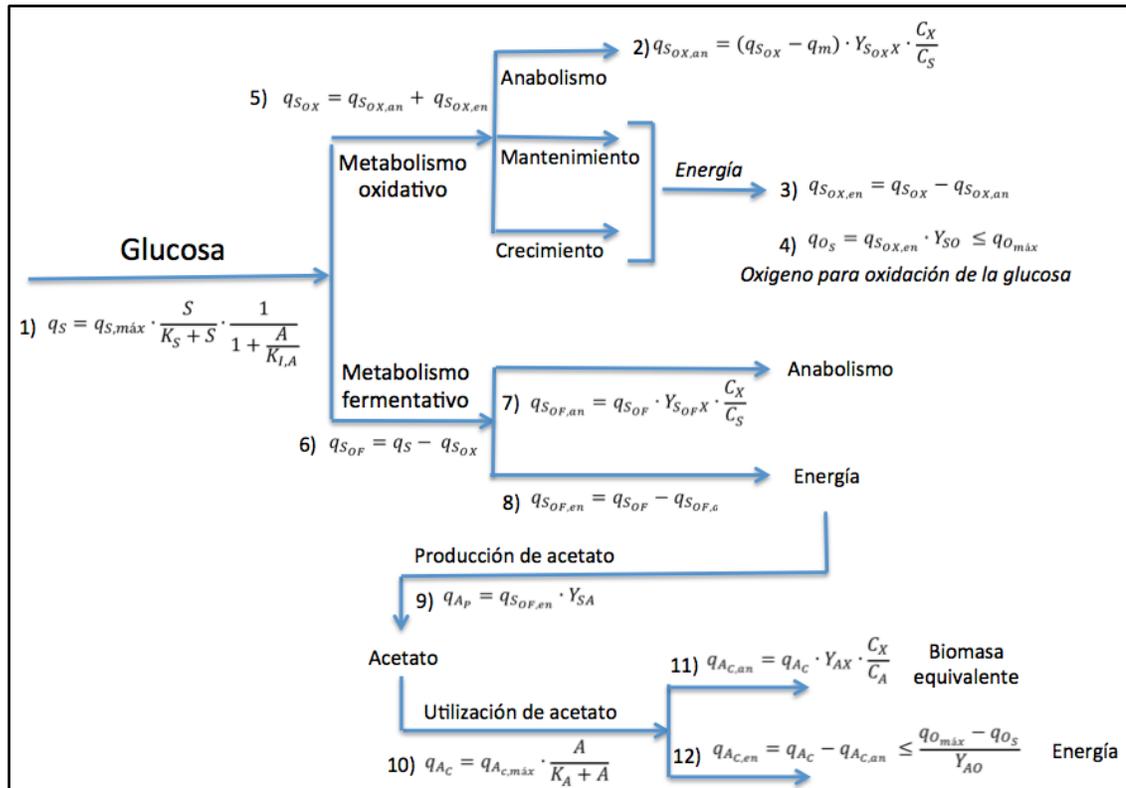


Figura 2- 12. Modelo cinético de sobreflujo metabólico en E. coli Modificado de Xu et al. (1999)

El consumo de la fuente de carbono puede ocurrir de manera oxidativa ($q_{S_{ox}}$) o fermentativa (*overflow*) ($q_{S_{of}}$) según una restricción en la tasa específica de consumo de oxígeno (q_{O_S} en $\frac{g_{O_2}/g_{DCW}}{h}$):

$$q_{O_S} \leq \frac{q_{O_{m\acute{a}x}}}{1 + \frac{A}{K_{i,o}}} \quad (2.16)$$

donde $q_{O_{m\acute{a}x}}$ es la tasa específica de consumo de oxígeno máxima (parámetro calibrado), y $K_{i,o}$ ($\frac{g_A}{L}$) es la constante de inhibición que ejerce el ácido acético en el consumo de oxígeno.

De no estar activa dicha restricción, el consumo de glucosa es 100% oxidativo y por ende el consumo total de glucosa es igual al consumo oxidativo de glucosa (*i.e.* $q_S = q_{S_{ox}}$). Así, reemplazando las ecuaciones (2) y (3) de la Figura 2-12 en la ecuación (4) (Figura 2-12) se tiene que:

$$si \ q_{O_S} \leq q_{O_{m\acute{a}x}} \quad \rightarrow \quad q_{O_S} = \left(q_S - (q_S - q_m) \cdot Y_{S_{ox}X} \cdot \frac{C_X}{C_S} \right) \cdot Y_{SO} \quad (2.17)$$

donde q_m ($\frac{g_S/g_{DCW}}{h}$) es la tasa específica de consumo de glucosa para la mantención celular, $Y_{S_{ox}X}$ ($\frac{g_{DCW}}{g_{S_{ox}}}$) es el rendimiento oxidativo de glucosa en biomasa, C_X ($\frac{mol_C}{g_{DCW}}$) es el contenido molar de carbono por gramo de biomasa (parámetro estimado), y C_S es el contenido molar de carbono por gramo de sustrato, que para la glucosa es $\frac{1}{30} \frac{mol_C}{g_{Glu}}$ calculado a partir de la fórmula química.

De estar activa la restricción se tiene que $q_{O_S} = q_{O_{m\acute{a}x}}$. Combinando ambos casos se tiene:

$$q_{O_S} = \text{Min} \left(\left(q_S - (q_S - q_m) \cdot Y_{S_{ox}X} \cdot \frac{C_X}{C_S} \right) \cdot Y_{SO}, q_{O_{m\acute{a}x}} \right) \quad (2.18)$$

Remplazando las ecuaciones (2), (3) y (4) en (5) (Figura 3-12), se desprende que la tasa específica de consumo oxidativo de glucosa, ($q_{S_{ox}}$) como función de la restricción (2.18), es:

$$q_{S_{ox}} = \frac{\frac{q_{O_S}}{Y_{SO}} - q_m \cdot Y_{S_{ox}X} \cdot \frac{C_X}{C_S}}{1 - Y_{S_{ox}X} \cdot \frac{C_X}{C_S}} \quad (2.19)$$

donde $Y_{SO} \left(\frac{g_{O_2}}{g_S} \right)$ es el rendimiento de oxígeno en glucosa.

El flujo de glucosa hacia el metabolismo de sobreflujo resulta de la diferencia entre el consumo total de glucosa y el consumo oxidativo de glucosa:

$$q_{S_{of}} = q_S - q_{S_{ox}} \quad (2.20)$$

donde $q_{S_{of}}$ es la tasa específica de consumo de glucosa en régimen fermentativo.

Notar que de no estar activa la restricción (ecuación 2.18) $q_S = q_{S_{ox}}$ y por ende $q_{S_{of}} = 0$.

Parte del flujo de carbono fermentativo es utilizado anabólicamente ($q_{S_{of,an}}$) para la generación de biomasa y el restante ocurre catabólicamente ($q_{S_{of,en}}$) en la generación de energía (ecuaciones 6, 7 y 8 Figura 2-12). La tasa específica de generación de acetato (q_{A_p} en $\frac{g_{A_p}/g_{DCW}}{h}$) se calcula reemplazando las ecuaciones

7 y 8 (figura 2-12) en la ecuación 9 (Figura 2-12), obteniendo:

$$q_{A_p} = (q_{S_{of}} - q_{S_{of}} \cdot Y_{S_{of}X} \cdot \frac{C_X}{C_S}) \cdot Y_{SA} \quad (2.21)$$

donde $Y_{S_{of}X} \left(\frac{g_{DCW}}{g_{S_{of}}} \right)$ es el rendimiento fermentativo (*overflow*) de glucosa en biomasa, e $Y_{SA} \left(\frac{g_A}{g_S} \right)$ es el rendimiento de acetato en glucosa. Notar que de no estar activa la restricción de consumo máximo de oxígeno la generación de acetato es nula ($q_{S_{of}} = 0 \rightarrow q_{A_p} = 0$).

El modelo presume que en presencia de glucosa y de acetato, el microorganismo prefiere consumir la glucosa. La tasa específica de consumo de acetato (q_{A_c} en $\frac{g_{A_c}/g_{DCW}}{h}$) se calcula según el mínimo entre la restricción de oxígeno (despejando q_{A_c} al remplazar la ecuación 11 de la Figura X en la ecuación 12 de la Figura 2-12) y una cinética de consumo de consumo de acetato tipo Monod:

$$q_{A_c} = \text{Min} \left(\frac{q_{A_c,m\acute{a}x} \cdot A}{A + K_A}, \frac{(q_{O_{m\acute{a}x}} - q_{O_S}) \cdot Y_{OA}}{1 - Y_{AX} \cdot \frac{C_X}{C_A}} \right) \quad (2.22)$$

en donde $q_{A_c,m\acute{a}x}$ es la tasa específica de consumo máxima de acetato, K_A es la constante de velocidad media de consumo de acetato, Y_{OA} es el rendimiento de acetato en oxígeno (g_A/g_{O_2}), e Y_{AX} es el rendimiento de biomasa en acetato ($\frac{g_{DCW}}{g_A}$).

Notar que si existe sobreflujo metabólico la tasa específica de consumo de acetato es nula (ya que $q_{O_{m\acute{a}x}} = q_{O_S}$).

Finalmente, la tasa específica de crecimiento se calcula del consumo anabólico de glucosa en la vía oxidativa y fermentativa y del consumo anabólico de acetato:

$$\mu = (q_{S_{ox}} - q_m) \cdot Y_{S_{ox}X} + q_{S_{of}} \cdot Y_{S_{of}X} + q_{A_c} \cdot Y_{AX} \quad (2.23)$$

Y la tasa específica de consumo de oxígeno se calcula como:

$$q_O = q_{O_S} + (q_{A_c} - q_{A_c} \cdot Y_{XA} \cdot \frac{C_X}{C_A}) \cdot Y_{AO} \quad (2.24)$$

Luego, los balances de masa para la biomasa, glucosa y ácido acético son:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F_{in}}{V} \cdot (S_{feed} - S) - q_S \cdot X \quad (2.25)$$

$$\frac{dA}{dt} = (q_{A_p} - q_{A_c}) \cdot X - \frac{F_{in}}{V} \cdot A \quad (2.26)$$

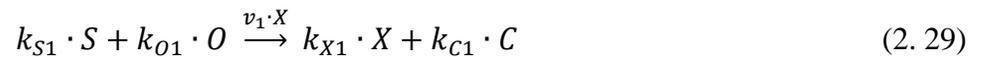
$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{F_{in}}{V} \cdot X \quad (2.27)$$

$$\frac{dV}{dt} = F_{in} \quad (2.28)$$

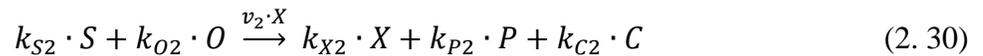
- Modelo de Dewasme

Por otro lado, Dewasme *et al.* (2011) elaboraron un modelo de sobreflujo metabólico. En ella diferencian tres reacciones:

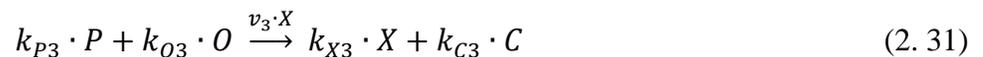
- Oxidación de Glucosa (S):



- Fermentación de Glucosa:



- Oxidación Producto Secundario (P):



Donde X, S, P, O y C corresponden a las concentraciones de biomasa, glucosa, producto secundario (i.e. etanol o metanol para cultivos de levadura, acetato en cultivos de bacteria o lactato en cultivos de células animales), oxígeno disuelto, y

dióxido de carbono, respectivamente. $k_{\xi i}$ es el coeficiente estequiométrico del sustrato ξ (X , S , P , O , o C) en la reacción i (1, 2 o 3) y v_i corresponde a la velocidad específica de la reacción i .

Se define el consumo total de glucosa según una cinética Monod:

$$q_{S_T} = q_{S_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad (2.32)$$

A diferencia de Xu, en este modelo no consideran que el acetato inhiba el consumo total de glucosa. El consumo oxidativo de glucosa está asociado a la tasa específica de consumo de oxígeno (q_O), la cual depende de la concentración de oxígeno disuelto en el medio (según una cinética tipo Monod) y es inhibida por la presencia del producto fermentativo:

$$q_{S_{crit}} = \frac{q_O}{Y_{SO}} = \frac{q_{O_{m\acute{a}x}}}{Y_{SO}} \cdot \frac{O}{K_O + O} \cdot \frac{1}{1 + \frac{P}{K_{i,P}}} \quad (2.33)$$

donde $q_{S_{crit}}$ es la tasa específica de crecimiento crítica sobre la cual existe sobreflujo metabólico, Y_{SO} es el rendimiento de oxígeno en glucosa de la reacción 1 (k_{O1}/k_{S1}), K_O es la constante de velocidad media de oxígeno (despreciada si existe control automático), $K_{i,P}$ (equivalente a $K_{i,O}$ de modelo de Xu) es la constante de inhibición que ejerce el producto fermentativo en el consumo de oxígeno, y por ende en $q_{S_{crit}}$.

Las velocidades específicas de las reacciones se determinan mediante las siguientes ecuaciones:

$$v_1 = \frac{Min(q_S, q_{S_{crit}})}{k_{S1}} \quad (2.34)$$

$$v_2 = \frac{\text{Max}(0, q_S - q_{S, \text{crit}})}{k_{S2}} \quad (2.35)$$

$$v_3 = \frac{\text{Max}\left(0, \left((q_{S, \text{crit}} - q_S) \cdot \frac{Y_{SO}}{Y_{PO}}\right) \cdot \left(\frac{P}{P + K_P}\right)\right)}{k_{P3}} \quad (2.36)$$

donde K_P corresponde a la constante de velocidad media de consumo del producto fermentativo, e Y_{PO} corresponde al rendimiento de oxígeno en el producto fermentativo de la reacción 3 (k_{O3}/k_{P3}).

Observar que a diferencia del modelo de Xu et al. (1999), en el que existe una tasa específica de consumo máximo del producto fermentativo ($q_{A_c, \text{máx}}$), el presente modelo asume que la tasa específica máxima está determinada exclusivamente por la disponibilidad de oxígeno del sistema biológico ($(q_{S, \text{crit}} - q_S) \cdot \frac{Y_{SO}}{Y_{PO}}$).

Los balances de masa del sistema son:

$$\frac{dX}{dt} = (k_{X1} \cdot v_1 + k_{X2} \cdot v_2 + k_{X3} \cdot v_3) \cdot X - D \cdot X \quad (2.37)$$

$$\frac{dS}{dt} = -(k_{S1} \cdot v_1 + k_{S2} \cdot v_2) \cdot X + D \cdot S_{in} - D \cdot S \quad (2.38)$$

$$\frac{dP}{dt} = (k_{P2} \cdot v_2 - k_{P3} \cdot v_3) \cdot X - D \cdot P \quad (2.39)$$

$$\frac{dO}{dt} = -(k_{O1} \cdot v_1 + k_{O2} \cdot v_2 + k_{O3} \cdot v_3) \cdot X - D \cdot O + OTR \quad (2.40)$$

$$\frac{dV}{dt} = D \cdot V \quad (2.41)$$

A pesar de que el modelo de Dewasme *et al.* (2011) es conceptualmente más simple, posee un mayor número de parámetros a estimar que el modelo de Xu *et*

al. (1999). Dado que el presente modelo no diferencia entre anabolismo y catabolismo, no es posible utilizar la estequiometría de las reacciones catabólicas para disminuir el número de parámetros a estimar.

2.3. Cultivos de Alta Densidad Celular

Tratándose de cultivos con fines productivos, las técnicas de cultivo de alta densidad celular (CADC) han sido ajustadas para maximizar la productividad del proceso. Los CADC reducen el volumen de cultivo, potenciando el procesamiento río abajo, reduciendo la pérdida de agua, bajando los costos productivos y reduciendo los costos de inversión en equipos (Wang & Lee, 1998). Para generar cultivos de alta densidad celular, generalmente se utilizan estrategias de cultivo fed-batch, dado que permiten concentrar la biomasa alargando la fase alimentada más allá de la fase batch y reduciendo la formación de compuestos inhibitorios.

Generar cultivos de alta densidad es un proceso sumamente complejo y laborioso. En primer lugar, es necesario familiarizarse con el microorganismo, conociendo tanto sus necesidades como sus respuestas a distintas condiciones. Una vez que el microorganismo haya sido caracterizado correctamente, con estrategias de crecimiento simples, conservadoras - y generalmente sin control automático -, es posible elaborar estrategias más complejas y de mayor automatización para disminuir la variabilidad del proceso.

Distintas estrategias de control han sido utilizadas para alcanzar cultivos de alta densidad celular. En general, estas estrategias buscan controlar la tasa específica de

crecimiento, manipulando variables operacionales o el flujo de alimentación del proceso.

Las estrategias de alimentación pueden ser divididas en dos tipos, según cuenten o no con control realimentado. Las estrategias de control sin realimentación utilizan flujos de alimentación predeterminados, que pueden ser constantes, crecientes o exponencialmente crecientes. Ahora bien, también se pueden utilizar modelos dinámicos de crecimiento celular para definir el flujo de alimentación. En efecto, mediante la calibración de los parámetros cinéticos del proceso y predefiniendo una estrategia de crecimiento (e.g. $\mu = \mu(t)$) es posible pre-calcular una función de alimentación en el tiempo (Sección 3.4) (Korz et al., 1995). Dado que dichas estrategias no corrigen la acción de control (flujo de alimentación) según las variables medibles del proceso, dicha estrategia es una estrategia de control prealimentado.

Las estrategias de alimentación que utilizan variables medidas en línea para calcular el flujo de alimentación se conocen como estrategias de control realimentadas o de lazo cerrado (Ogunnaike & Ray, 1994). Estas variables de control pueden ser indirectas, como el oxígeno disuelto, la producción de dióxido de carbono, la variación del pH o la concentración celular – y todas las combinaciones posibles; o pueden ser variables directas, como la biomasa, la concentración del producto de sobreflujo o la concentración del sustrato limitante.

El oxígeno es un sustrato fundamental en el metabolismo celular. A medida que aumenta la concentración celular, el consumo biológico de oxígeno aumenta

notoriamente. Dado que en general el oxígeno es suministrado como gas, su transferencia al medio líquido depende básicamente de la capacidad máxima de transferencia del bioreactor. Así, con el fin de aumentar esta tasa de transferencia de oxígeno, se ha implementado estrategias de enriquecimiento en oxígeno y presurización, las cuales desgraciadamente suelen seguir siendo cuellos de botella a nivel productivo, especialmente a escala industrial. Otra manera de prolongar el crecimiento es reducir el consumo biológico de oxígeno reduciendo la tasa específica de crecimiento. Recientemente, (Villadsen & Patil, 2007) diseñaron una estrategia de alimentación prealimentada capaz de prolongar el crecimiento celular manteniendo el consumo biológico de oxígeno según las restricciones físicas máximas de transferencia.

Por otro lado, el oxígeno ha sido utilizado como variable de crecimiento para generar estrategias de alimentación. Es el caso por ejemplo del DO-stato, que utiliza la medición de oxígeno disuelto para activar el flujo de alimentación. Así, al limitarse el sustrato limitante, el consumo biológico de oxígeno disminuye y en consecuencia la concentración de oxígeno disuelto aumenta; y dicha señal es la que se utiliza como principio para iniciar la alimentación (Nielsen, Villadsen, & Lidén, 2002). Akkeson et al (1999) profundizaron en dicho principio en un modelo dinámico que incluye sobreflujo basándose en la medición de oxígeno disuelto en cultivos de *E. coli*. Posteriormente, acoplaron dicho modelo dinámico con la medición de oxígeno disuelto en línea para generar diferentes estrategias de control (Mats Akesson, Hagander, & Axelsson, 1999, 2001).

El pH-stato es otra estrategia de control altamente utilizada en cultivos celulares. Dicha estrategia utiliza el aumento de pH, resultante del agotamiento de la fuente de carbono (debido a la excreción de iones de amonio), para iniciar la alimentación (Bae, Hong, Chang, Kim, & Shin, 1997). Con esto es posible prolongar el crecimiento celular utilizando la alimentación como el agente que genera la acidificación del proceso. En general dicha estrategia es sumamente conservadora (Johnston, Cord-Ruwisch, & Cooney, 2002) y es recomendada para medios complejos (Riesenberg & Guthke, 1999). Posteriormente, Kim y colaboradores (1994) combinaron dicha acción de control con una función de alimentación exponencial obteniendo resultados aún más satisfactorios.

Por otro lado, el pH ha sido utilizado como estimador de la biomasa y del crecimiento celular (Kleman & Strohl 1994; Vicente et al. 1998; Sundström & S-O Enfors 2008). La variación de pH en el cultivo se debe al resultado neto de consumo y liberación de protones intra/extracelular como consecuencia del metabolismo celular. En general, los microorganismos tienden a acidificar el medio durante el crecimiento celular, lo que es ocasionado ya sea por la asimilación/liberación de iones amonio en el metabolismo (y consecuente liberación de un protón); o bien por la liberación de ácidos orgánicos como subproductos metabólicos (e.g. ácido acético en cultivos de sobreflujo de *E. coli*). Dicho principio, en base al rendimiento biomasa/protón o bien, biomasa/amonio, junto a la acción de control de pH – utilizando de preferencia NH_4OH - ha sido utilizado para estimar en línea la biomasa (Vicente et al. 1998; Sundström & S-O

Enfors 2008). Pham et al. (1999) utilizaron el mismo principio para diseñar estrategias de control en cultivos continuos de modo de alcanzar rápidamente estados estacionarios a tasas específicas de crecimiento cercanas al máximo.

El dióxido de carbono es otro producto fundamental del metabolismo celular. Este compuesto es el producto principal de la oxidación de la fuente de carbono y, por ende, su medición en la fase gaseosa es un potente indicador del catabolismo celular (Enfors, 2011; Nielsen et al., 2002; Sonnleitner, Locher, & Fiechter, 1992).

La evolución del dióxido de carbono en la corriente de salida gaseosa ha sido utilizada para estimar la biomasa en el cultivo y la tasa específica de crecimiento y con ello definir estrategias de control (Pinsach, De Mas, & López-Santín, 2006).

Frahm et al. (2002) han ido más allá y han diferenciado la producción del dióxido de carbono de la transferencia líquido/gas de dicho producto –debido al desplazamiento de la reacción del dióxido de carbono hacia el bicarbonato – para así tener una mejor estimación de la biomasa. El cociente respiratorio, RQ, se obtiene de la razón entre el dióxido de carbono producido y el oxígeno consumido.

Dicho cociente es un excelente indicador del metabolismo de sobreflujo. En condiciones aeróbicas, los moles de oxígeno consumidos son iguales a los de dióxido de carbono generado; sin embargo, en fermentación mixta dicha razón aumenta, dado que existe mayor generación de dióxido de carbono que consumo de oxígeno. Dicha variable ha sido utilizada para predecir la biomasa (Neeleman, Van den End, & Van Boxtel, 2000) como también para generar estrategias de control realimentado (Xiong et al., 2010).

La temperatura del proceso también ha sido explorada como variable de control en cultivos de alta densidad celular. Svensson et al. (2005) implementaron una estrategia de control que utiliza la señal de oxígeno disuelto para controlar la temperatura del proceso (y con ello la tasa específica de crecimiento) manteniendo la glucosa a concentraciones predefinidas. Con ello lograron reducir notoriamente la formación de endotoxinas en cultivos de alta densidad celular de *E. coli*, en comparación con estrategias más tradicionales de cultivos limitados en glucosa.

Estrategias de control realimentado directas también han sido exploradas mediante la utilización de sensores en línea de glucosa. Por ejemplo, Park et al. (1992) desarrollaron una estrategia de alimentación manteniendo la concentración de glucosa en un valor deseado, obteniendo notables mejoras en la productividad de cultivos de *B. subtilis*.

En aplicaciones industriales, los sensores ópticos son sumamente atractivos, ya que no son invasivos y son robustos (Riesenberg & Guthke, 1999). Así, se ha utilizado sensores de fluorescencia y sensores en el rango visible para estimar la biomasa en línea. A su vez se han utilizado sensores en el rango infrarrojo mediano o en el infrarrojo cercano para estimar la concentración de productos secundarios como el acetato (Macaloney et al., 1996). También se han utilizado sensores que miden la concentración de etanol para controlar la alimentación en cultivos de *S. cerevisiae* (Noronha, Wagner, Matheson, & Shiloach, 1999). Dichas estrategias de control son las de mayor interés, ya que permiten estimar de manera directa las variables

críticas del proceso. Desgraciadamente, son aún demasiado costosas para permitir su uso masivo.

Además de sensores físicos, también se han desarrollado una serie de sensores basados en modelos, o sensores virtuales. Dichos sensores utilizan mediciones en línea de variables indirectas combinadas con modelos matemáticos para estimar la concentración de productos de sobreflujo o concentración del sustrato limitante. Modelos altamente complejos de sobreflujo metabólico de microorganismos como (Xu et al. 1999; Dewasme, et al. 2011) han sido elaborados. Dewasme et al. (2011), posteriormente implementaron una estrategia de control mediante un filtro de Kalman extendido para predecir y controlar en línea la concentración de acetato en cultivos de alta densidad de *E. coli*.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Instrumentación y Control

El sistema utilizado que da cabida a los cultivos celulares se conoce como bioreactor. El bioreactor es el entorno en donde ocurre el crecimiento celular y la formación del producto recombinante, es decir donde ocurre la reacción de interés. El bioreactor es un sistema complejo, tanto en términos de instrumentación como en términos de control.

El sistema que utilizamos en este trabajo consiste de una estructura cilíndrica de vidrio, inmersa en una chaqueta térmica, con una tapa de acero inoxidable. Cuenta con entradas y salidas para medio líquido y gaseoso; además de un sistema de agitación, y sondas de temperatura, pH y oxígeno disuelto. Las entradas líquidas al sistema consisten del medio de cultivo, agentes de control de pH, y antiespumante, previamente esterilizados. Las entradas líquidas se realizan a través de mangueras de biopreno (Watson Marlow Tubing; diámetro 2.40 mm, diámetro externo 1.60 mm; Falmouth Cornwall, England) conectadas a cilindros de acero inoxidable de 1/8'' en la tapa del reactor. El flujo del medio líquido es manipulado mediante la acción de bombas peristálticas. En el caso de cultivos continuos, es posible acoplar una salida por rebalse al sistema, al igual que las entradas líquidas, el flujo es controlado por la acción de bombas peristálticas.

El ingreso del gas ocurre por la parte inferior del reactor, bajo las turbinas, a través de un microaspersor de 0,4 μm de porosidad. El flujo gaseoso, tanto de aire como

de oxígeno, es regulado por la acción de dos controladores másicos. La salida gaseosa por la parte superior del reactor está acoplada a un condensador para evitar las pérdidas de agua y sustancias volátiles originadas del metabolismo celular. Tanto la entrada como la salida gaseosa contienen filtros de aire PolyVent (0,2 μm , tipo PTFE, Whatman, USA) para mantener el sistema completamente estéril. El sistema está apropiadamente agitado mediante la manipulación del giro de un eje con dos turbinas Rushton a alturas modulables según el volumen de cultivo utilizado. Para evitar la formación de vórtice y reducir el esfuerzo de corte debido a la agitación, se dispone de un baffle interno.

La temperatura, pH, agitación y oxígeno disuelto son regulados por el sistema de control SIMATIC PCS7 (Siemens, Alemania) programado adecuadamente para el caso. El sistema de control dispone de una unidad de control PLC S7-400 (CPU 416, Siemens) y unidades remotas de I/O distribuidas, comunicadas por una red de tipo industrial (PROFIBUS DP). Allí se integran las señales de los sensores, así como las salidas hacia válvulas, bombas y controladores dedicados.

El oxígeno disuelto (DO) del medio fue medido mediante un electrodo tipo Clark (Oxymax, COS22D, Endress+Hauser Management AG, Reinach/BL, Switzerland; rango de medición: $1\text{e-}3$ a $20 \text{ mg}_{\text{O}_2}/\text{L}$); El pH mediante un electrodo de pH (Tophit, CPS471, Endress+Hauser Management AG, Reinach/BL, Switzerland; rango de medición: 0-14); y la temperatura del sistema mediante el sensor integrado de la sonda de DO (Pt1000, rango de medición; -15 - 135°C).

Las fracciones de dióxido de carbono y oxígeno en la corriente gaseosa de salida fueron medidas mediante el sensor BlueInOne Ferm (BlueSens Gas Sensor GmbH, Germany; rango de medición: O₂: 0-25% v/v, CO₂: 0-10% v/v). El flujo gaseoso de entrada fue controlado mediante flujómetros controladores máxicos (FMA-A2407, Omega Engineering, Inc., Stamford, USA). El flujo del medio de alimentación, antiespumante, y soluciones de control de pH fueron controlados por bombas peristálticas.

La temperatura fue controlada en el valor deseado (37°C y 30°C para *E. coli*, 30°C para *S. cerevisiae*) al manipular la temperatura de entrada del agua a la camisa térmica del reactor. Dicha acción fue realizada utilizando un control PI de rango dividido que manipula los flujos de las corrientes de agua caliente y fría hacia la camisa térmica.

El pH fue controlado en el valor deseado (6,7 y 5,5 para *E. coli* y *S. cerevisiae*, respectivamente) mediante la adición de hidróxido de amonio (25% v/v) o NaOH 3M como acción básica - y ácido fosfórico (25% v/v) cuando era requerido - mediante un esquema de control PI de rango dividido (bomba peristáltica con ácido y bomba peristáltica con base).

El oxígeno disuelto fue mantenido en el set-point (2,8 mg_{O₂}/L) mediante un control PI de rango dividido triple, que manipula secuencialmente la agitación (300-800 rpm), el flujo gaseoso (0,5-1,5 VVM) y el porcentaje de oxígeno en la corriente gaseosa (21-100% v/v).

La Figura 3-1 ilustra el diagrama de tuberías e instrumentación (P&ID) del bioreactor utilizado en el presente trabajo.

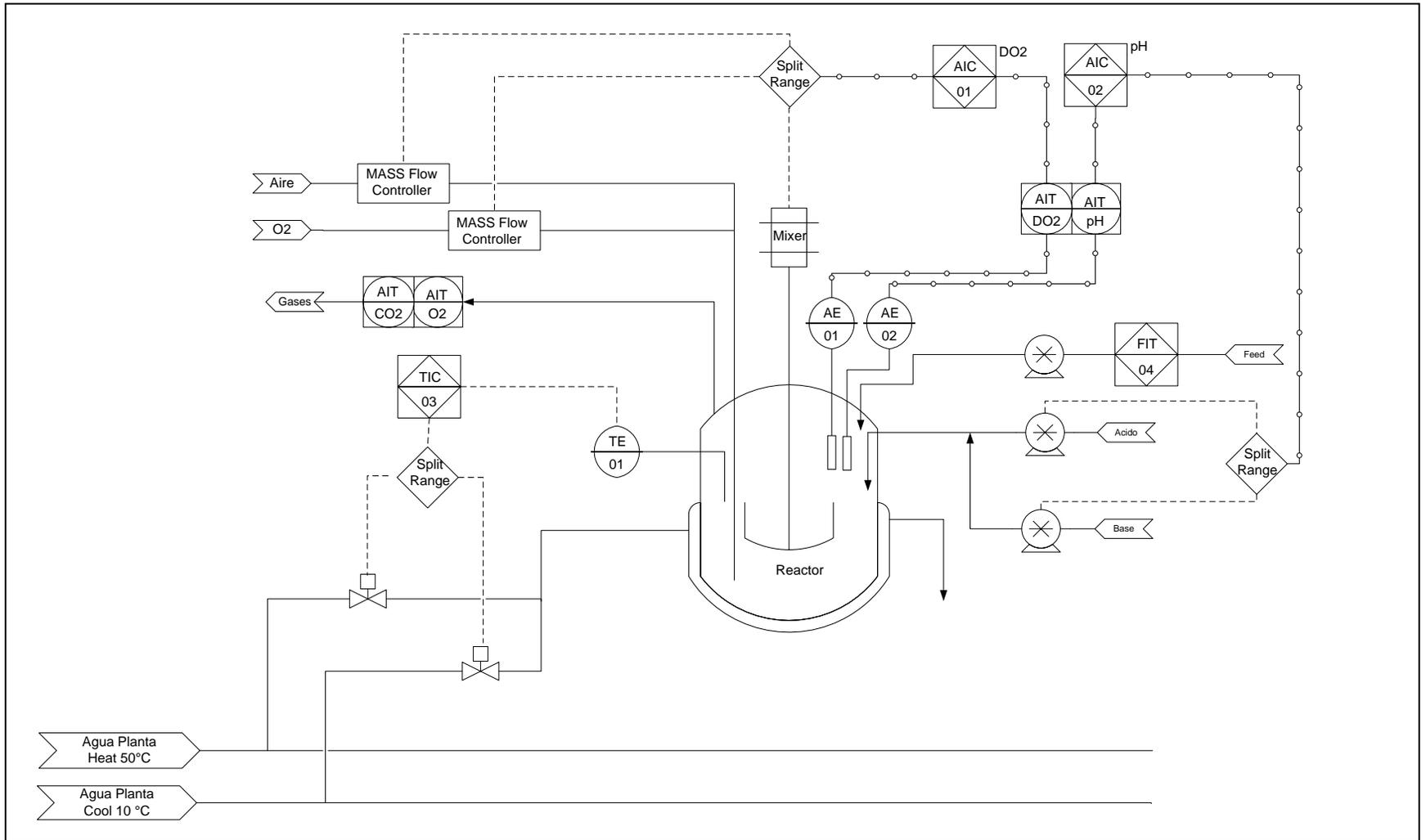


Figura 3- 1. P&ID del sistema utilizado.

3.2 Muestreo y Análisis

En los cultivos celulares se utilizó *E. coli* cepas JM109 (DE3) y BL21 (DE3) (ambas transformadas con el plásmido pET, Amp+) y *S. cerevisiae* cepa N30 (MATa, Ura-, Tryp-) transformada con el vector pLev, Ura+. Las cepas fueron conservadas en glicerol a -86°C. El preinóculo fue realizado en matraces agitados a 200 rpm a temperaturas de 30 y 37°C. El medio de cultivo utilizado para el preinóculo fue el mismo utilizado para el batch posterior, afín de reducir la fase lag. El cultivo batch era iniciado mediante la inoculación del 10% del volumen final del microorganismo crecido en el matraz en fase exponencial.

La densidad celular fue determinada mediante mediciones de densidad óptica (OD) a 600 nm con un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 (Kyoto, Japan). Las muestras celulares fueron diluidas con una solución a 0,9 % de cloruro de sodio, tal que se obtuviera una OD₆₀₀ de entre 0,1 y 0,6. Posteriormente, se utilizó una curva de calibrado estándar para convertir la medición de OD₆₀₀ a gramos de peso seco por litro (g DCW/L). Una unidad de densidad óptica a 600 nm corresponde a 0,42 g DCW/L y 0,3 g DCW/L para *E. coli* y *S. cerevisiae*, respectivamente.

Para medir la concentración celular de productos y sustratos, muestras de 1.5 mL de cultivo fueron centrifugadas a 22.000 g por 5 min a 4°C (Mikro 22R, Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Germany). El sobrenadante de las muestras de *S. cerevisiae* fue conservado a -86°C para posterior análisis. Los sobrenadantes de las muestras de *E. coli* fueron purificados en filtros PES de 0,22 µm, antes de almacenarlas a -86°C.

La glucosa, ácido acético y etanol fueron determinados mediante HPLC utilizando una columna de intercambio iónico Aminex HPX-87H (300x7,8 mm; Bio-Rad; Richmond, CA/Cambridge, MA). La columna fue eluída con una solución de ácido sulfúrico 2,5 mM y de acetonitrilo 10 mM a un flujo de 0,5 mL/min, a 55°C. Se utilizó un sistema HPLC Merck-Hitachi LaChrome Interface D7000, equipado con un inyector automático (Merck-Hitachi LaChrome L7250 autosampler), un horno (Merck-Hitachi LaChrome L7350 Column Oven), y dos detectores en serie: un detector de arreglo de diodos (Merck-Hitachi LaChrome L-7450A) y un detector de índice de refracción (Merck-Hitachi LaChrome L-7490).

Como estándares, se empleó una curva de calibrado externa y se adicionó a cada muestra 100 µL de una solución stock de 50 g/L de ácido pivalico por cada mL de muestra como estándar interno. Los cromatogramas fueron analizados utilizando el software D7000 Multi HSM Manager Software. La glucosa y el etanol fueron cuantificadas a través del detector IR, mientras que el ácido acético fue detectado a través del arreglo de diodos a 210 nm.

3.3 Medios de Cultivo

El medio batch del protocolo original de la empresa para cultivos de *E. coli* consiste de: KH_2PO_4 8,0 g/L; K_2HPO_4 12,3 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5,0 g/L; extracto de levadura 10,0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g/L; citrato de sodio 0,5 g/L; ácido cítrico 10,0 g/L; tiamina HCl 0,3 g/L; Glucosa 5,0 g/L; solución trazas 1,0 mL/L. El

medio de alimentación consiste de: Glucosa 570 g/L; MgSO₄ 7H₂O 19,0 g/L; extracto de levadura 95,0 g/L.

La solución de trazas para *E. coli* (Tao et al. 2012) consiste de : EDTA 0,84 g/L; CoCl₂ 6H₂O 0,25 g/L; MnCl₂ 4H₂O 1,50 g/L; CuCl₂ 0,15 g/L; H₃BO₃ 0,30 g/L; Na₂MoO₄ 2H₂O 0,25 g/L; Zn(CH₃COO)₂ H₂O 1,30; y Fe(III) citrato 10,0 g/L.

Para *S. cerevisiae*, Centrovet, utiliza el siguiente medio de cultivo para la fase batch: 20,0 g/L de glucosa, 5,0 g/L de hidrolizado de caseína, 6,7 g/L de YNB y 0,1 g/L de triptófano. El medio de alimentación contiene 600 g/L, 2,0 g/L de triptófano y 134 g/L de YNB.

El medio de cultivo elaborado en el presente trabajo (medio UC) fue diseñado utilizando la metodología propuesta por (Yee & Blanch, 1993a). Para determinar los rendimientos de los distintos sustratos en biomasa se realizaron quimiostatos limitados en dichos sustratos. Después de 3 a 5 tiempos de residencia, el estado estacionario fue confirmado por la medición en línea de oxígeno disuelto, acción de control de pH, y composición del gas de salida. El sistema fue muestreado en la corriente líquida de salida para posterior cuantificación de biomasa y analitos. Después de 5-10 muestras se validó el estado estacionario con la medición de biomasa. La limitación en sustrato fue validada posteriormente mediante la adición de pulsos concentrados del sustrato (2X [S]_{fed}) y el seguimiento del CO₂.

Suponiendo estado estacionario en el balance de masa del sustrato limitante, se tiene:

$$Y_{ZX} = \frac{\bar{X}}{Z_{IN} - \bar{Z}} \quad (3.1)$$

Donde \bar{X} y \bar{Z} son respectivamente las concentraciones de biomasa y de sustrato limitante, en el estado estacionario; Z_{IN} es la concentración del sustrato limitante del medio de alimentación e Y_{ZX} es el rendimiento del sustrato Z en biomasa. Validada la limitación en sustrato, se supuso que \bar{Z} era despreciable. Los rendimientos cruzados de los diferentes sustratos en glucosa (Y_{sz}) fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

$$Y_{sz} \left(\frac{gZ}{gGlu} \right) = \frac{Y_{sx} \left(\frac{gX}{gGlu} \right)}{Y_{zx} \left(\frac{gX}{gZ} \right)} \quad (3.2)$$

Los medios batch fueron definidos como medios limitados en glucosa. Para ello primero se definió la concentración inicial de glucosa (*E. coli* 10 g/L, *S. cerevisiae* 20 g/L).

El medio de alimentación correspondía a una solución concentrada de la fuente de carbono/energía más vitaminas y elementos traza. El nitrógeno fue suplementado a través de la acción de control básico (hidróxido de amonio) y no fue incorporado en el medio de alimentación, salvo en algunos casos que se señalarán. El resto de los macro y micro nutrientes fueron definidos para densidades celulares de 100 g DCW/L.

Para *E. coli* se realizaron quimiostatos limitados en: glucosa, potasio, nitrógeno, azufre, magnesio y fósforo. Para *S. cerevisiae* se realizaron quimiostatos limitados

en glucosa, fósforo, magnesio, nitrógeno (amonio y peptona), azufre, elementos traza y vitaminas.

La solución stock de trazas para *S. cerevisiae* (Van Hoek et al. 2000) consiste de: EDTA 15,0 g/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,84 g/L; H_3BO_3 1,0 g/L; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g/L; $\text{Zn}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,5 g/L; $\text{Cu}(\text{SO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4,5 g/L; $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,0 g/L; y KI 0,1 g/L.

La solución stock de vitaminas para *S. cerevisiae* (Van Hoek et al. 2000) consiste de: d(-)biotina 0,05 g/L; d(+)panthotenato de calcio 1,0 g/L; ácido nicotínico 1,0 g/L; mioinositol 25,0 g/L; tiamina hidrocloreuro 1,0 g/L; piridoxina hidrocloreuro 1,0 g/L; ácido p-aminobenzoico 0,2 g/L.

3.4 Políticas de Alimentación

3.4.1 pH-stato

El pH-stato es una estrategia de control realimentada que utiliza el efecto acidificante del crecimiento celular como acción de control ácida del sistema. Para ello se adaptó el sistema de control ácido/básico de los reactores, y se utilizó como agente de control básico hidróxido de sodio y como agente de control ácido la alimentación concentrada. Mediante un control tipo PI con una banda muerta de 0,1 unidades de pH, se controló el pH del sistema para mantener su valor a pH neutro (Beom Soo Kim et al., 2004). A pesar de que el medio de alimentación no acidifica de por sí el medio, sí lo hace cuando el microorganismo metaboliza el amonio, y por ende esta es una estrategia válida de control.

Dicha estrategia es utilizada para la producción de antígenos contra SRS en *E. coli*.

Durante el proceso mantienen la temperatura en 30°C, a un pH de 7.0.

3.4.2 Fed batch limitados en glucosa (GLFB)

Después de la limitación en glucosa, observada por un aumento en la concentración de oxígeno disuelto y un descenso en la concentración de CO₂ en la corriente gaseosa de salida, se inicia la fase alimentada. La política de alimentación es definida como una estrategia de crecimiento limitada en glucosa. Predefiniendo de antemano la tasa específica de crecimiento (bajo la tasa específica de crecimiento máxima), suponiendo el cuasi-estado estacionario en la concentración de glucosa y que la concentración de glucosa inicial es nula ($S_0 = 0$), la siguiente función de alimentación es obtenida de los balances de masa de glucosa y biomasa:

$$F_{in}(t) = \frac{X_0 \cdot V_0}{Y_{SX} \cdot S_{in}} \cdot \mu_{set}(t) \cdot \exp\left(\int_0^t \mu_{set}(t) dt\right) \quad (3.3)$$

donde $F_{in}(t)$ es el flujo instantáneo de alimentación, $\mu_{set}(t)$ es la tasa específica de crecimiento de referencia, Y_{SX} el rendimiento de biomasa en glucosa, S_{in} la concentración de glucosa en el medio de alimentación y t es el tiempo de alimentación ($t=0$ corresponde al inicio de la alimentación).

a) μ constante (fed batch exponencial)

Mantener una tasa específica de crecimiento constante - y bajo el valor crítico en el que existe sobreflujo metabólico - es la estrategia de alimentación prealimentada

más utilizada en cultivos fed batch. Integrando la ecuación (3.3) con μ constante en el tiempo, se obtiene:

$$F_{in}(t) = \frac{X_0 \cdot V_0}{Y_{SX} \cdot S_{in}} \cdot \mu_{set}(t) \cdot \exp(\mu_{set} \cdot t) = a \cdot e^{b \cdot t} \quad (3.4)$$

Observar que dicha alimentación corresponde a una función exponencial y por ende ésta estrategia se le conoce comúnmente como fedbatch exponencial. Es importante recalcar que al ser una estrategia prealimentada es muy sensible a los parámetros y por ende estos deben ser correctamente estimados.

▪ **Protocolo Centrovet**

El procedimiento para estimar los parámetros de la fase alimentada es el siguiente:

- estimación de la tasa específica de crecimiento máxima a partir de muestreo de la biomasa al comienzo de la fase exponencial del batch;
- predicción del tiempo de limitación y biomasa final en el batch, a partir de la concentración inicial de glucosa y la tasa específica calculada (Enfors, 2011):

$$S(t) = S_0 + \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot X_0}{Y_{SX}} \cdot (1 - \exp(\mu_{m\acute{a}x} \cdot t)) \quad (3.5)$$

$$Si \ S(t_{f,batch}) = 0 \rightarrow t_{f,batch} = \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \cdot \left(1 + S_0 \cdot \frac{Y_{SX}}{\mu_{m\acute{a}x} \cdot X_0}\right) \quad (3.6)$$

$$X_{f,batch} = X_0 \cdot \exp(\mu_{m\acute{a}x} \cdot t_{f,batch}) \quad (3.7)$$

- cálculo del flujo de alimentación (Fin) a partir de la ecuación (3.4) utilizando la tasa específica de crecimiento calculada del batch ($\mu_{m\acute{a}x}$), la biomasa y el

volumen final del batch, la concentración del sustrato limitante en la alimentación y el rendimiento de biomasa en sustrato (Y_{SX}). El rendimiento utilizado en la empresa corresponde a 0,50 g DCW/g Glu para cultivos de *E. coli* y de 0,34 para cultivos de *S. cerevisiae*.

b) μ exponencialmente decreciente

Reducir linealmente la tasa específica de crecimiento en la fase alimentada ha sido explorada previamente en (Tabandeh et al. 2008). A su vez, Villadsen & Patil (2007) definieron una estrategia prealimentada para mantener el consumo biológico de oxígeno constante y acorde a las capacidades de transferencia, la cual consistía en una reducción exponencial de la tasa específica de crecimiento.

En el presente trabajo se propone la siguiente función para reducir la tasa específica de crecimiento:

$$\mu_{set}(t) = (\mu_{m\acute{a}x} - \mu_{m\acute{i}n}) \cdot \exp(-b \cdot t) + \mu_{m\acute{i}n} \quad (3.8)$$

Donde $\mu_{m\acute{a}x}$, $\mu_{m\acute{i}n}$ y b son parámetros definidos estratégicamente. Particularmente, cuando $\mu_{m\acute{a}x} = \mu_{m\acute{i}n}$, la estrategia de alimentación corresponde a la clásica estrategia de alimentación exponencial a μ constante.

Reemplazando la ecuación (3.8) en la ecuación (3.3) e integrando se obtiene:

$$F_{in}(t) = \frac{X_0 \cdot V_0}{Y_{SX} \cdot S_{in}} \cdot \left((\mu_{m\acute{a}x} - \mu_{m\acute{i}n}) \cdot \exp(-b \cdot t) + \mu_{m\acute{i}n} \right) \cdot \exp\left(\frac{(\mu_{m\acute{a}x} - \mu_{m\acute{i}n})}{-b} \cdot (\exp(-b \cdot t) - 1) + \mu_{m\acute{i}n} \cdot t\right) \quad (3.9)$$

Se presume que dicha alimentación tiene las siguientes ventajas:

- Permite disminuir el estrés metabólico ocasionado por un cambio abrupto en la tasa específica de crecimiento desde la fase batch a la fase fed, haciendo una transición continua entre ambas.
- Permite diseñar estrategias acorde a las restricciones físicas de transferencia de oxígeno del sistema.
- Por último, es posible aumentar la productividad volumétrica del proceso, representado por el area A de la Figura 3-1.
- A diferencia de estrategias linealmente decrecientes la presente posee una asíntota horizontal, lo que permite mantener tasas específicas de crecimiento sin llegar a cero, aptas para la fase de inducción.

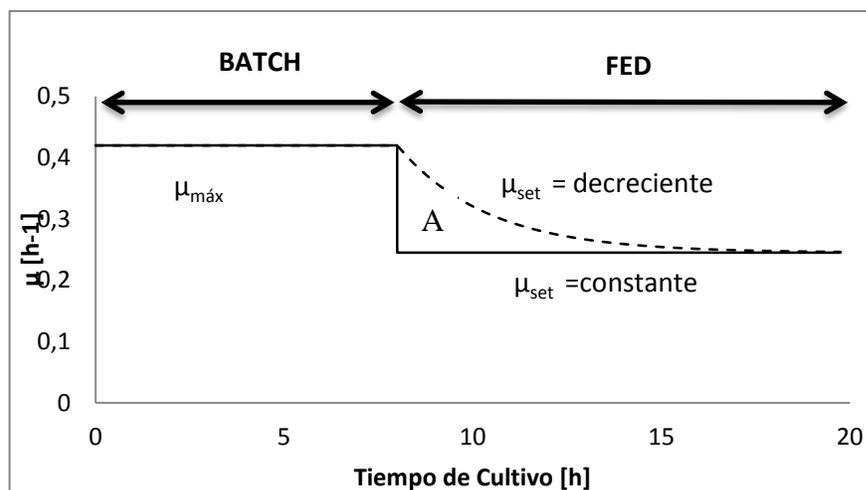


Figura 3- 2. Estrategia de alimentación exponencial decreciente comparada con μ constante.

3.5 Modelación del Metabolismo de Sobreflujo

Utilizando el modelo de Dewasme *et al.* (2011) se desarrolló un modelo modificado de crecimiento que considera sobreflujo metabólico. El modelo asume como fuente principal de energía la glucosa, que es también la fuente de carbono y el sustrato limitante del proceso. La tasa específica de consumo de glucosa es modelada asumiendo una cinética de Monod con inhibición del producto de sobreflujo metabólico:

$$q_{sT}(S, I_P) = q_{s\text{m}\acute{a}x} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot \frac{1}{1 + \frac{I_P}{K_{i,I_P}}} \quad (3.10)$$

en donde, S e I_P son las concentraciones de la glucosa y el producto del metabolismo de sobreflujo (acetato para *E. coli* y etanol para *S. cerevisiae*). q_{sT} es la tasa específica de consumo total de glucosa; y $q_{s\text{m}\acute{a}x}$ es la tasa específica de consumo máxima de glucosa. K_S es la constante de velocidad media y K_{i,I_P} , la constante de inhibición para dicho producto/sustrato.

El catabolismo oxidativo de la glucosa es determinado por cuellos de botella metabólicos internos y está asociado a la tasa crítica de consumo de oxígeno mediante una cinética de Monod:

$$q_{O,crit} = q_{O\text{m}\acute{a}x} \frac{DO}{K_O + DO} \quad (3.11)$$

Donde $q_{O\text{m}\acute{a}x}$, es la tasa específica de consumo de oxígeno máxima; K_O es la constante de velocidad media de oxígeno; y DO es la concentración de oxígeno

disuelto en mg/L. Cabe destacar, que si el cultivo no se limita en oxígeno el segundo término de la ecuación puede ser despreciada y se tiene que

$$q_{O,crit} = q_{O,máx}. \quad (3.12)$$

La glucosa es consumida en dos vías catabólicas, una vía oxidativa y una vía fermentativa. La vía oxidativa es altamente energética, y la glucosa es completamente oxidada en CO₂ y ATP.



La vía fermentativa, es menos eficiente energéticamente y descompone la glucosa sin consumo de oxígeno en metabolitos inhibitorios excretables (acetato y etanol) CO₂ y energía en la forma de ATP.



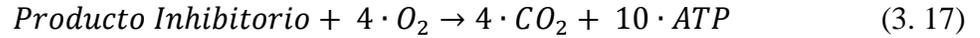
Si la tasa específica de consumo de glucosa es mayor que la tasa específica de consumo de oxígeno máxima equivalente, el consumo oxidativo de glucosa es máximo y el exceso de glucosa solo puede ser consumida a través de la vía fermentativa. Dicho principio es modelado mediante las siguientes ecuaciones:

$$q_{S_{ox}} = \text{Min} \left(q_{S_T}, \frac{q_{O,crit}}{Y_{SO}} \right) \quad (3.15)$$

$$q_{S_f} = \text{Max} (0, q_{S_T} - q_{S_{ox}}) \quad (3.16)$$

donde $q_{S_{ox}}$ y q_{S_f} son las tasas específicas de consumo oxidativo y fermentativo de glucosa, respectivamente.

De ser necesario el producto inhibitorio también puede ser consumido. El consumo catabólico del producto inhibitorio requiere de oxígeno y ocurre mediante la siguiente reacción:



En presencia de glucosa y del producto inhibitorio, el microorganismo prefiere consumir la glucosa. De existir oxígeno disponible después del consumo de glucosa, el producto inhibitorio puede ser consumido según el mínimo entre el oxígeno disponible para su consumo y una cinética de consumo de tipo Monod:

$$q_{IP,cons} = \text{Min} \left(q_{IP,máx} \cdot \frac{I_p}{K_{IP} + I_p}, (q_{O,crit} - q_{S_{ox}} \cdot Y_{SO}) / Y_{IPO} \right) \quad (3.18)$$

Así se tiene las siguientes tasas específicas de consumo y formación:

$$\text{Glucosa :} \quad q_S = q_{S_T} = q_{S_{ox}} + q_{S_f} \quad (3.19)$$

$$\text{P. Inhibitorio :} \quad q_{IP} = q_{S_f} \cdot Y_{SIP} - q_{IP,cons} \quad (3.20)$$

$$\text{Biomasa :} \quad \mu = q_{S_{ox}} \cdot Y_{S_{ox}X} + q_{S_f} \cdot Y_{S_fX} + q_{IP,cons} \cdot Y_{IPX} \quad (3.21)$$

donde $Y_{S_{ox}X} \left(\frac{g_{DCW}}{g_S} \right)$ es el rendimiento de biomasa en el consumo oxidativo de glucosa, $Y_{S_fX} \left(\frac{g_{DCW}}{g_S} \right)$ es el rendimiento de biomasa en el consumo fermentativo de glucosa, e $Y_{IPX} \left(\frac{g_{DCW}}{g_{IP}} \right)$ es el rendimiento de biomasa en el consumo oxidativo del producto inhibitorio.

$$\text{Oxígeno :} \quad q_O = q_{S_{ox}} \cdot Y_{S_{ox}O} + q_{IP,cons} \cdot Y_{IPO} \quad (3.22)$$

donde $Y_{S_{ox}O} \left(\frac{mg_{O_2}}{g_S} \right)$ es el rendimiento de oxígeno en el consumo oxidativo de glucosa, e $Y_{S_fX} \left(\frac{mg_{O_2}}{g_{IP}} \right)$ es el rendimiento de oxígeno en el consumo oxidativo del producto inhibitorio.

Y sus respectivos balances de masa son:

$$\frac{d(SV)}{dt} = -q_{S_T} \cdot XV + F_S \cdot S_{in} \quad (3.23)$$

$$\frac{d(XV)}{dt} = \mu \cdot XV \quad (3.24)$$

$$\frac{d(I_P V)}{dt} = q_{I_P} \cdot XV \quad (3.25)$$

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (3.26)$$

$$\frac{d(DO \cdot V)}{dt} = k_L a_{O_2} \cdot (DO^* - DO) \cdot V - q_{O_2} \cdot XV \quad (3.27)$$

Para integrar las reacciones catabólicas (3.13), (3.14) y (3.17) en el análisis (similar a lo realizado en el modelo de Xu et al. (1999)) y reducir el número de parámetros a estimar se planteó el siguiente supuesto:

$$Y_{(EX)S_{ox}} = Y_{(EX)S_f} = Y_{(EX)I_{P_{ox}}} \quad (3.28)$$

donde $Y_{(EX)\varphi}$ corresponde al rendimiento de biomasa en ATP $\left(\frac{mol_{ATP}}{g_{DCW}} \right)$ de la reacción φ (S_{ox} : consumo oxidativo de glucosa; S_f consumo fermentativo de glucosa; e $I_{P_{ox}}$: consumo oxidativo del producto inhibitorio). Vale decir, el requerimiento energético para la generación de la biomasa es igual independiente

de la vía catabólica de la cual provenga el ATP. La ecuación (3.28) puede ser expresada en términos de los rendimientos calibrados:

$$\frac{Y_{S_{ox}O} \cdot Y_{(OE)S_{ox}}}{Y_{S_{ox}X}} = \frac{Y_{S_f I_P} \cdot Y_{(I_P E)S_f}}{Y_{S_f X}} = \frac{Y_{I_P O} \cdot Y_{(OE)I_P ox}}{Y_{I_P X}} \quad (3.29)$$

donde $Y_{(OE)S_{ox}} \left(\frac{mol_{ATP}}{mg_{O_2}} \right)$ es el rendimiento de ATP en oxígeno en la reacción oxidativa de glucosa, $Y_{(I_P E)S_f} \left(\frac{mol_{ATP}}{g_{I_P}} \right)$ es el rendimiento de ATP en el producto inhibitorio en la reacción fermentativa de glucosa, e $Y_{(OE)I_P ox} \left(\frac{mol_{ATP}}{mg_{O_2}} \right)$ es el rendimiento de ATP en oxígeno en la reacción oxidativa del producto fermentativo.

A partir de las ecuaciones (3.13), (3.14) y (3.17) se calculan dichos rendimientos y la ecuación (3.28) queda:

$$\frac{Y_{S_{ox}O}}{Y_{S_{ox}X}} \cdot \left(\frac{1}{6,000} \frac{mol_{ATP}}{mg_{O_2}} \right) = \frac{Y_{S_f I_P}}{Y_{S_f X}} \cdot \left(\frac{1}{46} \frac{mol_{ATP}}{g_{I_P}} \right) = \frac{Y_{I_P O}}{Y_{I_P X}} \cdot \left(\frac{1}{12,800} \frac{mol_{ATP}}{mg_{O_2}} \right) \quad (3.30)$$

A partir de los parámetros antes definidos es posible calcular los siguientes parámetros:

$$q_{S,crit} = \frac{q_{O,m\acute{a}x}}{Y_{S_{ox}O}} \quad (3.31)$$

$$\mu_{m\acute{a}x} = q_{S,crit} \cdot Y_{S_{ox}X} + (q_{S,m\acute{a}x} - q_{S,crit}) \cdot Y_{S_f X} \quad (3.32)$$

$$\mu_{crit} = q_{S,crit} \cdot Y_{S_{ox}X} \quad (3.33)$$

$$Y_{OX_{ox}} = Y_{S_{ox}X} / Y_{S_{ox}O} \quad (3.34)$$

donde $\mu_{m\acute{a}x} (h^{-1})$ es la tasa específica de crecimiento máxima en régimen respiratorio-fermentativo, $\mu_{crit} (h^{-1})$ es la tasa específica de crecimiento crítica (sobre la cual

existe metabolismo de sobreflujo, e $Y_{OX_{ox}} \left(\frac{g_{DCW}}{m_{gO_2}} \right)$ es el rendimiento de biomasa en oxígeno en régimen oxidativo de glucosa.

3.6 Calibración de Parámetros

Los parámetros del modelo fueron estimados al minimizar el error cuadrático entre los datos experimentales y el modelo. Dado que no todas las variables fueron medidas simultáneamente y debido que las variables tienen distintas escalas, el error cuadrático fue normalizado por el número de mediciones y por promedio de la variable respectiva (Sacher et al., 2011). Así, se utilizó la siguiente función objetivo:

$$\text{Min}_{\Theta} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} \left(\frac{Y_{i,j}^{\text{model}} - Y_{i,j}^{\text{exp}}}{n_i \cdot \bar{Y}_i^{\text{exp}}} \right)^2 \quad (3.35)$$

donde Θ representa el espacio de los parámetros, $Y_{i,j}$ es la medición j de la variable i , m es el número de variables medidas (X, S, I_p, DO), y n_i e \bar{Y}_i^{exp} son el número de mediciones y el promedio experimental de la variable i , respectivamente.

El proceso de optimización fue resuelto numéricamente utilizando *SSm*, una rutina metaheurística desarrollada en MATLAB[®] por Egea et al. (2006). En nuestro caso, se encontró que el *solver* local *fminsearch* es efectivo para la optimización de parámetros. La iteración se detuvo al alcanzar el número máximo de evaluaciones (~ 40,000) y la mejor solución es extraída.

4. RESULTADOS

El presente trabajo consistió en la optimización de la producción de biomasa en cultivos celulares de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, en el marco de un proyecto InnovaCorfo otorgado a Centrovét en alianza con DICTUC SA.

4.1. Escherichia coli

Piscirickettsia salmonis es la bacteria Gram negativa que genera la Piscirickettsiosis o SRS, principal enfermedad de tipo sistémica que afecta al cultivo de salmónes en Chile. Los antígenos contra dicho patógeno son relativamente simples de producir en términos celulares, posiblemente debido al origen procarionte de estos. Centrovét utiliza a *E. coli* como factoría celular microbiana para producir dichos productos recombinantes.

Los principales cuellos de botella encontrados al utilizar *E. coli* como factoría celular se deben a la alta demanda de oxígeno que ésta requiere y a la formación de acetato como resultado del sobreflujo metabólico de la fuente carbonada.

El principal objetivo del trabajo con el presente microorganismo fue optimizar la producción de biomasa del sistema. Para ello el trabajo realizado fue caracterizar los parámetros productivos realizando un scale-down del protocolo de la empresa. Luego, mediante un modelo dinámico se caracterizaron los parámetros metabólicos del microorganismo en cultivos batch. Posteriormente, mediante simulación se estimó la biomasa máxima admisible según la demanda biológica de oxígeno y las

capacidades de transferencia máxima en la plataforma utilizada. La limitación en capacidades de transferencia de oxígeno fue liberada mediante la generación de una estrategia de control triple con enriquecimiento de oxígeno. Con dicha restricción liberada se procedió a generar estrategias de control prealimentadas que redujeran la formación de sobreflujo metabólico y capaces de alcanzar altas densidades celulares.

4.1.1. Scale-down proceso productivo

El primer paso para optimizar los parámetros productivos en la producción de proteínas recombinantes fue caracterizar los parámetros críticos del proceso utilizado en la empresa. Con el fin de tener un experimento control se replicaron ambos protocolos productivos a escala de laboratorio. La empresa actualmente desarrolla antígeno recombinante contra SRS crecido mediante dos técnicas diferentes: pH-stato y fed batch limitado en glucosa.

La Figura 4-1 muestra los resultados obtenidos en el scale-down de dicho proceso. Cabe notar que, en estas condiciones, la fase batch se desarrolló a una tasa específica de crecimiento de $0,81 \text{ h}^{-1}$ con metabolismo de sobreflujo (observado por el aumento de ácido acético). Luego de 6 horas, el cultivo se limitó en glucosa con lo que se inició la fase alimentada. El ácido acético producido en la fase batch fue posteriormente consumido, y luego de 12 horas la biomasa alcanzada fue de 13 g DCW/L. Tras dicho punto la señal de pH dejó de variar y en consecuencia el cultivo dejó de ser alimentado.

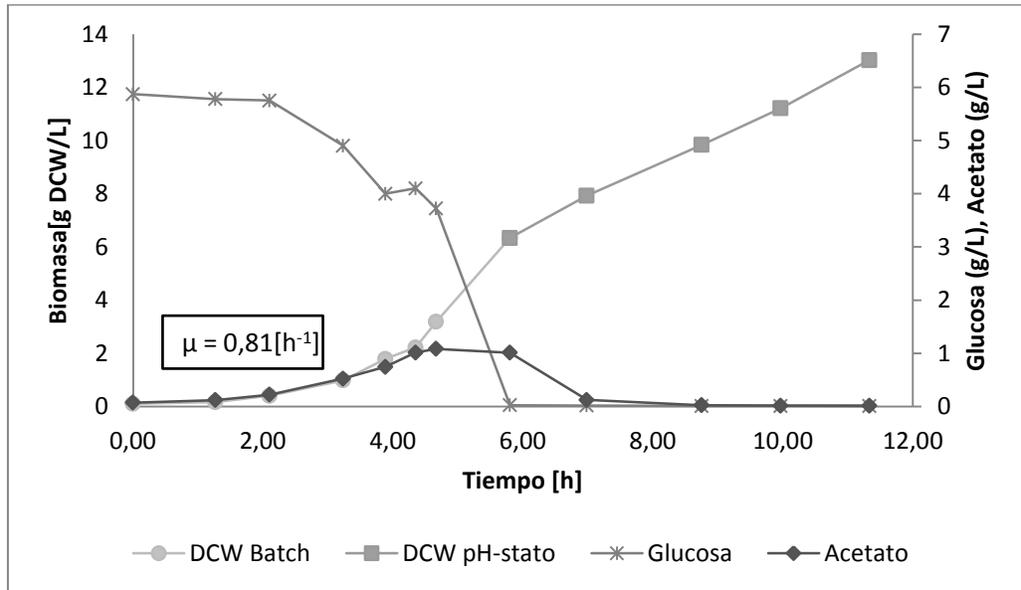


Figura 4- 1. Scale down pH-stato *E. coli*. Dinámica de biomasa, glucosa y ácido acético vs tiempo desde inoculación

Para realizar el scale-down de cultivos fed batch exponenciales limitados en glucosa, se escaló la función de alimentación utilizada por Centrovét. La tasa específica de crecimiento fue fijada a $0,35 \text{ h}^{-1}$. La Figura 4-2 muestra la dinámica de crecimiento utilizando dicha estrategia de alimentación. La biomasa sigue dos curvas exponenciales de crecimiento: una a la tasa específica de crecimiento máxima en la fase batch; y una segunda fase de crecimiento en la fase fed a una tasa específica menor. Cabe mencionar que el ácido acético producido en la fase batch es posteriormente consumido. Tras 10 horas de cultivo la biomasa final alcanzada fue de 15 g DCW/L . Posteriormente, el crecimiento cesa y la glucosa alimentada comienza a acumularse, diluyendo la concentración celular.

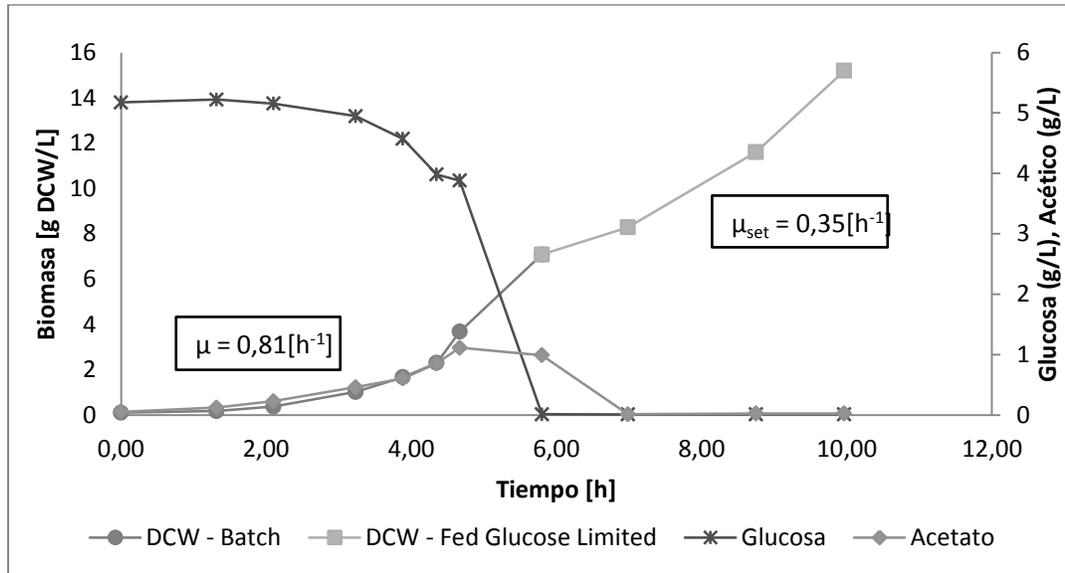


Figura 4- 2. Scale-down Fed batch exponencial *E. coli*. Dinámica de biomasa, glucosa y acetato vs tiempo de inoculación; μ_{set} 0,35 hr-1.

La Tabla 4-1 compara la productividad volumétrica y concentración final de ambas estrategias analizadas. La estrategia fed batch exponencial no solo alcanza mayores concentraciones finales, sino también mayores productividades volumétricas (*i.e.* alcanza dichas concentraciones en menos tiempo). La estrategia de control mediante pH requiere que exista un aumento de pH para accionar la alimentación, luego es una estrategia extremadamente conservadora y por lo mismo tiene productividades inferiores comparadas con alimentación exponencial. Esta última es una estrategia de alimentación prealimentada que fija la tasa de crecimiento celular. Dicha estrategia genera mayores productividades dado que mantiene un crecimiento exponencial, pero a la vez es más riesgosa ya que no cuenta con un

control del proceso. Sin embargo, para minimizar este riesgo -y también la formación de acetato- se puede fijar la alimentación tal que el microorganismo se replique a tasas de crecimiento inferiores a la crítica para asegurarse de que no exista exceso de sustrato.

Tabla 4- 1 Concentración final, tiempo y productividad volumétrica para cultivos fed batch y pH-stato de E. coli cepa BL21 (DE3) en medio de cultivo Centrovét.

	Concentración Final [g DCW/L]	Tiempo [h]	Productividad Volumétrica [g DCW/L/h]
Fed Batch	15	8,6	1,7
pH-stato	13	10	1,3

4.1.2. Caracterización del metabolismo de sobreflujo

La correcta caracterización de los parámetros cinéticos de sobreflujo de *E. coli*, además de permitir diseñar estrategias de alimentación acorde a las características metabólicas de la factoría celular, permite comparar el efecto de diferentes cepas o de diferentes variables operacionales en el metabolismo de sobreflujo. Utilizando el modelo descrito en la sección 3.5 se calibró la dinámica de crecimiento de dos cepas de *E. coli* diferentes: BL21 (DE3) y JM109 (DE3), ambas transformadas con el vector pET. Para ello se realizaron cultivos batch con el medio definido según el protocolo de la empresa a 30°C y a un pH de 7.0 con acción de control básica hidróxido de sodio. Las condiciones de transferencia fueron mantenidas al máximo permisible por las restricciones físicas del reactor, *i.e.* 800 rpm y 1.5 VVM de aire.

Las figuras 4-3 y 4-4 muestran que los modelos predicen satisfactoriamente la fase batch de crecimiento exponencial de las dos cepas de *E. coli* estudiadas a una tasa específica de crecimiento máxima, con formación de acetato. Al alcanzar la limitación en glucosa, lo que coincide con el máximo de ácido acético, el microorganismo comienza a consumir acetato provocando un leve aumento en biomasa. Dado que el consumo de acetato requiere de oxígeno, se produce un consumo adicional de oxígeno posterior a la limitación en glucosa, lo que condice muy bien con los resultados experimentales obtenidos. En el caso de *E. coli* cepa JM109 (DE3), el acetato no fue consumido completamente por lo que no se

observa el mismo efecto que para *E. coli* cepa BL21 (DE3), donde el acetato si fue consumido en su totalidad.

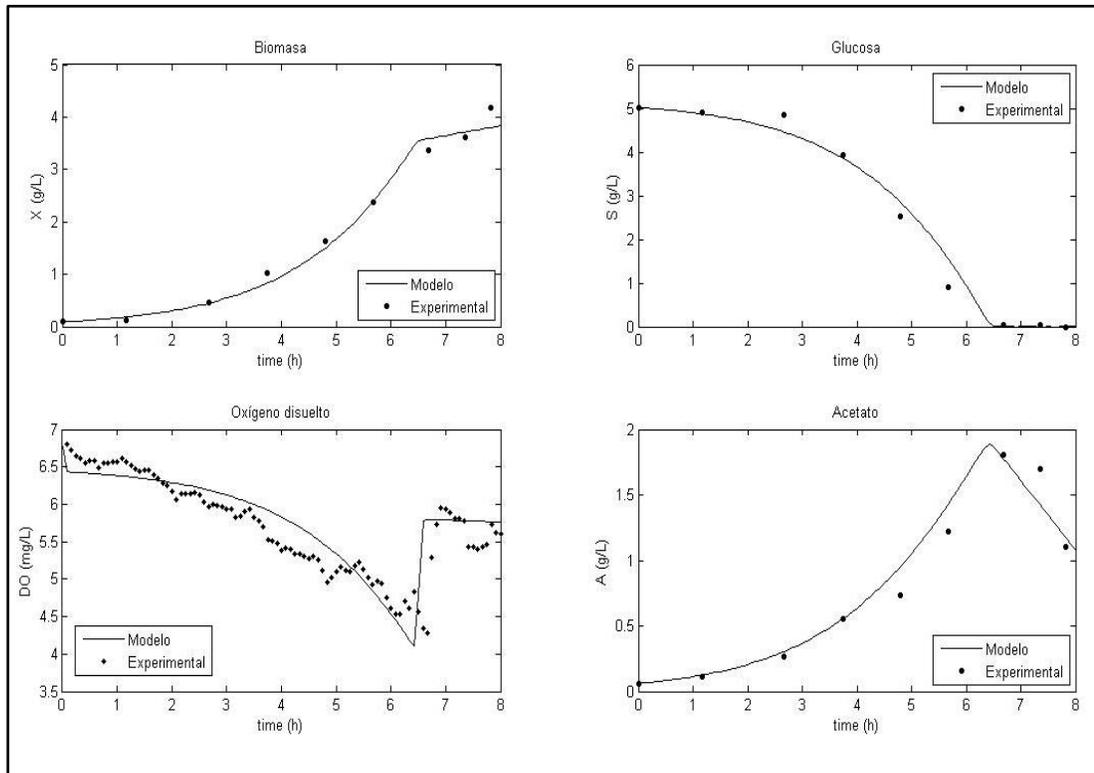


Figura 4- 3. Calibración de un modelo de 4 variables del cultivo batch de *E. coli* cepa JM109 (DE3), medio de cultivo CV, pH=7.0, T=30°C, Flujo Aire 1 VVM y agitación 800 rpm.

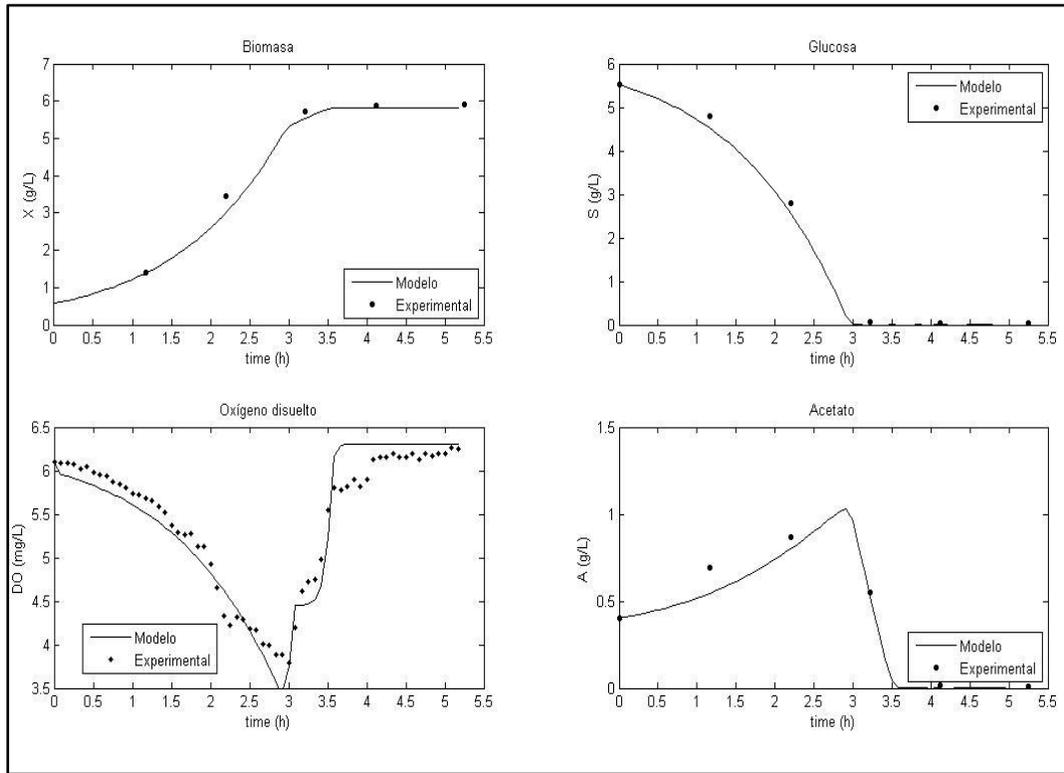


Figura 4- 4. Calibración de un modelo de 4 variables del cultivo batch de *E. coli* cepa BL21 (DE3), medio de cultivo CV, pH=7.0, T=30°C, Flujo Aire 1 VVM y agitación 800rpm.

La Tabla 4-2 resume los parámetros calibrados del modelo. Se puede observar que la cepa BL21 (DE3) tiene mayor rendimiento de biomasa en glucosa (Y_{SX}), mayor tasa específica de consumo de glucosa crítica ($q_{S,crít}$) y menor tasa específica máxima de formación de acetato ($q_{a,máx}$). A valores mayores de Y_{SX} la conversión de sustrato a biomasa es mayor, lo que se traduce en una mayor eficiencia del uso de la fuente de carbono. Valores mayores de $q_{S,crít}$ significan que menor cantidad

de glucosa ($q_{s,máx} - q_{s,crít}$) ocurre a través de la vía fermentativa. A su vez valores mayores de $q_{a,máx}$ implican mayores velocidades de consumo de ácido acético. Dichos parámetros demuestran la superioridad de utilizar la cepa BL21 (DE3) comparada con la cepa JM109 (DE3) a la hora de producir cultivos de alta densidad celular de E. coli.

Tabla 4- 2. Parámetros calibrados de modelo dinámico con formación y consumo de acetato para cultivos batch de cepas JM109 (D3) y BL21 (D3).

Parámetro	JM109 (D3)	BL21 (D3)	Origen y Fuente
$Y_{S_{ox}O} \left(\frac{mg_{O_2}}{g_{Glu}} \right)$	254	173	Parámetro calibrado
$q_{O,máx} \left(\frac{mg_{O_2}}{g_{DCW} \cdot h} \right)$	97,6	115,1	Parámetro calibrado
$q_{S,máx} \left(\frac{g_{Glu}}{g_{DCW} \cdot h} \right)$	0,98	1,03	Parámetro calibrado
$Y_{IPX} \left(\frac{g_{Glu}}{g_{DCW} \cdot h} \right)$	0,35	0,51	Parámetro calibrado
$q_{IP,máx} \left(\frac{g_{IP}}{g_{DCW} \cdot h} \right)$	0,15	0,38	Parámetro calibrado
$Y_{SfIP} \left(\frac{g_{IP}}{g_{Glu}} \right)$	0,73	0,50	Ecuación (3.30)
$Y_{IPO} \left(\frac{mg_O}{g_{IP}} \right)$	190	191	Ecuación (3.30)
$Y_{S_{ox}X} \left(\frac{g_{DCW}}{g_{Glu}} \right)$	1	1	Bae et al., (1997); Xu et al., (1999)
$Y_{SfX} \left(\frac{g_{DCW}}{g_{Glu}} \right)$	0,38	0,38	Bae et al., (1997); Xu et al., (1999)
$K_S \left(\frac{g_{Glu}}{g_L} \right)$	0,05	0,05	(Xu et al., 1999)
$K_{IP} \left(\frac{g_{IP}}{g_L} \right)$	0,05	0,05	Paalme et al., (1997)
$K_{i,IP} \left(\frac{g_{IP}}{g_L} \right)$	5	5	(Xu et al., 1999)
$k_L a \text{ (} h^{-1} \text{)}$	140	202	Método Dinámico (Félix García-Ochoa & Gomez, 2004)
$DO^* \left(\frac{mg_{O_2}}{L} \right)$	6,5	6,3	Ley de Henry (Ec. 2.3)

A partir de las ecuaciones (3.31), (3.32), (3.33) y (3.34) se calculan los parámetros $q_{S,crit}$, $\mu_{m\acute{a}x}$, μ_{crit} e $Y_{OX_{ox}}$ los cuales se resumen en la Tabla 4-3.

Tabla 4- 3. $\mu_{m\acute{a}x}$, μ_{crit} e $q_{cO,m\acute{a}x}$ de cepas JM109 (D3) y BL21 (D3)

Parámetro	BL21 (D3)	JM109 (D3)
$q_{S,crit} \left(\frac{g_{Glu}}{g_{DCW} \cdot h} \right)$	0,38	0,67
$\mu_{m\acute{a}x} (h^{-1})$	0,61	0,80
$\mu_{crit} (h^{-1})$	0,38	0,66
$Y_{OX_{ox}} \left(\frac{g_{DCW}}{g_{O_2}} \right)$	3,93	5,78

Notar que la cepa BL21 (DE3) tiene una tasa específica de crecimiento crítica notoriamente superior a la cepa JM109 (DE3) (0.66 versus 0,38 h⁻¹).

Adicionalmente, es posible observar que, a pesar de que la cepa BL21 (DE3) tenga un menor $q_{S,m\acute{a}x}$, el menor valor de $q_{S,crit}$ combinado con un mayor rendimiento hace que la tasa específica de crecimiento sea superior al de la cepa JM109 (DE3). Por lo tanto, la cepa BL21 (DE3) es capaz de crecer más rápidamente, con un mejor rendimiento y con menor sobreflujo metabólico.

La tasa específica de crecimiento crítica es de suma importancia a la hora de diseñar cultivos fed batch exponenciales, dado que la tasa de crecimiento fijada ha de ser tal que maximice la productividad volumétrica del cultivo y que a la vez

minimice la formación de acetato. Según la calibración del modelo antes expuesto es recomendable fijar la tasa de crecimiento para la cepa BL21 (D3) a valores inferiores a $\mu_{crit} = 0,66 \text{ h}^{-1}$ para evitar la formación de acetato (i.e. $\mu_{set} < 0,66 \text{ h}^{-1}$). Cabe destacar que dicho valor debe ser validado experimentalmente, y que su valor depende del medio de cultivo y variables de proceso utilizadas.

Simulación de OUR y comparación con OTR_{max}

El control del oxígeno disuelto (DO) es un aspecto fundamental para el crecimiento de microorganismos con fines productivos. Dado que el consumo biológico de oxígeno depende fuertemente de la biomasa, los cultivos de alta densidad celular requieren de suministros continuos y crecientes de oxígeno.

Para evaluar la biomasa máxima posible de alcanzar según las capacidades máximas de transferencia de oxígeno del sistema (OTR_{max}), realizamos simulaciones de cultivos fed batch limitados en glucosa a tasas específicas de crecimiento constantes. La restricción de transferencia de oxígeno se obtiene de igual la tasa de transferencia de oxígeno (OTR) con la de consumo (OUR) de la ecuación (2.2):

$$OTR_{m\acute{a}x} = k_L a_{m\acute{a}x} \cdot (DO^* - DO(t)) = OUR = \frac{\mu \cdot X(t)}{Y_{Ox}} \quad (4.1)$$

En donde $OTR_{m\acute{a}x}$ corresponde a la tasa global de transferencia máxima de oxígeno; OUR la tasa global de consumo biológico de oxígeno; $k_L a_{m\acute{a}x}$ la constante volumétrica de transferencia de masa para el oxígeno (202 h^{-1}); y DO^* es la solubilidad máxima de oxígeno en el medio, la que depende de la concentración

de oxígeno en la corriente gaseosa, la presión y la temperatura. Para una concentración de oxígeno disuelto de $2 \text{ mg}_{O_2}/L$ se evaluaron dos tasas globales de transferencia máxima: $OTR_{m\acute{a}x,1}$ ($850 \text{ mg}_{O_2}/L$; $[O_2]_{aire} = 0,21 \text{ v/v}$) y $OTR_{m\acute{a}x,2}$ ($6700 \text{ mg}_{O_2}/L$, $[O_2]_{O_2} = 1 \text{ v/v}$). Utilizando una estrategia de alimentación limitada en glucosa a una tasa específica de crecimiento constante (bajo la tasa a la que ocurre metabolismo respiro-fermentativo), se simuló el consumo biológico de oxígeno y contrastó con las capacidades de transferencia máximas (Figura 4-5).

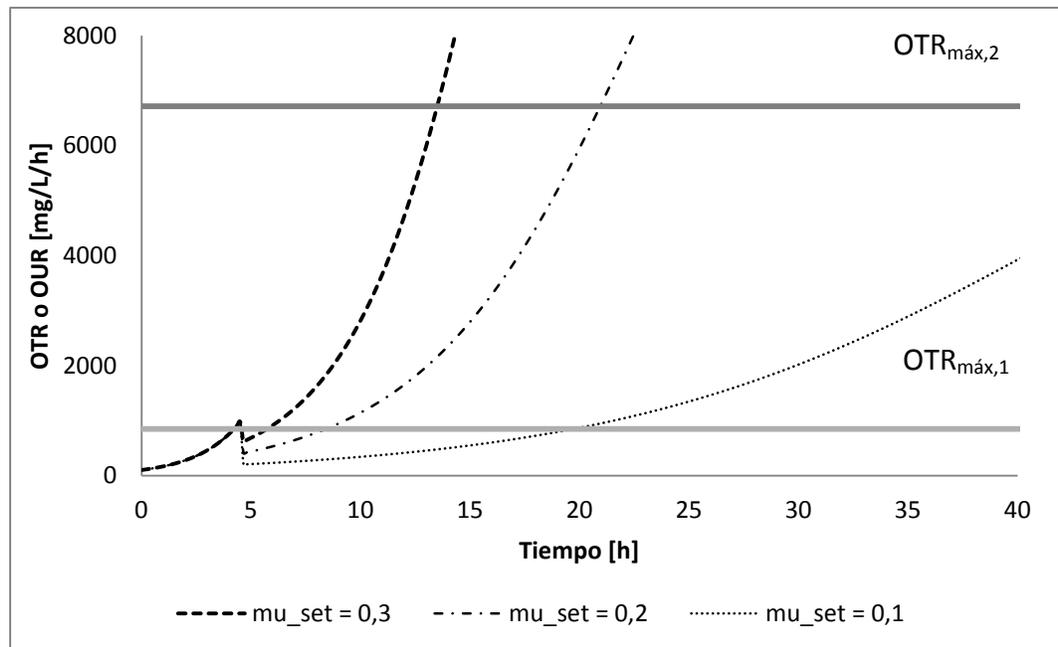


Figura 4- 5.Simulación de tasa global de consumo biológico de oxígeno en cultivos fed batch limitados en glucosa de *E. coli* BL21 (DE3). Comparación con capacidades de transferencia máximas sin ($OTR_{m\acute{a}x,1}$) y con enriquecimiento de oxígeno ($OTR_{m\acute{a}x,2}$)

De la simulación de la Figura 4-5 se estimó el tiempo en el cual la tasa global de transferencia es igual a la tasa global de consumo, y con ello se estimó la biomasa en dicho instante. La Figura 4-6 resume los resultados obtenidos. Mediante una estrategia de control con enriquecimiento de oxígeno es posible alcanzar cultivos de densidades celulares de 200 OD. A su vez es posible observar la dependencia de la tasa específica de crecimiento con la biomasa máxima admisible.

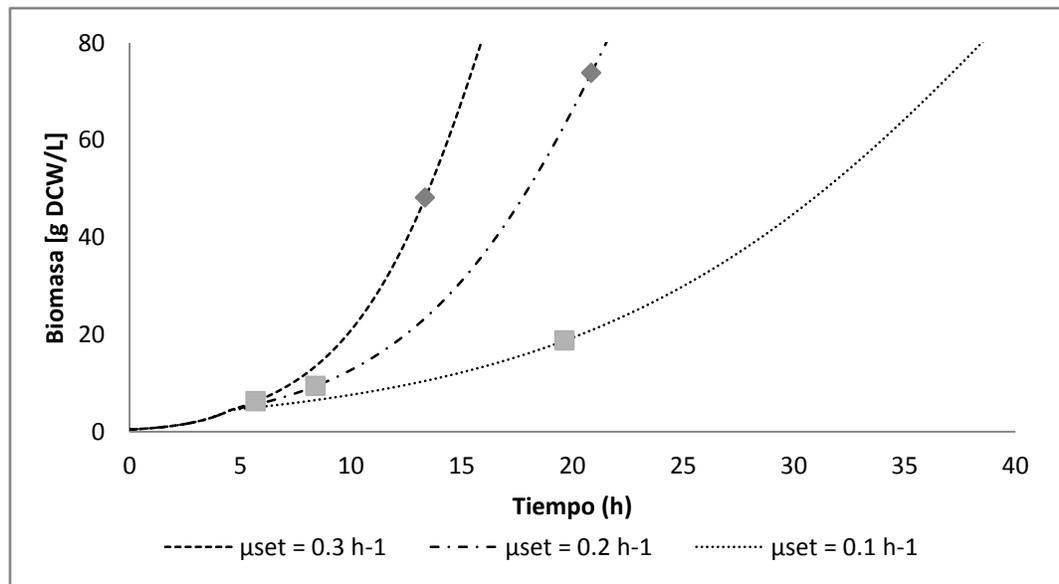


Figura 4- 6. Estimación de biomasa máxima admisible según capacidad de transferencia máxima de oxígeno en cultivos fed batch limitados en glucosa a tasas específicas de crecimiento constante de *E. coli* BL21 (DE3).

Simbología: (■) biomasa alcanzada con $OTR_{m\acute{a}x,1}$; (◆) biomasa alcanzada con $OTR_{m\acute{a}x,2}$

En el Anexo A se muestra un artículo elaborado para diseñar una estrategia de control simple de oxígeno disuelto. Dicha estrategia permite alcanzar elevados niveles de biomasa en condiciones aeróbicas manipulando tres variables de proceso: agitación, aireación y oxigenación. Dicha estrategia fue desarrollada utilizando un esquema de control de rangos divididos, el cual fue diseñado de manera que la acción del controlador fuera lineal con respecto a la máxima tasa de transferencia posible ($K_L a \cdot DO^*$). Los parámetros del controlador fueron estimados mediante simulación y luego validados en cultivos fed batch de *Escherichia coli*.

4.1.3. Diseño del Medio de Cultivo

Con el fin de estimar las necesidades nutricionales de la factoría celular utilizada se replicó la estrategia utilizada por (Yee & Blanch, 1993b). Con este fin, se realizaron 6 quimiostatos limitados en glucosa, nitrógeno, azufre, fosforo, magnesio y potasio, respectivamente. Los medios de cultivo fueron definidos para alcanzar una biomasa de 2,5 g DCW/L y se muestran en la Tabla 4-4.

. Una vez transcurridos 3 tiempos de residencia, se muestreó por la corriente de salida el cultivo, y con ello se determinó la biomasa alcanzada en estado estacionario (Figura 4-7). Cabe destacar que los quimiostatos limitados en magnesio y potasio dieron resultados erróneos y no se consideraron en el análisis. Para dicho caso, los rendimientos fueron estimados a partir de los resultados obtenidos por (Yee & Blanch, 1993a) (Tao et al., 2012).

Tabla 4- 4. Definición medios de cultivo de quimiostatos para el cálculo de rendimientos.

Nutrientes (g/L)	Limitado Glu	Limitado K	Limitado N	Limitado S	Limitado Mg	Limitado P
Glucosa	5,12	42,75	26,25	42,00	22,11	44,21
MgSO4 7H2O	0,97	5,70	4,99	0,00	0,08	4,20
MgCl2 6H2O	0,00	0,00	0,00	3,99	0,00	0,00
CaCl2 2H2O	0,03	0,15	0,13	0,11	0,11	0,11
Ácido cítrico H2O	0,51	3,00	0,00	2,10	0,22	2,21
NH4Cl	1,54	9,00	0,79	6,30	6,63	7,52
FeSO4 7 H2O	0,05	0,30	0,26	0,00	0,22	0,22
FeCl2 4H2O	0,00	0,00	0,00	0,21	0,00	0,00
KH2PO4	0,97	0,00	4,99	3,99	4,20	0,28
KCl	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	2,21
(NH4)2HPO4	0,00	5,70	0,00	0,00	0,00	0,00
(NH4)2SO4	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
Tiamina-HCl	0,03	0,15	0,13	0,11	0,11	0,11
Ampicilina disodio	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Antiespumante (mL/L)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20

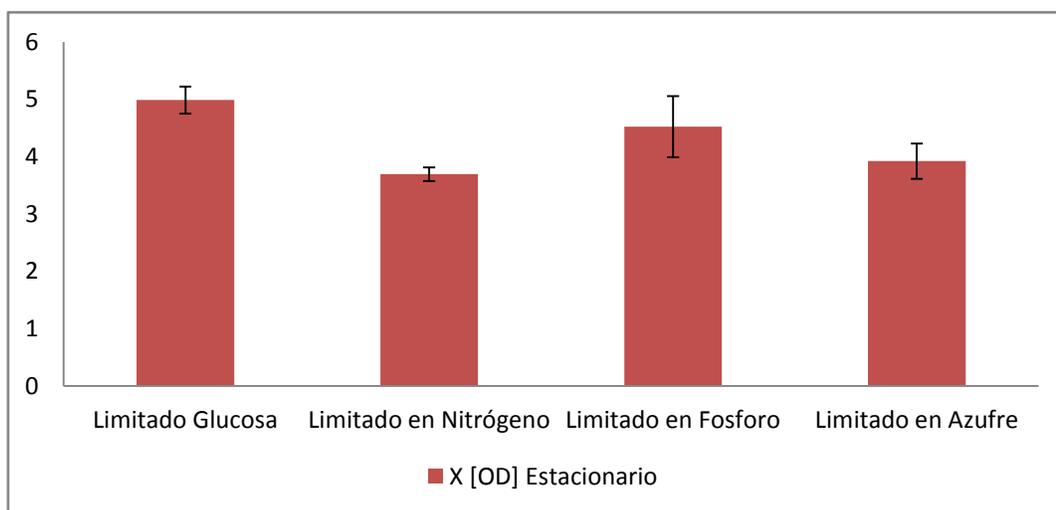


Figura 4- 7. Determinación biomasa de *E coli* cepa BL21 (DE3) en estado estacionario para quimiostatos limitados en glucosa, nitrógeno, fosforo y azufre

Para validar que los valores obtenidos efectivamente correspondan a cultivos limitados en el sustrato en cuestión, tras finalizar 3 horas de muestreo en estado estacionario se realizaron pulsos del nutriente limitante (concentración 2 veces aquella de la alimentación). Se siguió el dióxido carbono gaseoso para validar la limitación: si el cultivo estaba efectivamente limitado debiera aumentar el CO_2 , de lo contrario este debía mantenerse constante. La Figura 4-8 ilustra los resultados obtenidos para el quimiostato limitado en glucosa, para el resto de los nutrientes el resultado fue equivalente.

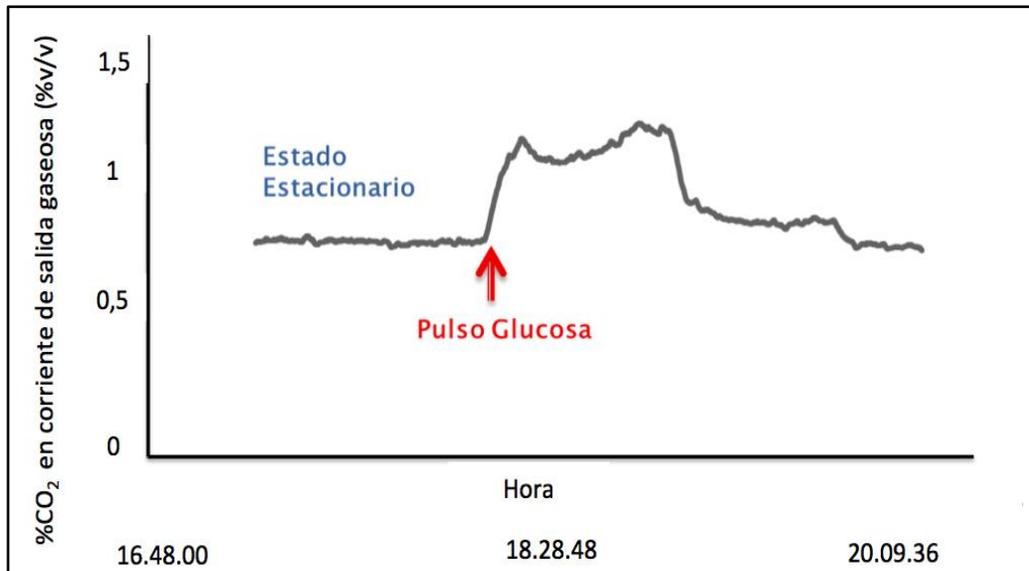


Figura 4- 8. Validación de la limitación en glucosa en quimiostato con *E. coli* BL21 (DE3) determinado según la composición en CO_2 de la corriente gaseosa.

La Tabla 4-5 muestra la concentración elemental del sustrato limitante y la biomasa en estado estacionario obtenida. Utilizando la ecuación 3.1 se calcularon los rendimientos específicos para cada sustrato.

Tabla 4- 5. Rendimientos biomasa/sustrato limitante en quimiostatos.

	Limitado Glucosa	Limitado en Nitrógeno	Limitado en Fosforo	Limitado en Azufre
Biomasa Estacionario [gDCW/L]	2,10	1,55	1,90	1,65
Sustrato Limitante [g/L]	5,12	0,21	0,063	0,0072
Y_{sx} [gDCW/gZ]	0,41	7,52	30,18	94,93

La Tabla 4-6 compara los valores obtenidos experimentales con aquellos obtenidos en el artículo científico mencionado. Tomando una posición conservadora se escogió el rendimiento menor (en rojo) entre ambos, de modo de tener una mayor concentración de los sustratos no limitantes.

Tabla 4- 6. Rendimientos de biomasa en glucosa, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio y magnesio [g DCW/g sustrato limitante] para *E. coli*.

PUC: Resultados experimentales; Yee & Blanch: Literatura consultada.

Y_{zx}	Glucosa	Nitrógeno	Fósforo	Azufre	Potasio	Magnesio

PUC	0,4	7,9	31,8	238,4	-	-
Yee & Blanch	0,4	10,0	34,0	163,0	53,0	278,0

Con el fin de definir un medio de cultivo limitado en glucosa, se calcularon los rendimientos de los diferentes sustratos en glucosa, mediante la ecuación (3.2). La Tabla 4-7 muestra los rendimientos de los diferentes sustratos en glucosa.

Tabla 4- 7. Rendimientos sustrato/glucosa para *E coli* cepa BL21 (DE3).

	Nitrógeno	Fosforo	Azufre	Potasio	Magnesi o
$Y_{SZ} \left(\frac{g_Z}{g_{Glu}} \right)$	0.054	0.014	0.0027	0.0083	0.0016

Se definió arbitrariamente una concentración de 10 g/L de glucosa para el batch y el resto de los nutrientes fueron definidos acorde a la siguiente ecuación:

$$[Z] \geq 2 \cdot Y_{SZ} \cdot 10 \left[\frac{g_{glucosa}}{L} \right] \quad (4.2)$$

Cabe destacar que la multiplicación del rendimiento por 2 es para que haya exceso del nutriente no limitante. Dado que estos datos corresponden a valores elementales del sustrato, fueron corregidos según peso molar y coeficientes respectivos para definir el medio de cultivo. Análogamente se utilizó la misma estrategia para definir la alimentación fijando la concentración de glucosa en 300

g/L y considerando solo requerimientos de amonio y magnesio. La Tabla 4-8 muestra el medio de cultivo definido.

Cabe destacar que la concentración de ácido cítrico y tiamina utilizadas corresponden a aquellos valores utilizados por Centrovét, mientras que las de elementos trazas, ácido cítrico y hierro fueron obtenidas de literatura (Felix Garcia-Ochoa & Gomez, 2009).

Finalmente, la Tabla 4-9 ilustra cuántas veces se encuentran los nutrientes distintos a glucosa respecto a la cantidad requerida. Se puede observar, que aquellos sustratos no suministrados en la alimentación (fosforo y potasio) se encuentran 30 veces por sobre el requerimiento. Esto implica que se podría alcanzar una biomasa 30 veces el batch ($30 \times 4,2 \text{ gDCW/L} = 126 \text{ gDCW/L}$). Por dicho motivo, y por problemas de precipitación en la alimentación, no se suministran en la alimentación.

Tabla 4- 8. Medio de Cultivo Definido PUC para cepa recombinante

BL21 (DE3) de *E coli*.

	Batch	Alimentación
Glucosa [g/L]	10	300
MgSO ₄ 7H ₂ O [g/L]	1	6
CaCl ₂ 2H ₂ O [g/L]	0.07	0
NH ₄ Cl [g/L]	4.15	65.4

KH ₂ PO ₄ [g/L]	8	0
K ₂ HPO ₄ [g/L]	12.3	0
KCl [g/L]	4	0
Ácido cítrico H ₂ O [g/L]	1	0
FeSO ₄ 7 H ₂ O [g/L]	0.1	0
Tiamina-HCl [g/L]	0.05	2.9
Ampicilina disodio [g/L]	0.1	1.4
Antiespumante (mL/L)	0.4	10
Elemento Traza Centrovit (mL/L)	0.5	0

Tabla 4- 9. Masa nutriente suministrada/masa nutriente requerida según rendimientos calculados.

Z	(gr Z/gr GLU)/Y _{sz}	
	BATCH (Glu = 10 g/L)	FED (Glu = 300 g/L)
Mg	6.23	1.25
S	5.25	0.97
N	2.00	1.05
P	29.59	0
K	25.27	0

Una vez definido el medio de cultivo, el siguiente paso fue validar la correcta definición de éste. Para ello, se realizó un quimiostato con el medio antes definido afín de verificar que no existiera carencia en ningún otro nutriente diferente a glucosa Figura 4-9.

Los resultados experimentales validan que el medio está óptimamente definido. La adición de ningún otro nutriente, incluso sustratos complejos como el extracto de levadura, aumentan la biomasa del sistema.

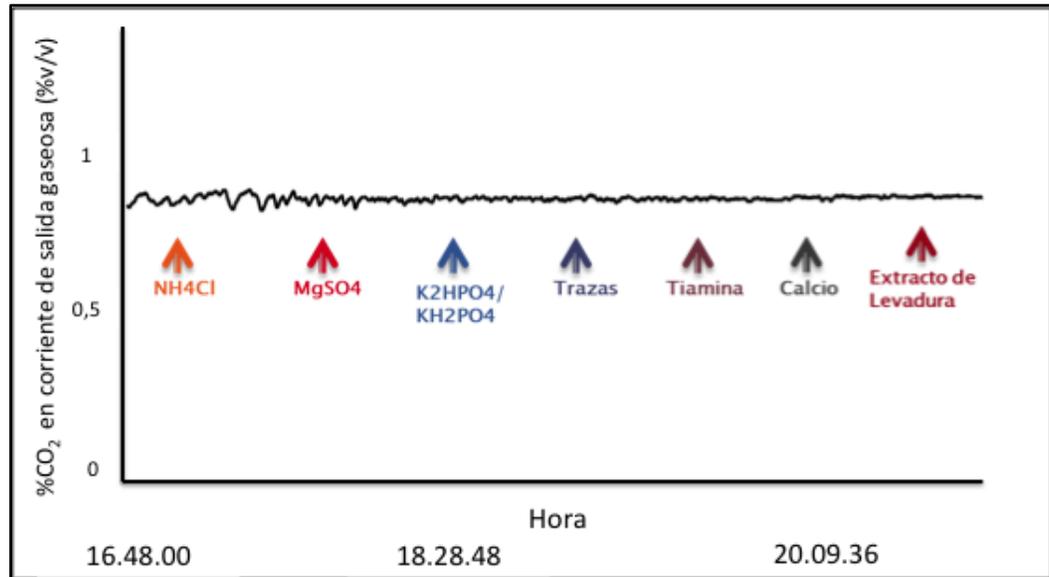


Figura 4- 9. Quimiostato con medio definido UC: Pulsos validan que el medio está óptimamente definido.

4.1.4. Cultivos Fed batch Limitados en Glucosa

a) Efecto del control básico

En las secciones anteriores se caracterizó la cinética de crecimiento del microorganismo y particularmente la tasa específica de crecimiento en la que existe metabolismo de sobreflujo. Posteriormente, se definió de manera empírica un medio de cultivo a la medida para la factoría celular utilizada. A continuación se realizaron cultivos fed-batch limitados en glucosa a tasas específicas de crecimiento constantes. Para ello se fijó un μ_{set} de 0.25 h^{-1} , que corresponde a un 50% del valor del μ_{crit} determinado mediante la calibración para la cepa *E. coli* BL21 (DE3).

El experimento fue realizado utilizando tres agentes de control básicos diferentes: NaOH 3M, KOH 3M y NH₄OH 25% v/v. En particular, cuando se utilizó hidróxido de amonio como control básico, la fuente de nitrógeno de la alimentación fue excluida.

La biomasa experimental y simulada a partir de la fase alimentada se ilustra en la Figura 4-10. Es posible observar que la biomasa máxima alcanzada al utilizar hidróxido de sodio o hidróxido de potasio es de aproximadamente 25,2 gDCW/L, a diferencia de una biomasa de 42 gDCW/L al utilizar hidróxido de amonio. Se cree que dicho aumento en la biomasa máxima se debe a la notoria reducción del estrés osmótico del cultivo. El sodio o potasio de los agentes de control básico sumado al cloruro de la fuente nitrogenada en la alimentación conllevan a una adición exponencial de NaCl (o KCl) al cultivo, lo que aumenta notoriamente la presión osmótica del sistema. Al utilizar hidróxido de amonio se evita adicionar sales que disminuyan la disponibilidad de agua del sistema, y el agente de control básico es también la fuente de nitrógeno del sistema. A la vez, dado que el efecto acidificante del metabolismo se debe principalmente al consumo de amonio, controlar el pH utilizando hidróxido de amonio permite mantener los niveles de amonio según los requerimientos del microorganismo.

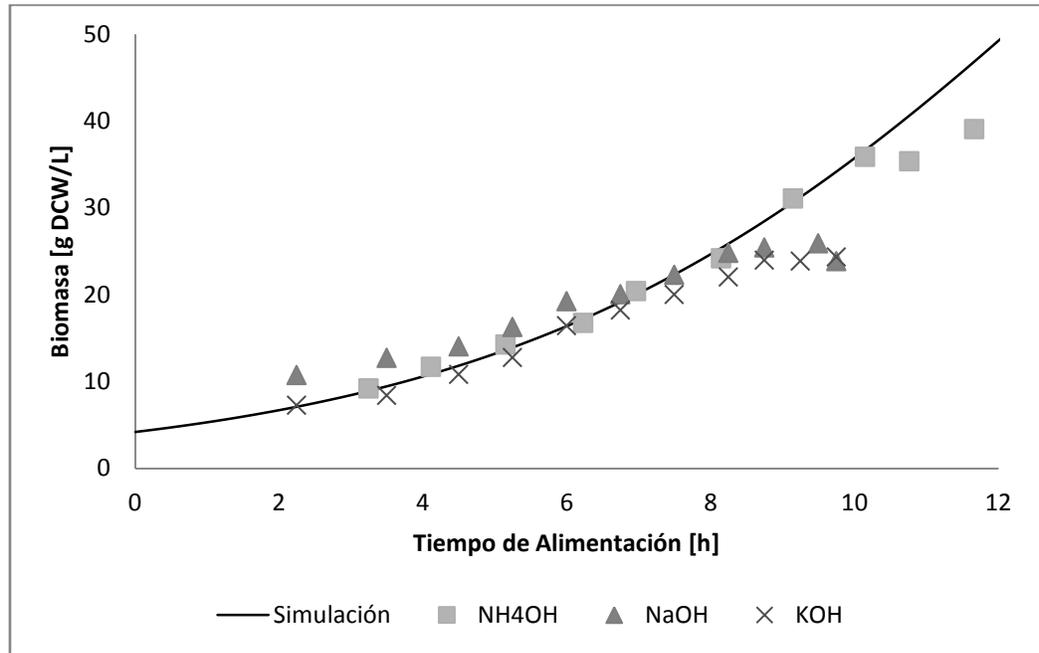


Figura 5- 10. Biomasa experimental y simulada de *E. coli* BL21 (DE3) en la fase alimentada en GLFB a $\mu_{set} = 0.245 \text{ h}^{-1}$ con diferentes agentes de control básico.

b) Efecto de la biomasa en el metabolismo de sobreflujo

Una vez liberada la restricción ocasionada por la presión osmótica en la biomasa máxima alcanzada en cultivos fed batch, se presumió que el cuello de botella del crecimiento sería ocasionado por el aumento del ácido acético en el sistema. Para ello, se analizó la concentración de ácido acético originado.

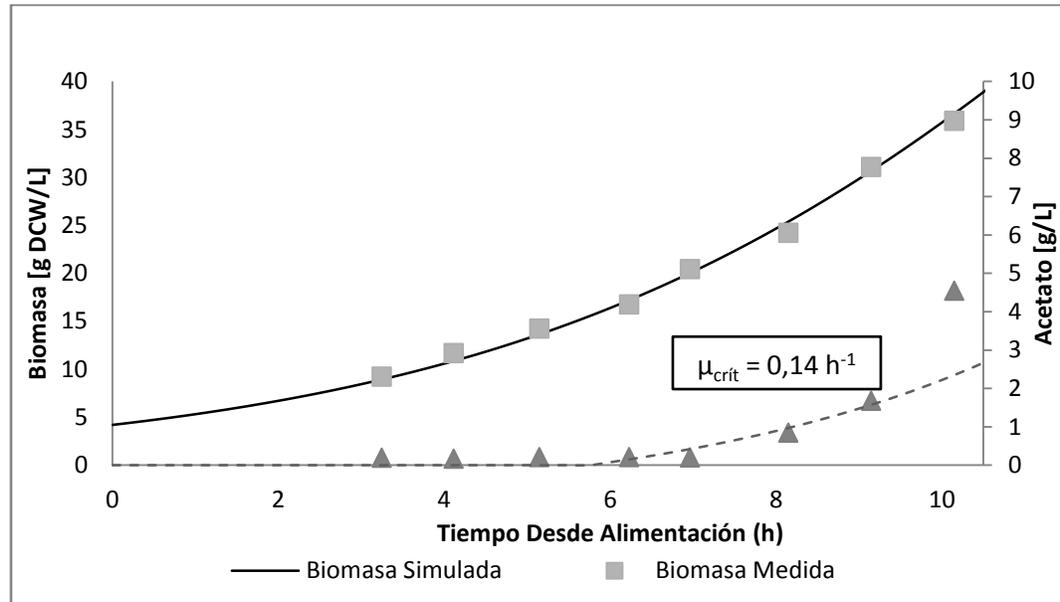


Figura 4- 11. Evolución de la Biomasa y del ácido acético experimental en la fase alimentada en GLFB a $\mu_{set}=0.245 \text{ h}^{-1}$ de *E. coli* BL21 (DE3).

La Figura 4-11 muestra la evolución de la biomasa y acetato en cultivos fed batch a una tasa específica de crecimiento de 0.245 h^{-1} . Al principio del cultivo, no existe metabolismo de sobreflujo; sin embargo, a partir de la hora 8, la concentración de ácido acético comienza a aumentar, llegando hasta 10 g/L . En dicho punto se observa que el crecimiento celular es inhibido y, solo al detener la alimentación, dicho producto es posteriormente consumido. Dado que la tasa específica de crecimiento se mantiene constante y la producción de acetato es variable es posible concluir que el metabolismo de sobreflujo parece no solo depender de la tasa específica de crecimiento, sino también de la biomasa presente en el cultivo.

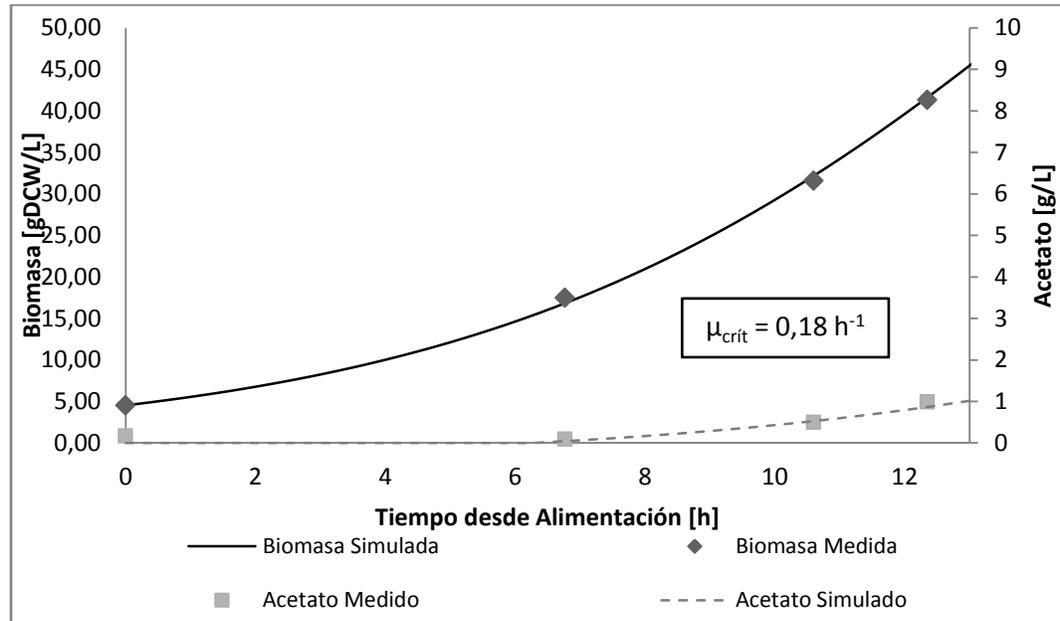


Figura 4- 12. Evolución de biomasa y ácido acético experimental en la fase alimentada en GLFB a $\mu_{set}=0.21 \text{ h}^{-1}$ en *E coli* BL21 (DE3).

Para prolongar el crecimiento celular se decidió evaluar una estrategia de alimentación aún más conservadora, a una tasa específica de crecimiento de 0.21 h^{-1} (Figura 4-12). En dicho experimento se obtuvo una biomasa máxima de 42 gDCW/L , un 20% superior que con la estrategia anterior. A su vez, y según era de esperar, la formación de ácido acético fue mucho menor. Sin embargo, al igual que en el caso anterior, se observó que la formación de ácido acético variaba a pesar de mantener la tasa específica de crecimiento constante.

Con el fin de comparar la biomasa máxima alcanzada en ambos cultivos, se escogió como punto crítico 1 g/L de acetato. A una tasa específica de crecimiento de 0.245 h^{-1} la biomasa en dicho punto crítico es de 25.2 gDCW/L . A su vez, a una

tasa específica de crecimiento de 0.21 h^{-1} la biomasa en dicho punto es de 42 gDCW/L .

c) Definición de estrategia de alimentación

Para considerar el efecto variable de la tasa específica de crecimiento crítica se utilizó una función de alimentación a tasas específicas de crecimiento decrecientes en el tiempo, según la ecuación (3.8):

$$\mu_{set}(t) = (\mu_{m\acute{a}x} - \mu_{m\acute{i}n}) \cdot \exp(-b \cdot t) + \mu_{m\acute{i}n}$$

Dicha ecuación consiste de 3 parámetros. $\mu_{m\acute{a}x}$, que se definió como el 70% del valor obtenido de la calibración del modelo dinámico (0.35 h^{-1}). $\mu_{m\acute{i}n}$ se fijó en 0.175 h^{-1} , el valor promedio observado en la literatura para E. coli.

Para estimar el tercer parámetro, b, que corresponde a la velocidad con que pasa de la tasa específica máxima a la mínima, se utilizaron los experimentos antes realizados a tasas específicas de crecimiento constante. Simulando el proceso sin sobreflujo metabólico, a una tasa específica de crecimiento exponencialmente decreciente, es posible obtener una relación entre biomasa versus tasa específica de crecimiento. Fijando $\mu_{m\acute{a}x}$ y $\mu_{m\acute{i}n}$, se puede observar el efecto del parámetro b en la curva (Figura 4-13).

Utilizando las coordenadas de biomasa y tasa específica de crecimiento en la cual hay 1 g/L de acetato, y conservadoramente considerando una biomasa un 20% inferior, se obtiene que el mejor parámetro, b, que ajusta dichos puntos es de 0.21

(Figura 4-13). Notar que para comparar los experimentos se utilizó el aumento de biomasa, definida como la biomasa dividida por la biomasa final de la fase batch.

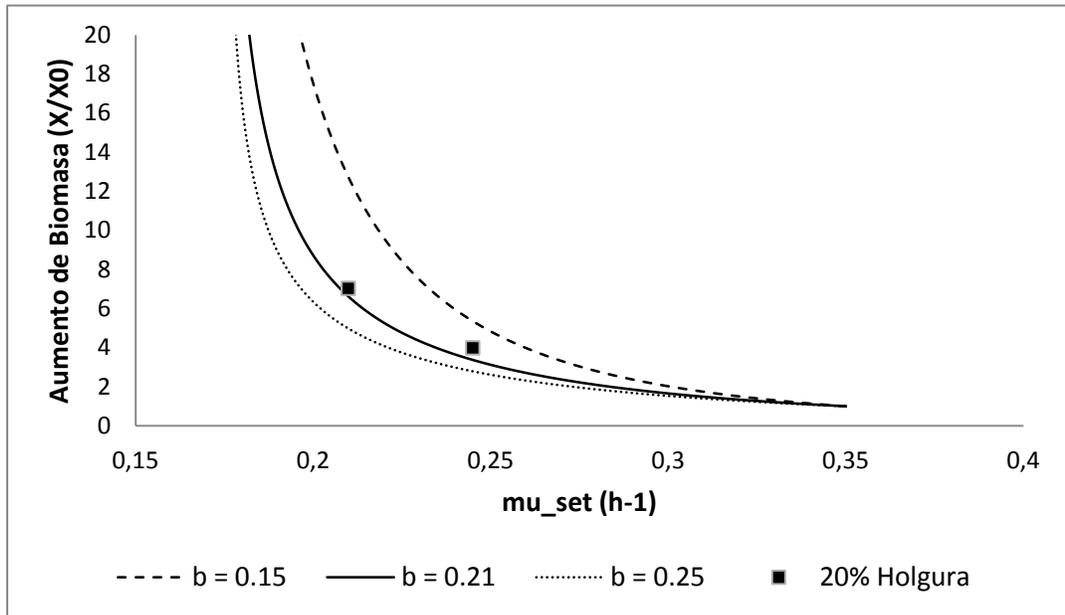


Figura 4- 13. Biomasa, expresada como aumento relativo al final del batch, versus tasa específica de crecimiento especificada según ecuación 3.8, b variable y $\mu_{m\acute{a}x} = 0,35 \text{ h}^{-1}$; $\mu_{m\acute{i}n} = 0,175 \text{ h}^{-1}$. (■) Representa la biomasa máxima, con un 20% de holgura, al utilizar alimentaciones a tasas específicas de crecimiento constantes, según Figuras 4-11 y 4-12.

d) GLFB a μ exponencial decrecientes

La Figura 4-14 ilustra la concentración de glucosa, acético y biomasa utilizando la estrategias antes definida. En esta condición, la concentración de ácido acético y

glucosa se mantienen bajo el límite de detección la mayor parte de la fase alimentada, logrando alcanzarse una biomasa de 90 g DCW/L.

Dicha estrategia de alimentación fue replicada en un diseño experimental para optimizar la inducción. La Figura 4-15 resume la evolución de la biomasa (como aumento relativo a la biomasa final del batch) en el tiempo, desde el inicio de la alimentación. En promedio la biomasa final obtenida es de 65,1 gDCW/L en 17 horas.

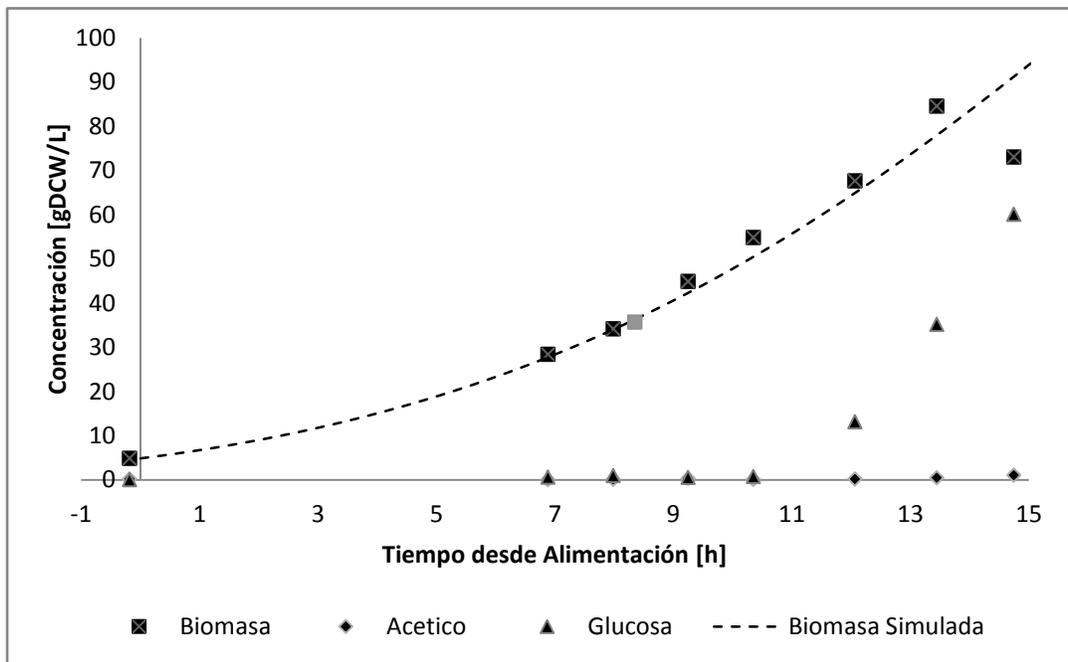


Figura 4- 14. Biomasa, glucosa y acetato experimental en cultivos fed batch limitados en glucosa de *E coli* BL21 (DE3) con estrategia de alimentación a una tasa específica exponencialmente decreciente.

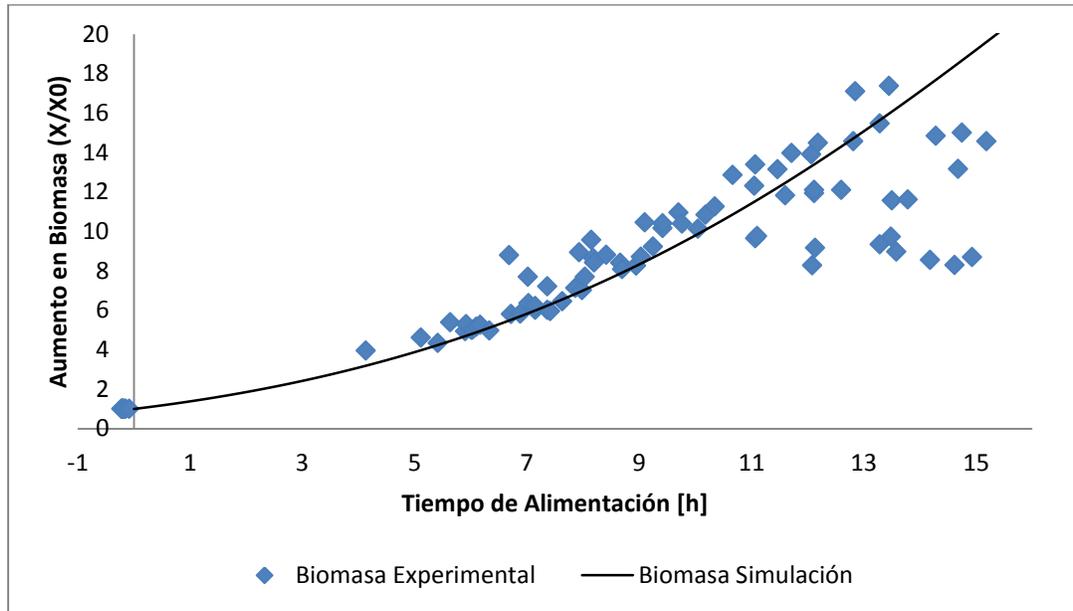


Figura 4- 15. Estrategia de alimentación exponencialmente decreciente comparada con μ constante para cultivo fed batch optimizado de *E coli* BL21 (DE3).

4.2. *Saccharomyces cerevisiae*

A diferencia de *E. coli*, los requerimientos nutricionales de *S. cerevisiae* son notoriamente más complejos y, en consecuencia, la definición del medio de cultivo se vuelve más difícil. A su vez, las necesidades biológicas de oxígeno son notoriamente menores, y por ende se busca utilizar estrategias de alimentación que mantengan la tasa específica de crecimiento cercanas al valor crítico. Al igual que para la factoría celular procarionte antes utilizada, los resultados consisten de un scale-down inicial del proceso productivo a escala industrial, seguido de la

caracterización de los parámetros dinámicos de la factoría, la definición del medio de cultivo y por último la generación de cultivos fed batch limitados en glucosa.

4.2.1. Scale-down del proceso productivo

El protocolo utilizado por la empresa para generar proteínas recombinantes en cultivos de *S. cerevisiae* consiste en un fed batch exponencial limitado en glucosa. Las variables operacionales son: temperatura controlada en 30°C, pH controlado en 5.6 con NaOH 10 M, y oxígeno disuelto controlado en 2,5 mg/L con un rango dividido que manipula agitación y aireación. El volumen de alimentación relativo al volumen del batch es de 7/90.

El rendimiento de biomasa en glucosa observado de literatura es de 0.52 g DCW/g Glu (Mendoza-Vega, Hebert, & Brown, 1994) y difiere notoriamente del valor utilizado en Centrovet (0.34 g DCW/g Glu). La subestimación de dicho rendimiento se debe a que dicho parámetro fue estimado en la batch, donde ocurre metabolismo respiro-fermentativo. Dado que el flujo de alimentación es inversamente proporcional al rendimiento de biomasa en glucosa, subestimaciones de tal generan alimentación más agresivas de la necesaria.

Debido a que en dicho procedimiento se mantiene la tasa específica de crecimiento igual a la observada en el batch y utilizando el rendimiento estimado a partir de dicha fase, el flujo de alimentación determina alargar la fase batch por más tiempo. A pesar de que dicha estrategia es sumamente efectiva en términos de productividad (dado que se crece a la tasa específica de crecimiento máxima), trae consigo un rendimiento de biomasa en sustrato notoriamente menor, una tasa

máxima de formación de etanol, y en consecuencia limitación en la concentración máxima admisible por el exceso de alcohol generado. La Figura 4-16 muestra la evolución de la biomasa al realizar el scale-down de dicho protocolo.

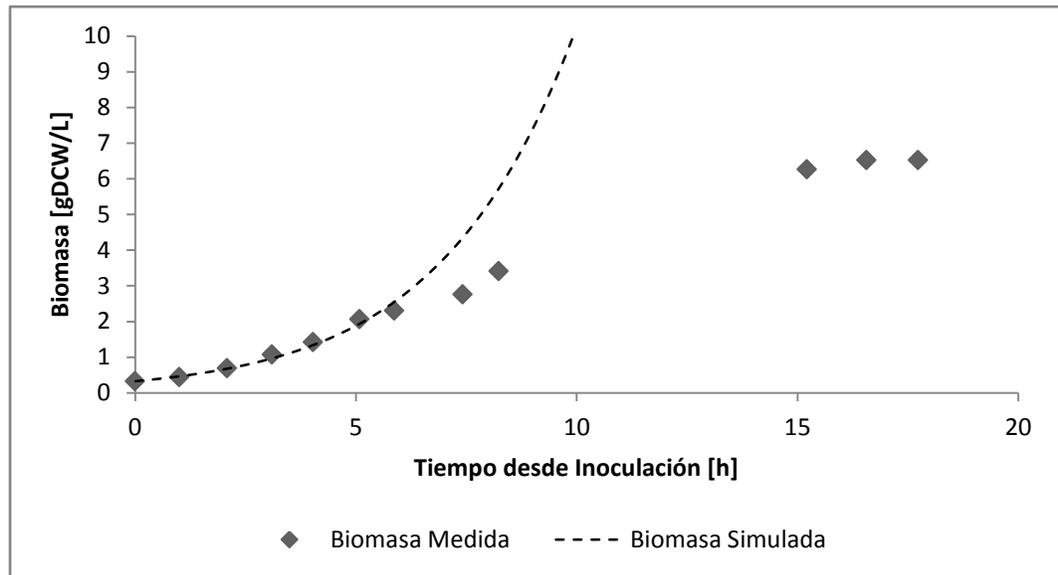


Figura 4- 16. Evolución de la biomasa simulada y experimental según protocolo Centrovet de cultivo fed batch limitado en glucosa de *S cerevisiae*

N30

Se presume que dado la agresiva alimentación impuesta, la generación de etanol es muy elevada lo que genera inhibición en el crecimiento celular. Esto provoca por un lado un bajo rendimiento en la fuente de carbono (expresada como una biomasa notoriamente menor respecto a la simulada), y por otro lado la posterior inhibición del crecimiento celular.

Los resultados de un cultivo a otro a escala industrial en la empresa eran muy variables, oscilando entre 5 y 17 gDCW/L. Dicha variación se sustenta en que la estrategia de alimentación depende fuertemente de la tasa específica de crecimiento observada en la fase batch. También depende de la biomasa final estimada en la fase batch, la cuál es estimada a partir de la tasa específica de crecimiento observada y la concentración de glucosa inicial en el batch. A su vez, ésta depende también de la concentración de glucosa en la alimentación. Todas estas razones explican que la variabilidad del proceso sea particularmente elevada.

El crecimiento debilitado del microorganismo (ocasionado por condiciones de estrés), o bien la incorrecta estimación de la fase lag resultan en una disminución de la tasa específica de crecimiento observada. Esto genera alimentaciones a tasas específicas de crecimiento menores, menos agresivas, lo que podría evitar el sobreflujo metabólico y así aumentar la concentración celular final observada. La baja concentración final observada en el scale-down se debe posiblemente a que la tasa específica de crecimiento utilizada corresponde al valor real de $\mu_{m\acute{a}x}$ y en consecuencia es el que genera mayor sobreflujo metabólico.

Para evaluar una alimentación menos agresiva e independiente del crecimiento observado en la fase batch se utilizó una alimentación a una tasa específica de crecimiento decreciente (ecuación 3.8). La tasa específica inicial fue definida en 0.273 h^{-1} ($0.75 \cdot \mu_{m\acute{a}x}$), una tasa específica de crecimiento final de 0.1 h^{-1} (μ_{set} de literatura), y una pendiente de decrecimiento, b , arbitrariamente fijada en 0.14. El

rendimiento de biomasa en sustrato utilizado fue de 0.5 g DCW/gGlu y fue obtenido de literatura (Mendoza-Vega et al., 1994). La Figura 4-17 muestra la evolución de la biomasa observada utilizando una función más conservadora de alimentación que en el protocolo de la empresa.

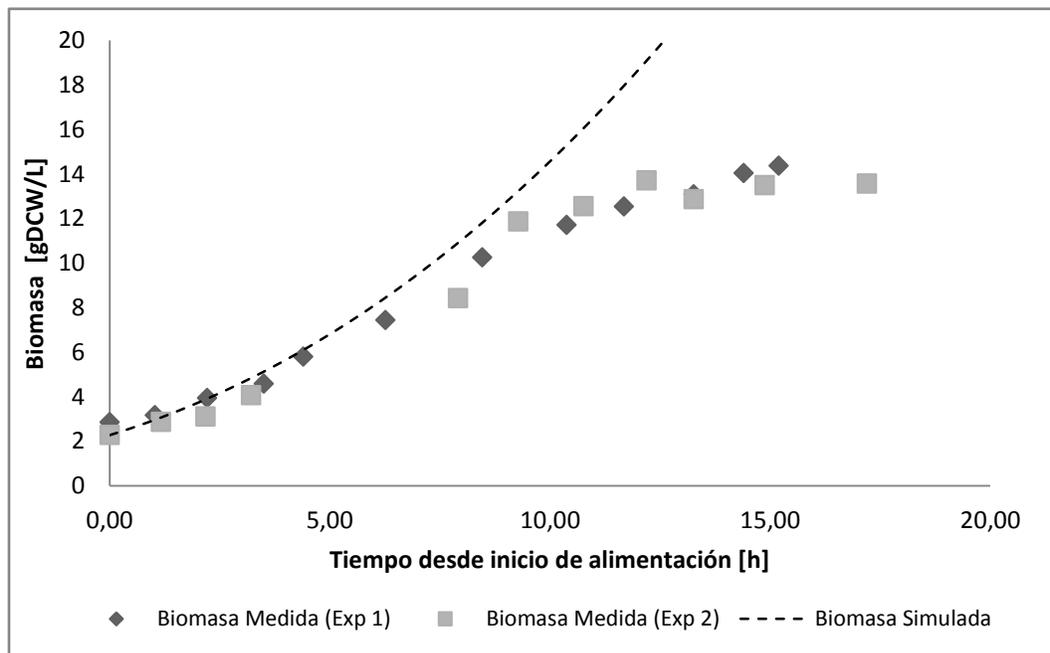


Figura 4- 17. Biomasa experimental y simulada utilizando medio Centrovet y alimentación a tasa específica de crecimiento exponencialmente decreciente.

La Tabla 4-10 resume los parámetros productivos obtenidos de ambas estrategias de alimentación. Los resultados muestran una mayor producción al usar estrategias de alimentación más conservadoras. Cabe destacar que se utilizará como parámetros productivos la estrategia de alimentación a μ decreciente. Es importante destacar que los parámetros productivos fueron calculados utilizando el

tiempo final del cultivo como aquel en el que la biomasa fuera máxima. Esto en realidad no es el caso de Centrovét, ya que el proceso finaliza una vez consumida completamente la alimentación, por lo que en realidad son menores que los valores acá expuestos.

Tabla 4- 10. Parámetros productivos para el cultivo de *S. cerevisiae* N30 utilizando protocolo Centrovét inicial ($\mu_{\text{máx}}$), y protocolo Centrovét modificado ($\mu_{\text{decreciente}}$).

$\mu_{\text{set, fed}}$	$\mu_{\text{máx, batch}}$	$\mu_{\text{decreciente}}$
Biomasa Final (g DCW/L)	5,57	13,50
Productividad Volumétrica (g DCW/L/h)	0,29	0,64

4.2.2. Caracterización del metabolismo de sobreflujo

La correcta caracterización de los parámetros cinéticos de sobreflujo de *S. cerevisiae* además de permitir diseñar estrategias de alimentación acorde a las características metabólicas de la factoría celular, permite comparar el efecto de diferentes cepas o de diferentes variables operacionales en el metabolismo de sobreflujo. Utilizando el modelo descrito en la sección 3.5, se calibró la dinámica de crecimiento de *S. cerevisiae* N30 en un medio definido y un medio semidefinido. Para ello se realizaron cultivos batch con el medio definido según el protocolo de la empresa a 30°C y a un pH de 5.6 con acción de control básica

hidróxido de sodio. Las condiciones de transferencia fueron mantenidas al máximo permisible, *i.e.* 300 rpm y 0.5 VVM de aire, con una constante de transferencia de masa de 70 h^{-1} .

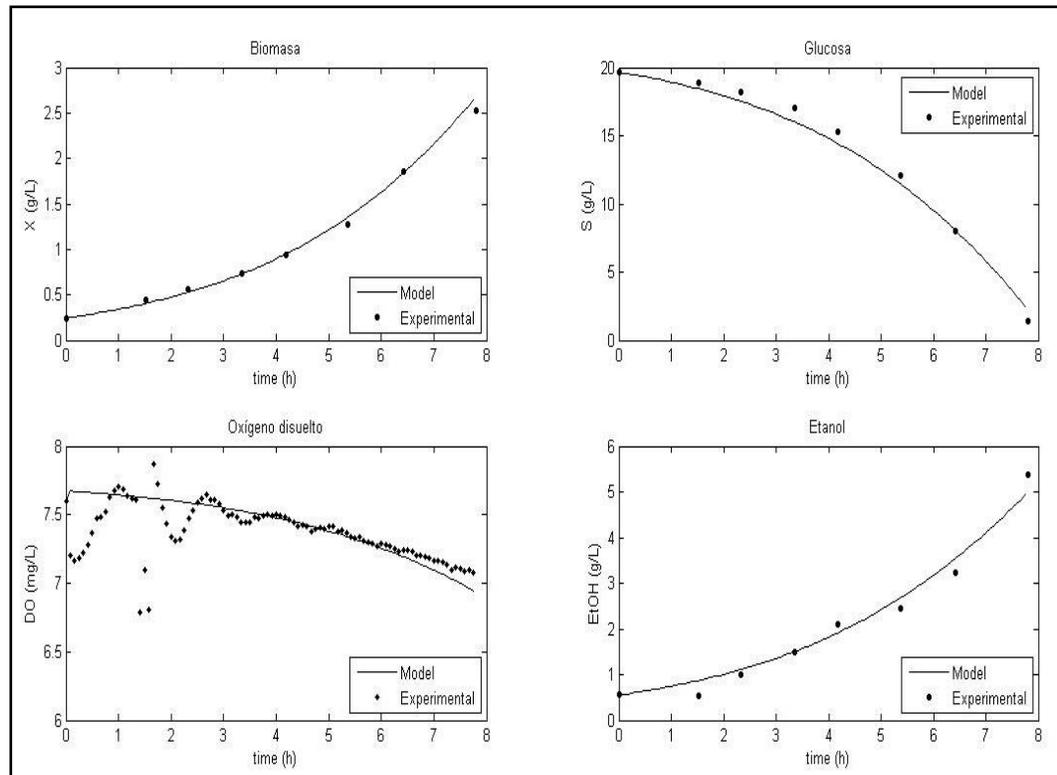


Figura 4- 18. Calibración de sobreflujo metabólico en *S. cerevisiae* N30 en medio definido.

La Figura 4-18 corresponde a la calibración utilizando el medio utilizado por Centrovét sin hidrolizado de caseína; mientras que la Figura 4-19 muestra la calibración utilizando el medio de cultivo suplementado con hidrolizado de caseína.

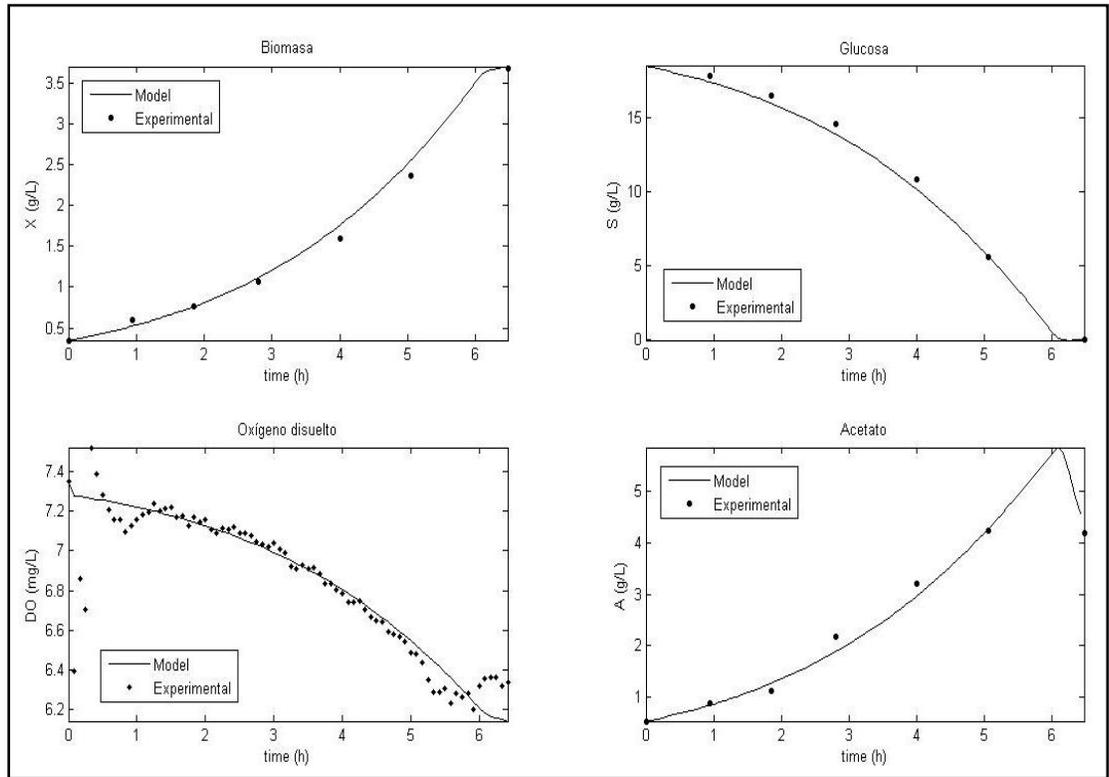


Figura 4- 19. Calibración de sobreflujo metabólico en *S. cerevisiae* N30 en medio semi-definido.

Tabla 4- 11. Parámetros calibrados de modelo dinámico con sobreflujo metabólico para *S. cerevisiae* N30 en medio definido y semi-definido.

Parámetro	Medio Definido	Medio Semi-Definido	Origen y Fuente
$Y_{S_{ox}O} \left(\frac{mg_{O_2}}{g_{Glu}} \right)$	222,9	273,6	Parámetro calibrado
$q_{O,máx} \left(\frac{mg_{O_2}}{g_{DCW} \cdot h} \right)$	61,21	54,15	Parámetro calibrado
$q_{S,máx} \left(\frac{g_{Glu}}{g_{DCW} \cdot h} \right)$	2,7	2,77	Parámetro calibrado
$Y_{I_P X} \left(\frac{g_{Glu}}{g_{DCW} \cdot h} \right)$	-	0,05	Parámetro calibrado
$q_{I_P,máx} \left(\frac{g_{I_P}}{g_{DCW} \cdot h} \right)$	1,7	1,7	Landi et al., (2011)
$Y_{S_f I_P} \left(\frac{g_{I_P}}{g_{Glu}} \right)$	0,29	0,32	Ecuación (3.30)
$Y_{I_P O} \left(\frac{mg_O}{g_{I_P}} \right)$	-	39,44	Ecuación (3.30)
$Y_{S_{ox} X} \left(\frac{g_{DCW}}{g_{Glu}} \right)$	0,50 ⁽¹⁾	0,74 ⁽²⁾	(1): Pham et al., (1998) (2): Albers et al., (1996)
$Y_{S_f X} \left(\frac{g_{DCW}}{g_{Glu}} \right)$	0,086 ⁽³⁾	0,11 ⁽⁴⁾	(3): Verduyn et al., (1990) (4): Albers et al., (1996)
$K_S \left(\frac{g_{Glu}}{g_L} \right)$	0,05	0,05	Pham et al., (1998)
$K_{I_P} \left(\frac{g_{I_P}}{g_L} \right)$	0.1	0.1	Pham et al., (1998)
$K_{i,I_P} \left(\frac{g_{I_P}}{g_L} \right)$	10	10	Pham et al., (1998)
$k_L a \text{ (} h^{-1} \text{)}$	202	140	Método Dinámico (Félix García-Ochoa & Gomez, 2004)
$DO^* \left(\frac{mg_{O_2}}{L} \right)$	7,75	7,4	Ley de Henry (Ec. 2.3)

La Tabla 4-11 ilustra los parámetros calibrados y fijados para cultivos batch de *S. cerevisiae* en medios de cultivo definido y semi-definido. Notar que la tasa específica de consumo de glucosa máxima permanece constante en un valor de 2.7 g Glu/g DCW/h. Esto está acorde con la hipótesis de que existe una velocidad máxima de consumo celular de glucosa dependiente de la factoría celular y no del medio de cultivo. Los rendimientos de biomasa en el consumo oxidativo de glucosa fueron fijados en base a literatura, y se destaca que en el medio definido es notoriamente menor comparado con medio semi-definido (0.5 versus 0.74 g DCW/g Glu), lo que se explica por la utilización de la fuente de carbono para sintetizar aminoácidos en el medio definido. El mismo hecho explica el mayor rendimiento de biomasa en el consumo fermentativo de glucosa, 0.11 g DCW/g Glu en el medio semi-definido versus 0.086 g DCW/g Glu del medio definido. Asimismo, el medio semi-definido presenta un rendimiento de oxígeno en glucosa notoriamente mayor (274 vs 223 mgO₂/g Glu, respectivamente). La utilización de la fuente carbonada para sintetizar aminoácidos explica la disminución en la cantidad de oxígeno utilizado por gramo de glucosa consumido.

Otro parámetro que varió notoriamente en ambos casos fue la tasa específica de consumo de oxígeno máxima ($q_{O_2,máx}$), cuello de botella que se presume determina el metabolismo de sobreflujo. Para el medio semi-definido dicho valor fue de 54 mg O₂/g DCW/h; mientras que para el medio definido fue de 61 mg O₂/g DCW/h. Esto sugiere que la incorporación de aminoácidos a través de la peptona favorece el metabolismo de sobreflujo.

A partir de las ecuaciones (3.31), (3.32), (3.33) y (3.34) se calculan los parámetros $q_{S,crít}$, $\mu_{máx}$, $\mu_{crít}$ e $Y_{OX_{ox}}$ los cuales se resumen en la Tabla 4-12.

Tabla 4- 12. $q_{S,crít}$, $\mu_{máx}$, $\mu_{crít}$ e $Y_{OX_{ox}}$ de *S. cerevisiae* N30 en medio definido y semi-definido

Parámetro	Medio Definido	Medio Semi-Definido
$q_{S,crít} \left(\frac{g_{Glu}}{g_{DCW} \cdot h} \right)$	0,28	0,20
$\mu_{máx} (h^{-1})$	0,35	0,43
$\mu_{crít} (h^{-1})$	0,14	0,14
$Y_{OX_{ox}} \left(\frac{g_{DCW}}{g_{O_2}} \right)$	2,2	2,7

Notar que a pesar de que existe un notorio aumento en la tasa específica de crecimiento máxima al utilizar un medio semi-definido no existe mayor variación en la tasa específica de crecimiento a la cual ocurre sobreflujo metabólico.

4.2.3. Definición de Medio de Cultivo

El alto valor agregado del producto de interés hace que el costo del medio de cultivo sea despreciable. Así se prioriza utilizar medios de cultivo ricos en aminoácidos y factores de crecimiento (como vitaminas) para acelerar el

metabolismo celular, reducir los tiempos de cultivo maximizando así la productividad volumétrica.

Con el fin de determinar los rendimientos específicos en sustratos para la cepa de trabajo se realizaron 7 quimiostatos diferentes, limitados en glucosa, fosfato, magnesio, amonio, sulfato, trazas y vitaminas. Los medios utilizados para los diferentes cultivos se resumen en la Tabla 4-13. La solución de trazas y la solución de vitaminas fue extraída de (Van Hoek et al., 2000).

Tras 3 a 5 tiempos de residencia, el cultivo alcanzó el estado estacionario. La biomasa estacionaria, junto con la concentración del sustrato limitante y el rendimiento se muestran en la Tabla 4-14. Para validar la limitación en el sustrato en cuestión, luego de 3 horas de finalizada la etapa de muestreo, se realizó un pulso del sustrato limitante. En todos los casos se observó un aumento del CO₂ gaseoso en la corriente de salida, validando el experimento.

Tabla 4- 13. Medios para Cálculo de rendimiento en quimiostatos para la cepa *S. cerevisiae* N30. Tasa de Dilución 0,14 h⁻¹, 30°C pH=5, KOH control básico.

	Glucosa	PO4 (KH ₂ PO ₄)	Mg (MgSO ₄ 7 H ₂ O)	NH ₄ (NH ₄ Cl)	SO ₄ (MgSO ₄ 7 H ₂ O)	Trazas (van Hoek)	Vitaminas (Van Hoek)
Glucosa	20	20,0	20,0	10,0	20,0	20,0	20,0
(NH ₄) ₂ SO ₄			5,0			5,0	5,0
KH ₂ PO ₄	8,4	0,1	6,4	4,2	4,2	6,4	6,4
K ₂ HPO ₄	0,6	0,0	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5
MgSO ₄ 7 H ₂ O	2,25	2,3	0,1	2,3	0,023	1,0	1,0
Vitaminas Stock	12	6,0	12,0	6,0	6,0	12,0	0,010
Trazas Stock	10	5,0	1,4	5,0	5,0	0,001	1,4
Triptófano	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
NH ₄ Cl	3,04	3,0		0,3			
MgCl ₂					1,9		

Tabla 4- 14. Concentración de sustrato limitante, biomasa en estado estacionario y rendimientos calculados a partir de quimiostatos.

Variable	Glucosa [g]	PO4 [g]	Mg [g]	NH4 [g]	SO4 [g]	Trazas Stock [mL]	Vitaminas Stock [mL]
Sustrato Limitante, Z [g/L]	20,0	0,08	0,01	0,10	0,01	0,00	0,01
Biomasa Estacionaria (OD)	17,5	1,20	5,03	2,62	8,00	13,52	6,49
Y _{zx} (OD/(g Lim/L))	0,88	14,28	750	25,8	880	13519	650

La factoría celular utilizada para producir antígenos contra caligidosis y el virus ISA es *S. cerevisiae* cepa N30 (MATa, Ura-, Tryp-). En efecto, la cepa nativa no posee la maquinaria metabólica para producir ni el aminoácido triptófano ni la base nitrogenada uracilo. El plásmido utilizado, además de poseer el gen del producto de interés posee el gen de la enzima que codifica para la síntesis de uracilo. Así, sólo las cepas transformadas son capaces de proliferar en un medio sin uracilo. En consecuencia, el medio de cultivo debe ser tal que mantenga la presión de selección de las cepas transformadas y en consecuencia debe carecer de uracilo.

El requerimiento específico en cada aminoácido es sumamente laborioso, variable y la utilización de medios complejos con fines productivos en la presente factoría celular es bastante común. La peptona, como se mencionó en la sección 2.1.2 es una excelente fuente de aminoácidos y otros macronutrientes, a su vez no posee uracilo.

Para determinar el requerimiento específico de peptona como fuente de nitrógeno se realizó un quimiostato limitado en peptona (Tabla 4-15).

Tabla 4- 15. Medio de cultivo para *S. cerevisiae* N30 en quimiostato limitado en nitrógeno (aportado a través de Bacto-Peptone)

Sustrato	Concentración
Glucosa	20,0
KH ₂ PO ₄	4,2
K ₂ HPO ₄	0,3
MgSO ₄ 7 H ₂ O	2,3
Peptona	0,5
Vitaminas <i>S. cerevisiae</i>	6,0
Trazas <i>S. cerevisiae</i>	5,0
Triptófano	0,1

Tabla 4- 16. Variables en estado estacionario en quimiostato limitado en
peptona

Sustrato Limitante	Peptona
Concentración Alimentación (g/L)	0,5
Biomasa Estacionaria (g DCW/L)	0,75
Y _{px} (g DCW/g Pep)	1,52
Y _{sp} (g Pep/g Glu)	0,17

La Tabla 4-16 resume los resultados experimentales obtenidos. El rendimiento de biomasa en peptona obtenido fue de 1,5 g DCW/g Pep, es decir por gramo de peptona se producen 1,5 gr de biomasa en peso seco.

Tabla 4- 17. Medios batch y de alimentación elaborado para *S. cerevisiae* N30. Si varía la concentración en el medio semi-definido se muestra en paréntesis.

Sustrato	Concentración Batch	Concentración Fed
Glucosa [g/L]	20	392
(NH ₄) ₂ SO ₄ [g/L]	5	0
KH ₂ PO ₄ [g/L]	6,4 ¹	0 ²
K ₂ HPO ₄ [g/L]	0,5 ¹	0
MgSO ₄ 7 H ₂ O [g/L]	1	7
CaCl ₂ H ₂ O [g/L]	0,28 ³	1,2
Fe(SO ₄) ₇ H ₂ O [g/L]	0	0,7
Triptófano [g/L]	0,1 ⁴	1,5 ³
NaCl [g/L]	0,14	0,4
Solución Vitaminas [mL/L]	12	42
Solución Trazas [mL/L]	1,4	7
Peptona [g/L]	0 (10)	0 (83)

En base a literatura (Mendoza-Vega et al., 1994; Pronk, 2002; van Hoek et al., 2000) y a los rendimientos antes calculados se elaboraron dos medios de cultivo,

¹ Adicionado para generar un tampón al pH de trabajo, pH=5.

² Aportado por le peptona.

³ Obtenido de (Mendoza-Vega et al., 1994)

⁴ Concentración recomendada de *S. cerevisiae* auxotrofa (Pronk, 2002)

uno definido y otro semidefinido (suplementado con peptona). La Tabla 4-17 resume los medios definidos y semi-definidos elaborados para la fase batch y la fase fed.

4.2.4. Cultivos Fed batch Limitados en Glucosa

Definidos el medio batch y el medio de alimentación, se buscó definir una estrategia de alimentación óptima que maximice tanto la productividad volumétrica como el rendimiento en biomasa. La presente factoría celular es de crecimiento mucho más lento que *E coli* y sus requerimientos de consumo de oxígeno son notoriamente menores. En consecuencia, el principal cuello de botella es el sobreflujo metabólico hacia etanol, compuesto que a altas concentraciones inhibe el crecimiento celular, y con ello la concentración celular máxima alcanzada.

Mediante fed batch limitados en glucosa se analizaron tres estrategias de alimentación diferentes. En primer lugar se evaluó una estrategia de alimentación a una tasa específica de crecimiento constante, fijada en el valor de la tasa específica de crecimiento crítica (Función Constante). Posteriormente, se analizó una estrategia de tasa específica de crecimiento exponencial decreciente con los mismos parámetros utilizados en el protocolo de la empresa (Función Decreciente 1). Finalmente, se analizó una estrategia de alimentación aun más conservadora (Función Decreciente 2). Esta última función parte la fase alimentada a una tasa específica de crecimiento que corresponde al μ crítico y decae exponencialmente

hasta llegar a un valor de $0,07 \text{ h}^{-1}$. La Tabla 4-18 resume las diferentes tasas específicas de crecimiento utilizadas para definir la función de alimentación. El rendimiento de biomasa en glucosa utilizado en todos los casos corresponde al rendimiento obtenido en cultivos con medios definidos ($0,55 \text{ g DCW/L}$), por lo que la estrategia de alimentación para cultivos con medios semi-definidos es más agresiva que la fijada.

Tabla 4- 18. Estrategias de Alimentación definidas para *S. cerevisiae* N30.

Función	$\mu(t)$
Constante	$\mu_{set}(t) = 0,14$
Decreciente 1	$\mu_{set}(t) = (0,273 - 0,1) \cdot \exp(-0,14 \cdot t) + 0,1$
Decreciente 2	$\mu_{set}(t) = (0,14 - 0,07) \cdot \exp(-0,07 \cdot t) + 0,07$

La Figura 4-20 resume la biomasa máxima alcanzada utilizando las estrategias de alimentación de la Tabla 4-18. En primer lugar, se observa que, independiente de la estrategia de alimentación utilizada, la concentración celular máxima es superior en medios semi-definidos que en medios definidos (34% superior en promedio). Más aún, independientemente del medio de cultivo, la estrategia ‘Decreciente 2’ es superior a la estrategia ‘Decreciente 1’, la cual a su vez es superior a la estrategia ‘Constante’. La biomasa final alcanzada con la ‘Estrategia 1’ es de 33 g DCW/L , comparada con los $13,5 \text{ g DCW/L}$ utilizando la misma estrategia pero con

el medio de la empresa. Esto demuestra la importancia que tiene el medio de cultivo para propósitos productivos.

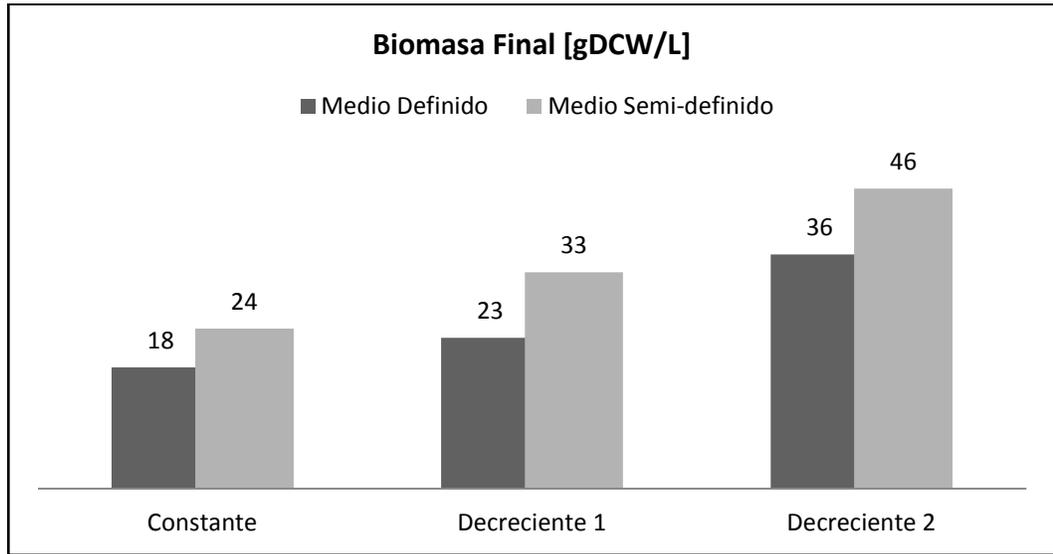


Figura 4- 20. *S. cerevisiae* biomasa máxima experimental en cultivos fed batch limitados en glucosa con estrategias de alimentación definidas en la Tabla 4-18.

La Figura 4-21 resume la productividad volumétrica alcanzada en cultivos de *S. cerevisiae* utilizando las estrategias de alimentación de la Tabla 4-18. Al igual que en la concentración celular final, es posible observar que independiente de la estrategia de alimentación utilizada la productividad volumétrica máxima es superior en medios semi-definidos que en medios definidos (71% superior en promedio). Ahora bien, analizando las estrategias de alimentación para el mismo medio de cultivo la tendencia cambia. Para el caso de medios de cultivo definidos no existe mayor variación en la productividad volumétrica. Para medios semi-definidos, en cambio, existe un aumento en cuanto a productividad volumétrica

con estrategias de alimentación decrecientes respecto la estrategia de alimentación constante. Dado que la estrategia de alimentación ‘Decreciente 1’ utiliza tasas específicas de crecimiento sobre el valor crítico era de esperar que dicha estrategia sea superior a la estrategia de alimentación ‘Constante’, fijada al nivel crítico. Esto valida la hipótesis de que la transición gradual de crecimiento entre la fase batch y fed reduciría el estrés metabólico, lo que explicaría el mayor sobreflujo metabólico en la estrategia constante, y por ende la inferior biomasa máxima alcanzada. Notar también que la estrategia de alimentación ‘Decreciente 1’ es similar a la estrategia ‘Decreciente 2’.

El hecho de que la biomasa de la estrategia de alimentación ‘Decreciente 2’ sea mayor a la ‘Decreciente 1’ y que en la productividad volumétrica no se observe diferencia se debe a que la primera es mucho más agresiva que la segunda provocando que la concentración de etanol sea notoriamente más alta (35 g/L), lo que explica la menor biomasa final alcanzada (Figura 4-20).

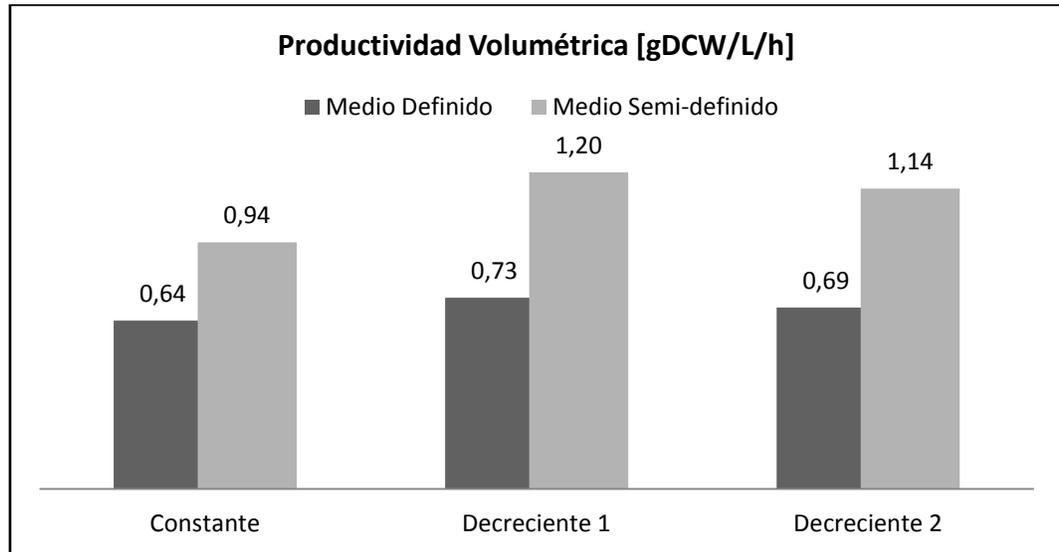


Figura 4- 21. Productividad volumétrica experimental en cultivos fed batch limitados en glucosa de *S. cerevisiae* 30 con estrategias de alimentación definidas en la Tabla 4-18 en medio definido y semi-definido.

Es importante recalcar la superioridad de la alimentación decreciente; y dentro de esta configuración, la estrategia de alimentación óptima con propósitos productivos es la estrategia ‘Decreciente 2’. La Figura 4-22 muestra la evolución de la biomasa, glucosa y etanol en el cultivo fed batch con medio definido. En estas condiciones, la glucosa se mantiene no detectable durante la mayor parte de la fase alimentada y el etanol formado en la fase batch es posteriormente consumido. Dichos resultados validan la estrategia de cultivo como una estrategia limitada en glucosa con régimen puramente oxidativo.

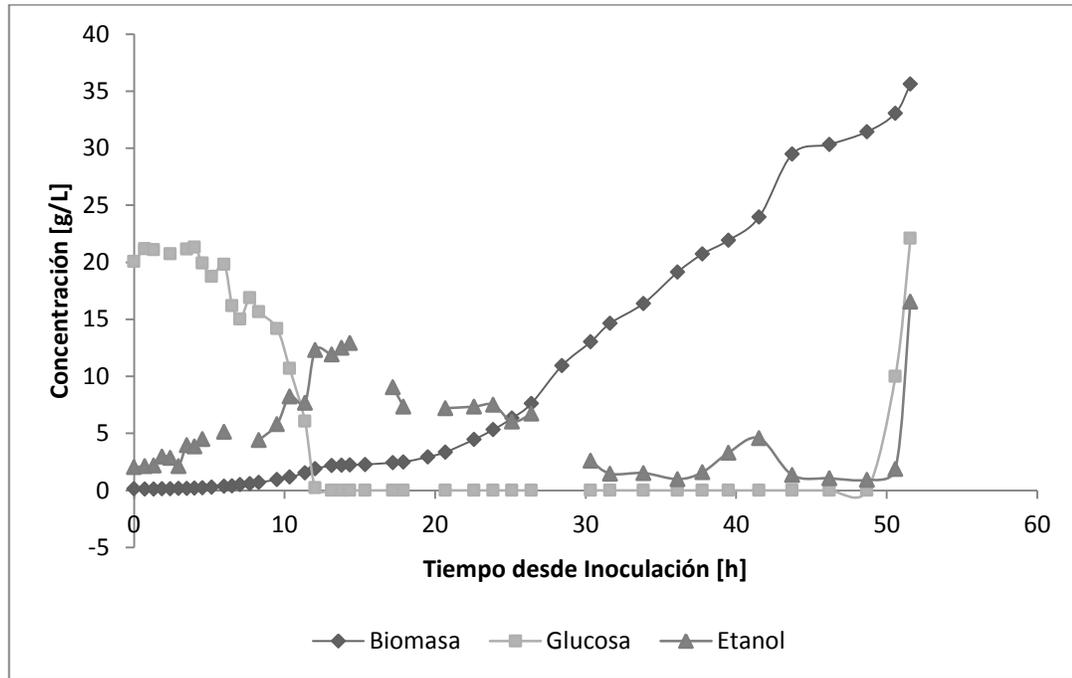


Figura 4- 22. Evolución de biomasa, glucosa y etanol experimental en cultivos fed batch de *S. cerevisiae* N30 limitados en glucosa en medio definido, utilizando estrategia de alimentación decreciente 2.

La Figura 4-23 ilustra la evolución de la biomasa, etanol y glucosa en el medio semi-definido utilizando la estrategia de alimentación ‘Decreciente 2’. Notar que el etanol generado en el batch es posteriormente consumido, y que la glucosa durante la fase alimentada es completamente consumida, por lo que existe un régimen de crecimiento 100% oxidativo. Observar también la notoria mejora respecto a la biomasa máxima alcanzada (46 vs 36 g DCW/L) y productividad volumétrica (1,4 vs 0,69 g DCW/L/h) al utilizar medios de cultivo semi-definidos comparados con medios definidos.

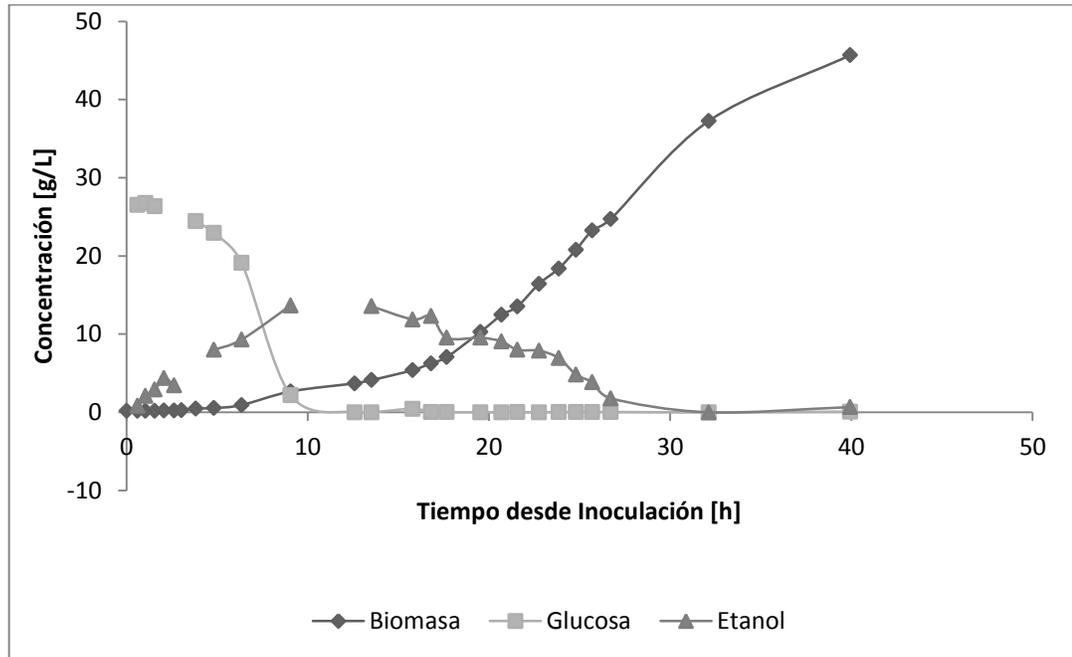


Figura 4- 23. Evolución de biomasa, glucosa y etanol experimental en cultivos fed batch de *S. cerevisiae* N30 limitados en glucosa en medio semidefinido, utilizando estrategia de alimentación decreciente 2.

5. DISCUSION, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. Discusión

Optimizar el proceso productivo de productos recombinantes en factorías celulares microbianas puede reducirse a maximizar tres parámetros claves del proceso: la concentración final del producto de interés, la productividad volumétrica y el rendimiento del producto en sustratos. Al tratarse de productos recombinantes de alta valor agregado, el parámetro de rendimiento pasa a ser poco relevante; tal es el caso de Centrovet. A pesar de que el producto de interés es el producto recombinante, en general se busca primeramente optimizar la biomasa del sistema, a modo de aumentar la capacidad productiva, tras lo cual se procede a la fase de inducción. En el presente proyecto el producto de interés es la concentración celular y el análisis del proceso de inducción no fue discutido.

Dado que el presente proyecto se centra en la optimización de un protocolo industrial ya existente, lo primero fue realizar un scale-down del proceso productivo. Escalando el procedimiento utilizado por Centrovet en reactores industriales de 180 L, a reactores de laboratorio de 1 L fue posible caracterizar los parámetros productivos antes mencionados a modo de tener un experimento control.

La empresa utiliza dos estrategias de alimentación para generar cultivos de alta densidad celular. Por un lado han explorado una estrategia conservadora como es el pH-stato. Dicha estrategia alimenta el cultivo al observar un aumento en el pH debido a la inanición, la cuál depende de la excreción de iones de amonio intracelulares. Dado que

la capacidad basificante celular es limitada dicha estrategia es sumamente conservadora. Más aun se observó que dicho principio no se prolonga por más de 5 horas, y en consecuencia el cultivo deja rápidamente de ser alimentado. Por otro lado, han utilizado estrategias de alimentación predefinidas en cultivos fed batch limitados en glucosa. Dicha estrategia es sumamente sensible a los parámetros estimados e impuestos y, por ende, requiere de una correcta caracterización del proceso. La principal limitación observada en dicha estrategia fue – además de la estimación errónea de los parámetros– que la tasa específica de crecimiento impuesta en la fase alimentada es la misma que aquella observada en la fase batch. Esto genera un notorio desvío de la fuente de carbono hacia las vías fermentativas, generando la formación de compuestos secundarios inhibitorios.

El oxígeno disuelto es un sustrato de suma importancia para microorganismos aeróbicos. Su carencia reduce significativamente la eficiencia energética celular y trae consigo el sobreflujo metabólico, lo que aumenta la concentración de productos secundarios inhibitorios, los cuales reducen los parámetros productivos del proceso. Para el caso de *E. coli*, su alta tasa de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x} = 0,8 \text{ h}^{-1}$ en medio semi-definidos y $\mu_{m\acute{a}x} = 0,5 \text{ h}^{-1}$ en medio definido) combinada con altas demandas de oxígeno ($q_{o,m\acute{a}x} = 95,2 \text{ mg O}_2/\text{g DCW/h}$), hacen que el consumo biológico de oxígeno sea muy elevado y su transferencia sea un cuello de botella productivo crítico. Mediante simulación, se estimó la biomasa máxima admisible según las restricciones físicas de transferencia del reactor. Los parámetros productivos sub-óptimos observados generaron la necesidad de aumentar la capacidad de transferencia de oxígeno. Dado que la constante de

transferencia de masa corresponde al máximo permisible del reactor se buscó aumentar la transferencia aumentando la solubilidad de oxígeno en el medio enriqueciendo la corriente gaseosa con oxígeno. Mediante la caracterización de la transferencia de masa se desarrolló y sintonizó una nueva estrategia de control de oxígeno que manipula adicionalmente la corriente gaseosa de oxígeno. La capacidad de transferencia máxima aumentó 7 veces y con ello se liberó dicho cuello de botella.

La definición del medio de cultivo tanto de la fase batch como de la fase alimentada es otro factor crucial en términos productivos. Aportar todos los requerimientos nutricionales al microorganismo es clave para que exista un crecimiento sano y capaz de alcanzar altas densidades celulares. A su vez, la adición de aminoácidos y cofactores enzimáticos (e.g. vitaminas) permite a la célula ahorrarse el tedioso trabajo de producir dichos sustratos y en consecuencia favorece la velocidad de crecimiento. Para elaborar el medio de cultivo se estimaron los rendimientos en diferentes sustratos a través de quimiostatos para cada factoría celular. El efecto de optimizar el medio de cultivo fue cuantificado en cultivos de *S. cerevisiae*. Utilizando la misma estrategia de alimentación se observó 2.5 veces más de biomasa final con una productividad volumétrica dos veces superior utilizando el medio optimizado comparado con el medio de la empresa.

Cabe destacar que los escasos requerimientos nutricionales de *E. coli* hacen que dicha factoría crezca a altas tasas de crecimiento en medios definidos. Esto, sumado al alto consumo de oxígeno, hace que las tasas de crecimiento observadas en medios definidos sean adecuadas y acorde a las capacidades físicas de transferencia de oxígeno. Para *Saccharomyces cerevisiae* este no es el caso. *S. cerevisiae* N30 posee una tasa específica

de crecimiento notoriamente menor ($\mu_{m\acute{a}x} = 0,36 \text{ h}^{-1}$ en medio semi-definido y $\mu_{m\acute{a}x} = 0,27 \text{ h}^{-1}$ en medio definido), y menor consumo de oxígeno ($q_{o,m\acute{a}x} = 37,4 \text{ mg O}_2/\text{g DCW/h}$). Considerando que la transferencia de oxígeno no era un problema en este sistema, se buscó agilizar la velocidad de crecimiento mediante cultivos semi-definidos. Correctamente suplidas las necesidades nutricionales respecto del medio de cultivo y transferencia de oxígeno es posible desarrollar estrategias fed batch efectivamente limitadas en glucosa. El principal problema de dichas estrategias es el metabolismo de sobreflujo. Altas tasas de crecimiento al igual que falta de oxígeno generar metabolismo de sobreflujo.

Mediante un modelo que considera sobreflujo metabólico (formación y consumo) se caracterizaron los parámetros dinámicos claves de ambas factorías celulares en cultivos batch. De particular importancia es el parámetro $\mu_{cr\acute{it}ico}$, que corresponde a la tasa específica de crecimiento sobre la cual existe sobreflujo metabólico. Dicho modelo fue utilizado en *E. coli* para comparar la eficiencia de dos cepas diferentes JM109 (DE3) y BL21 (DE3). La mayor tasa específica de crecimiento crítica de las cepas B ($0,5 \text{ h}^{-1}$) versus las cepas K ($0,25 \text{ h}^{-1}$) permitió seleccionar la primera como cepa de trabajo. Dicho modelo fue utilizado en *S. cerevisiae* para comparar la influencia de la suplementación del medio con una fuente compleja de aminoácidos. De dicha calibración se concluyó que existe una notoria mejora de crecimiento en el medio semi-definido comparada con el medio definido, observada por la tasa específica de crecimiento máxima, el rendimiento de biomasa en sustrato y el menor requerimiento de

oxígeno. A su vez se observó que independiente del medio la tasa específica de crecimiento crítica es de 0,135 h⁻¹.

Utilizando las tasas específicas de crecimiento críticas estimadas para cada factoría se elaboraron diferentes estrategias de alimentación. La aparente variación de la tasa específica de crecimiento crítica con la biomasa del sistema (efecto no incorporado en el modelo), llevó a generar estrategias de alimentación cuya tasa específica de crecimiento decreciera exponencialmente. La transición gradual del crecimiento celular desde la fase batch a la fase fed resultó en parámetros productivos notoriamente superiores a la estrategia de alimentación clásica (Figura 4-20 y 4-21 'Constante' vs. Decreciente 1'). A su vez permitieron reducir la demanda biológica de oxígeno y aumentar la productividad del proceso.

La Figura 5-1 muestra la concentración celular final de *E. coli* y *S. cerevisiae* utilizando un scale-down del protocolo utilizado en Centrovet versus la concentración obtenida luego de la optimización realizada en la PUC. Observar que se logró aumentar la biomasa final en un 440% para el caso de *E. coli* y en un 360% para el caso de *S. cerevisiae*.

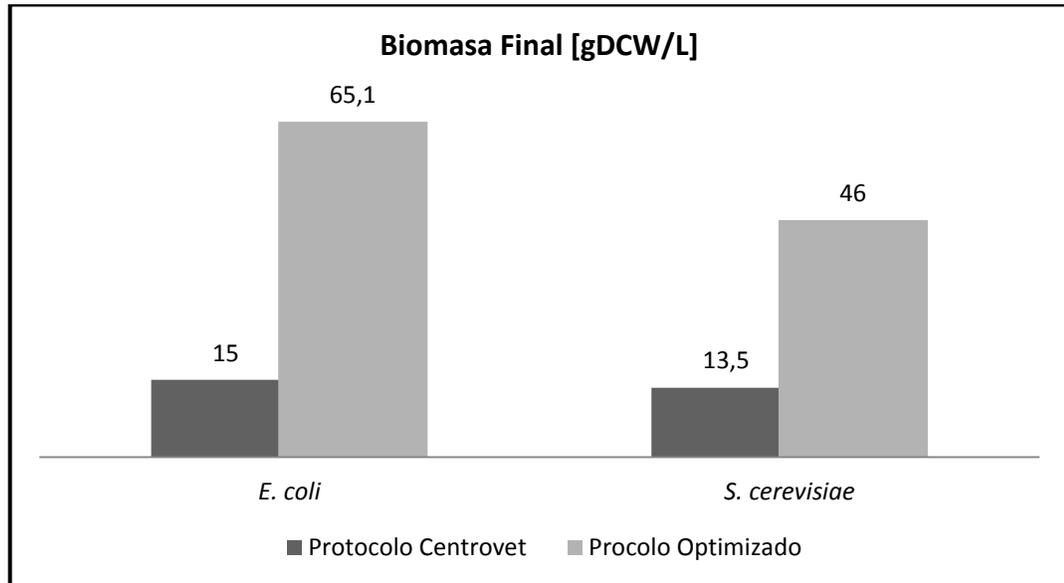


Figura 5- 1. Concentración celular máxima con protocolo Centroviet y protocolo optimizado PUC para cultivos fed batch de *E. coli* y *S. cerevisiae*.

La Figura 5-2 muestra la productividad volumétrica para ambas factorías celulares al comparar el protocolo optimizado PUC con un scale-down del protocolo utilizado en la empresa. En resumen, se logró triplicar la productividad en cultivos de *E. coli* y duplicar para cultivos de levadura.

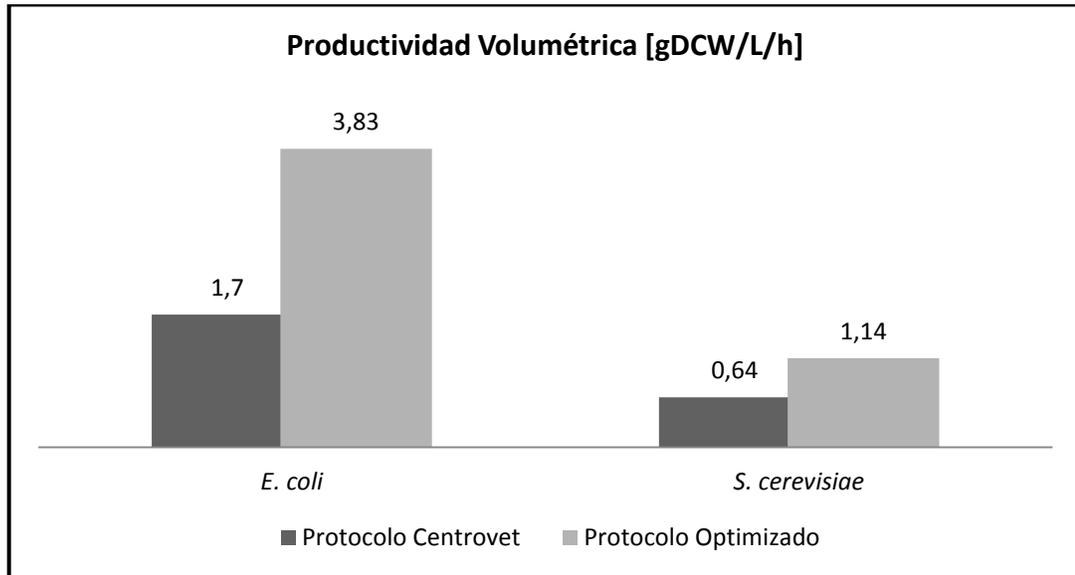


Figura 5- 2. Productividad volumétrica máxima con protocolo Centrovet y protocolo optimizado en cultivos fed batch de *E. coli* y *S. cerevisiae*.

5.2. Conclusiones

La generación de cultivos de alta densidad celular es un proceso sumamente complejo que involucra diversos campos desde la biológica, bioquímica, ingeniería química, ingeniería eléctrica, entre otros. La sección 2 del presente trabajo resume las principales variables físicas y ambientales que afectan el crecimiento microbiológico. A su vez se mencionan las diferentes estrategias de control utilizadas para generar cultivos de alta densidad celular de literatura.

El bioreactor y el sistema de control son cruciales para generar cultivos de alta densidad celular. Como se mencionó anteriormente el crecimiento celular es sumamente sensible a las variables operacionales y en consecuencia el control de dichas variables es clave. Para ello lo primero fue elaborar una plataforma de cultivos que cumpliera con los requisitos requeridos para el propósito planteado. Dicho trabajo fue realizado en un equipo altamente interdisciplinario de profesionales y alumnos de pregrado. Se desarrolló una plataforma de 4 reactores con control automático de temperatura, pH y oxígeno disuelto, y medición de la composición de la corriente gaseosa. Se implementó también un sistema de registro y visualización de datos en línea, y desarrolló un sistema de visualización y control remoto. Con el hard- y soft-ware desarrollado se generó un protocolo para la elaboración de cultivos de alta densidad celular en la presente plataforma (Anexo B). Dicho protocolo ha sido elaborado con el *know-how* adquirido durante el trabajo realizado en el año 2012.

Dicha plataforma productiva permitió correctamente caracterizar los parámetros productivos del protocolo utilizado por Centrovet a escala de laboratorio. Los resultados obtenidos fueron utilizados como control en el proceso de optimización.

La elaboración y calibración de un modelo dinámico de sobreflujo metabólico permitió correctamente estimar parámetros dinámicos claves de ambas factorías celulares utilizadas. Mediante simulación se visualizó la necesidad imperativa de aumentar la tasa de transferencia de oxígeno para alcanzar las productividades deseadas.

Mediante un control de rango dividido se implementó y validó una estrategia de control automático de oxígeno disuelto con enriquecimiento gaseoso de oxígeno (Anexo A). El control de oxígeno fue robusto a pesar de lo ruidoso del sistema, y permitió exitosamente alcanzar cultivos de alta densidad celular.

Las estrategias de alimentación propuestas consisten de cultivos limitados en glucosa y por ende la caracterización de los requerimientos nutricionales es crítica. Todo sustrato diferente a glucosa, debe encontrarse suplementado en el medio a concentraciones que no sean inhibitorias y que permitan el crecimiento celular a altas densidades celulares. La definición del medio de cultivo mediante la estimación empírica del rendimiento a través de quimiostatos resultó ser una estrategia exitosa para dicho objetivo.

Conociendo el metabolismo de las factorías celulares utilizadas fue posible elaborar estrategias de alimentación que aumentaron considerablemente la concentración celular final y la productividad volumétrica en ambas factorías celulares.

5.3. Perspectivas

El desarrollo de un protocolo optimizado a escala de laboratorio para generar cultivos de alta densidad celular permite aumentar la capacidad productiva de Centrovet. La estrategia aquí planteada es el primer paso para generar cultivos de alta densidad celular de mayor complejidad y robustez. En primer lugar, la elaboración de modelos dinámicos con un mayor número de variables en línea - como pH, composición gaseosa de la corriente de salida (oxígeno y dióxido de carbono) - permitirán predecir con mayor certeza la dinámica del proceso. Con ello es posible implementar un filtro de Kalman extendido para estimar, mediante sensores virtuales, la concentración de productos inhibitorios del metabolismo de sobreflujo. Así es posible generar estrategias de control realimentadas, de mayor robustez y autonomía, en cultivos de alta densidad celular.

Por otro lado, la observación de una relación entre la tasa específica de crecimiento crítica y la biomasa del sistema es una dependencia que no ha sido explorada en literatura. La elaboración de modelos matemáticos que incluyan dicha relación inhibitoria de la biomasa sería un notorio aporte a la comunidad, ya que permitiría definir estrategias de alimentación más acorde al sistema.

A pesar de que el presente estudio se enfoca en la optimización del proceso productivo propiamente tal, es clave recordar que la ingeniería genética del microorganismo es igualmente importante, y que en conjunto logran resultados aun mejores. Particularmente, se observó que la cepa de trabajo de levadura era una cepa con notorio sobreflujo metabólico. Disminuir dicho flujo hacia vías oxidativas mediante ingeniería metabólica sería algo tremendamente atingente y que mejoraría altamente los resultados.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, M. R., Little, C. L., & Easter, M. C. (1991). Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. *The Journal of applied bacteriology*, 71(1), 65–71.
- Akesson, M, Karlsson, E. N., Hagander, P., Axelsson, J. P., & Tocaj, A. (1999). On-line detection of acetate formation in *Escherichia coli* cultures using dissolved oxygen responses to feed transients. *Biotechnology and bioengineering*, 64(5), 590–8.
- Akesson, Mats, Hagander, P., & Axelsson, J. P. (1999). A probing feeding strategy for *Escherichia coli* cultures. *Biotechnology Techniques*, 13(8), 523–528.
- Akesson, Mats, Hagander, P., & Axelsson, J. P. (2001). Probing control of fed-batch cultivations: analysis and tuning. *Control Engineering Practice*, 9(7), 709–723.
- Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C., & Gustafsson, L. (1996). Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Applied and environmental microbiology*, 62(9), 3187–95.
- Arroyo-López, F. N., Orlić, S., Querol, A., & Barrio, E. (2009). Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International journal of food microbiology*, 131(2-3), 120–7.
- Bae, C.-S., Hong, M.-S., Chang, S.-G., Kim, D.-Y., & Shin, H.-C. (1997). Optimization of fusion proinsulin production by high cell-density fermentation of recombinant *E. coli*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2(1), 27–32.
- Bauer, K. A., Ben-Bassat, A., Dawson, M., De la Puente, V. T., & Neway, J. O. (1990). Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutant. *Appl. Envir. Microbiol.*, 56(5), 1296–1302.
- Booth, I. R. (1985). Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological reviews*, 49(4), 359–78.
- Broughall, J. M., Anslow, P. A., & Kilsby, D. C. (1983). Hazard analysis applied to microbial growth in foods: development of mathematical models describing the effect of water activity. *The Journal of applied bacteriology*, 55(1), 101–10.
- Bull, D. N. (1983). Fermentation and Genetic Engineering: Problems and Prospects. *Nature Biotechnology*, 1(10), 847–856.

- Charoenchai, C., Fleet, G. H., & Henschke, P. A. (1998). Effects of Temperature, pH, and Sugar Concentration on the Growth Rates and Cell Biomass of Wine Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49(3), 283–288.
- Cutayar, J. M., & Poillon, D. (1989). High cell density culture of E. coli in a fed-batch system with dissolved oxygen as substrate feed indicator. *Biotechnology Letters*, 11(3), 155–160.
- D'Amato, D., Corbo, M. R., Nobile, M. A. Del, & Sinigaglia, M. (2006). Effects of temperature, ammonium and glucose concentrations on yeast growth in a model wine system. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(10), 1152–1157.
- De Felice, M., Mattanovich, D., Papagianni, M., Wegrzyn, G., & Villaverde, A. (2008). The scientific impact of microbial cell factories. *Microbial cell factories*, 7(1), 33.
- Dewasme, L., Goffaux, G., Hantson, A.-L., & Vande Wouwer, A. (2011). Extended Kalman Filter Design for Acetate Estimation in E. Coli Cultures. *IFAC World Congress* (Vol. 18, pp. 6218–6223).
- Dewasme, L., Srinivasan, B., Perrier, M., & Vande Wouwer, A. (2011). Extremum-seeking algorithm design for fed-batch cultures of microorganisms with overflow metabolism. *Journal of Process Control*, 21(7), 1092–1104.
- Doren Daniela, & Gabella Juan Pablo. (2001). Salmonicultura en Chile: Desarrollo, Proyecciones e Impacto. *Terram Publicaciones*.
- Egea, J. A., Rodríguez-Fernández, M., Banga, J. R., & Martí, R. (2006). Scatter search for chemical and bio-process optimization. *Journal of Global Optimization*, 37(3), 481–503.
- Eiteman, M. A., & Altman, E. (2006). Overcoming acetate in Escherichia coli recombinant protein fermentations. *Trends in biotechnology*, 24(11), 530–6.
- Enfors, S.-O. (2011). *Fermentation Process Engineering* (1st ed.). Stockholm: School of Biotechnology Royal Institute of Technology.
- Factors that Influence Microbial Growth. (2003). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(s2), 21–32.
- FDA. (2013). Generally Recognized as Safe (GRAS). Center for Food Safety and Applied Nutrition.

- Frahm, B., Blank, H.-C., Cornand, P., Oelssner, W., Guth, U., Lane, P., Munack, A., et al. (2002). Determination of dissolved CO₂ concentration and CO₂ production rate of mammalian cell suspension culture based on off-gas measurement. *Journal of biotechnology*, 99(2), 133–48.
- G L Kleman, J. J. C. (1991, April 1). Glucose-stat, a glucose-controlled continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology (ASM).
- Garcia, D., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2011). Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food microbiology*, 28(3), 406–17.
- Garcia-Ochoa, Felix, & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnology advances*, 27(2), 153–76.
- Garcia-Ochoa, Félix, & Gomez, E. (2004). Theoretical prediction of gas–liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chemical Engineering Science*, 59(12), 2489–2501.
- Hassan, H. M., & Fridovich, I. (1977). Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 129(3), 1574–83.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (1992). *Modern Food Microbiology* (4th ed.). New York: Chapman & Hall.
- Johnston, W., Cord-Ruwisch, R., & Cooney, M. J. (2002). Industrial control of recombinant *E. coli* fed-batch culture: new perspectives on traditional controlled variables. *Bioprocess and biosystems engineering*, 25(2), 111–20.
- Kar, S., Edgar, R., & Adhya, S. (2005). Nucleoid remodeling by an altered HU protein: reorganization of the transcription program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), 16397–402.
- Kim, B S, Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K., & Woo, S. I. (1994). Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnology and bioengineering*,
- Kim, Beom Soo, Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K., & Woo, S. I. (1994). Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate control using on-line glucose analyzer. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(7), 556–561.

- Kim, Beom Soo, Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, Y. K., & Chang, H. N. (2004). High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat. *Bioprocess and biosystems engineering*, *26*(3), 147–50.
- Kleman, G. L., & Strohl, W. R. (1994). Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell-density fermentation. *Applied and environmental microbiology*, *60*(11), 3952–8.
- Korz, D. J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E. A., & Deckwer, W.-D. (1995). Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, *39*(1), 59–65.
- Landi, C., Paciello, L., De Alteriis, E., Brambilla, L., & Parascandola, P. (2011). Effect of auxotrophies on yeast performance in aerated fed-batch reactor. *Biochemical and biophysical research communications*, *414*(3), 604–11.
- Lee, S. Y. (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in biotechnology*, *14*(3), 98–105. doi:10.1016/0167-7799(96)80930-9
- Luli, G. W., & Strohl, W. R. (1990). Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Envir. Microbiol.*, *56*(4), 1004–1011.
- Macaloney, G., Draper, I., Preston, J., Anderson, K. B., Rollins, M. J., Thompson, B. G., Hall, J. W., et al. (1996). At-Line Control and Fault Analysis In an Industrial High Cell Density *Escherichia Coli* Fermentation, Using NIR Spectroscopy.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2008). *Brock Biology of Microorganisms (12th Edition)*. (Micheal T Madigan & J. M. Martinko, Eds.) *Cell* (Vol. 2, p. 1168). Benjamin Cummings.
- Mateles, R. I., & Battat, E. (1974). Continuous culture used for media optimization. *Applied microbiology*, *28*(6), 901–5.
- McMeekin, T. A., Chandler, R. E., Doe, P. E., Garland, C. D., Olley, J., Putro, S., & Ratkowsky, D. A. (1987). Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosus*. *The Journal of applied bacteriology*, *62*(6), 543–50.
- McMeekin, T. A., Ross, T., & Olley, J. (1992). Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fish products. *International journal of food microbiology*, *15*(1-2), 13–32.

- Mendoza-Vega, O., Hebert, C., & Brown, S. W. (1994). Production of recombinant hirudin by high cell density fed-batch cultivations of a *Saccharomyces cerevisiae* strain: physiological considerations during the bioprocess design. *Journal of biotechnology*, 32(3), 249–59.
- Neeleman, R., Van den End, E. J., & Van Boxtel, A. J. (2000). Estimation of the respiration quotient in a bicarbonate buffered batch cell cultivation. *Journal of biotechnology*, 80(1), 85–94.
- Nielsen, J., Villadsen, J., & Lidén, G. (2002). *Bioreaction Engineering Principles* (Second., pp. 47–94). Kluwe Academic/Plenum Publishers.
- Noronha, S. B., Wagner, L. W., Matheson, N. H., & Shiloach, J. (1999). Use of an ethanol sensor for feedback control of growth and expression of TBV25H in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering*, 63(3), 285–9.
- Ogunnaike, B. A., & Ray, W. H. (1994). *Process Dynamics, Modeling, and Control* (Second., pp. 459–505). New York: Oxford University Press.
- Paalme, T., Elken, R., Kahru, A., Vanatalu, K., & Vilu, R. (1997). The growth rate control in *Escherichia coli* at near to maximum growth rates: the A-stat approach. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71(3), 217–30.
- Paalme, T., Tiisma, K., Kahru, A., Vanatalu, K., & Vilu, R. (1990). Glucose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnology and bioengineering*, 35(3), 312–9.
- Pan, J. G., Rhee, J. S., & Lebeault, J. M. (1987). Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnology Letters*, 9(2), 89–94
- Park, Y. S., Kai, K., Iijima, S., & Kobayashi, T. (1992). Enhanced beta-galactosidase production by high cell-density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control. *Biotechnology and bioengineering*, 40(6), 686–96.
- Peppler, H. J. (1967). *Microbial Technology*. (H. J. Peppler, Ed.) (1st ed., p. 421). New York: Reinhold.
- Petersen, N., Odman, P., Padrell, A. E. C., Stocks, S., Lantz, A. E., & Gernaey, K. V. (2010). In situ near infrared spectroscopy for analyte-specific monitoring of glucose and ammonium in *Streptomyces coelicolor* fermentations. *Biotechnology progress*, 26(1), 263–71.

- Pham, H. T. B., Larsson, G., & Enfors, S.-O. (1999). Modelling of aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a pH-auxostat. *Bioprocess Engineering*, 20(6), 537–544.
- Pham, H. T., Larsson, G., & Enfors, S. O. (1998). Growth and energy metabolism in aerobic fed-batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*: simulation and model verification. *Biotechnology and bioengineering*, 60(4), 474–82.
- Pinsach, J., De Mas, C., & López-Santín, J. (2006). A simple feedback control of *Escherichia coli* growth for recombinant aldolase production in fed-batch mode. *Biochemical Engineering Journal*, 29(3), 235–242.
- Praphailong, W., & Fleet, G. . (1997). The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiology*, 14(5), 459–468.
- Presser, K. A., Ross, T., & Ratkowsky, D. A. (1998). Modelling the Growth Limits (Growth/No Growth Interface) of *Escherichia coli* as a Function of Temperature, pH, Lactic Acid Concentration, and Water Activity. *Appl. Envir. Microbiol.*, 64(5), 1773–1779.
- Pronk, J. T. (2002). Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2095–100.
- Reiling, H. E., Laurila, H., & Fiechter, A. (1985). Mass culture of *Escherichia coli*: Medium development for low and high density cultivation of *Escherichia coli* B/r in minimal and complex media. *Journal of Biotechnology*, 2(3-4), 191–206.
- Riesenberg, D., & Guthke, R. (1999). High-cell-density cultivation of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(4), 422–430.
- Riesenberg, D., Schulz, V., Knorre, W. A., Pohl, H.-D., Korz, D., Sanders, E. A., Roß, A., et al. (1991). High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *Journal of Biotechnology*, 20(1), 17–27.
- Rosso, L., Lobry, J., Bajard, S., & Flandrois, J. (1995a). Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. *Appl. Envir. Microbiol.*, 61(2), 610–616. Rosso, L., Lobry, J., Bajard, S., & Flandrois, J. (1995b). Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. *Appl. Envir. Microbiol.*, 61(2), 610–616. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/61/2/610>

- Sacher, J., Saa, P., Cárcamo, M., López, J., Gelmi, C. a., & Pérez-Correa, R. (2011). Improved calibration of a solid substrate fermentation model. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(5).
- Shadbolt, C. T., Ross, T., & McMeekin, T. A. (1999). Nonthermal death of *Escherichia coli*. *International journal of food microbiology*, 49(3), 129–38.
- Shurtleff, W., & Aoyagi, A. (2007). *A Brief History of Fermentation, East and West*. Soy Info Center. Lafayette, California.
- Skinner, G. E., Larkin, J. W., & Rhodehamel, E. J. (1994). MATHEMATICAL MODELING OF MICROBIAL GROWTH: A REVIEW. *Journal of Food Safety*, 14(3), 175–217.
- Sonnleitner, B., Locher, G., & Fiechter, A. (1992). Biomass determination. *Journal of Biotechnology*, 25(1-2), 5–22.
- Sundström, H., & Enfors, S.-O. (2008). Software sensors for fermentation processes. *Bioprocess and biosystems engineering*, 31(2), 145–52. 5
- Svensson, M., Han, L., Silfversparre, G., Häggström, L., & Enfors, S.-O. (2005). Control of endotoxin release in *Escherichia coli* fed-batch cultures. *Bioprocess and biosystems engineering*, 27(2), 91–7. doi:10.1007/s00449-004-0377-x
- Tabandeh, F., Khodabandeh, M., Yakhchali, B., Habib-Ghomi, H., & Shariati, P. (2008). Response surface methodology for optimizing the induction conditions of recombinant interferon beta during high cell density culture. *Chemical Engineering Science*, 63(9), 2477–2483.
- Todar, K. (2006). *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.
- Van Hoek, P., De Hulster, E., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2000). Fermentative capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast. *Biotechnology and bioengineering*, 68(5), 517–23.
- Van Uden, N., & Da Cruz Duarte, H. (1981). Effects of ethanol on the temperature profile of *Saccharomyces cerevisiae*. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 21(10), 743–50.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A., & Van Dijken, J. P. (1990). Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *Journal of general microbiology*, 136(3), 395–403.

Vicente, A., Castrillo, J. I., Teixeira, J. A., & Ugalde, U. (1998). On-line estimation of biomass through pH control analysis in aerobic yeast fermentation systems. *Biotechnology and bioengineering*, 58(4), 445–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10099279>

Villadsen, J., & Patil, K. R. (2007). Optimal fed-batch cultivation when mass transfer becomes limiting. *Biotechnology and bioengineering*, 98(3), 706–10.

Wang, F., & Lee, S. Y. (1998). High cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli* for the production of poly(3-hydroxybutyrate) in a defined medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(2-3), 325–328.

Wolfe, A. J. (2005). The acetate switch. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 69(1), 12–50.

Xiong, Z.-Q., Guo, M.-J., Guo, Y.-X., Chu, J., Zhuang, Y.-P., Wang, N. S., & Zhang, S.-L. (2010). RQ feedback control for simultaneous improvement of GSH yield and GSH content in *Saccharomyces cerevisiae* T65. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7), 598–602.

Xu, B., Jahic, M., & Enfors, S. O. (1999). Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology progress*, 15(1), 81–90.

Yee, L., & Blanch, H. W. (1993a). Defined media optimization for growth of recombinant *Escherichia coli* X90. *Biotechnology and Bioengineering*, 41(2), 221–230.

Yee, L., & Blanch, H. W. (1993b). Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, 41(8), 781–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18609622>

Yong Tao, Qiong Cheng, & Alexander D. Kopatsis. (2012). *Microbial Metabolic Engineering*. (Q. Cheng, Ed.) (Vol. 834, pp. 283–304). New York, NY: Springer New York.

Zwietering, M. H., De Koos, J. T., Hasenack, B. E., De Witt, J. C., & van't Riet, K. (1991). Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and environmental microbiology*, 57(4), 1094–101.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*, 56(6), 1875–81.

ANEXOS

ANEXO A. EFFECTIVE DISSOLVED OXYGEN CONTROL STRATEGY FOR HIGH-CELL-DENSITY CULTURES. ARTÍCULO ACEPTADO PARA PUBLICACIÓN EN INTERNATIONAL JOURNAL OF COMPUTERS COMMUNICATIONS & CONTROL – IJCCC (ISI).

M. Cárcamo P. A. Saa J. Torres S. Torres
 P. Mandujano J. R. Pérez-Correa E. Agosin

Martín Cárcamo Behrens
Department of Chemical and Bioprocess Engineering
Pontificia Universidad Católica de Chile
Av. Vicuña Mackenna 4860, Santiago, Chile.
mrcarcamo@uc.cl

Pedro A. Saa
Department of Chemical and Bioprocess Engineering
Pontificia Universidad Católica de Chile
Av. Vicuña Mackenna 4860, Santiago, Chile.
pnsaa@uc.cl

Jorge Torres
Department of Chemical and Bioprocess Engineering
Pontificia Universidad Católica de Chile
Av. Vicuña Mackenna 4860, Santiago, Chile.
jitorres@uc.cl

Samuel Torres
Department of Chemical and Bioprocess Engineering
Pontificia Universidad Católica de Chile
Av. Vicuña Mackenna 4860, Santiago, Chile.
storres@ing.puc.cl

Patricio Mandujano
Centrovét Ltda.
Av. Los Cerrillos 602, Santiago
patricio.mandujano@centrovét.com

José Ricardo Pérez-Correa
Department of Chemical and Bioprocess Engineering
Pontificia Universidad Católica de Chile
Av. Vicuña Mackenna 4860, Santiago, Chile.
perez@ing.puc.cl
* Corresponding Author

Eduardo Agosin Trumper
Department of Chemical and Bioprocess Engineering
Pontificia Universidad Católica de Chile
Av. Vicuña Mackenna 4860, Santiago, Chile.
agosin@ing.puc.cl

Abstract

Dissolved oxygen control is a key factor in microorganisms' growth for productive purposes. Since biological oxygen consumption strongly depends on biomass concentration, high cell-density cultures require increasing and continuous oxygen supply. This is a great challenge in terms of control and one of the major limitations of this type of cultures. The aim of this paper is to design a simple dissolved oxygen control strategy capable of achieving high biomass levels by manipulating three process variables: agitation, aeration and oxygenation. This strategy was developed using a split-range control scheme, designed so that the controller action is linear with respect to the maximum transfer rate ($k_{La} \cdot DO^*$). The controller parameters were estimated by simulation and then validated in *Escherichia coli* fed-batch cultures. The hereby presented strategy allowed reaching high biomass concentrations while maintaining oxygen concentration at an appropriate level. The implementation of this strategy in high cell-density cultures will help improving the productivity of aerobic cultures.

Keywords: control strategy, split-range, volumetric mass transfer coefficient, high cell-density cultures.

1. Introduction

Biotechnology consists on the technological application of biological systems, living organisms or its derivatives to generate or modify products or processes with a particular, generally industrial, use. Its great flexibility, productivity and specificity, make biotechnological processes the most promising field within the various areas of process engineering (Gavrilescu & Chisti, 2005).

Particularly, fermentative processes are widely used in food industry, commodities, pharmaceutical and enzyme production (Petersen et al., 2010). In these processes, a given microorganism, generally genetically modified, is grown in a liquid culture media to produce a particular metabolite. Despite the attributes of biotechnology and because of the biological nature of the system, process operation and control are highly complicated.

To increase the productivity of the process, the first step is to maximize the amount of biomass in the medium. Once achieved reasonable biomass levels, i.e. between 20 and 50 grams of dry weight per liter (gdw/L) (Bae et al., 1997; Kim et al., 1994; Yong Tao et al., 2012), the microorganism is induced to promote the production of the metabolite of interest.

The general strategy to achieve high cell-densities is the fed-batch strategy. It consists in an initial batch phase, in which cells grow freely until one of the essential nutrients becomes limiting. At this point, the feeding phase is initiated and the limiting substrate is supplied to the culture following a particular control strategy that allows reaching high cell-densities in the shortest possible time (Riesenberget al., 1991; Veloso, Rocha, & Ferreira, 2009; John Villadsen & Patil, 2007). Commonly, this strategy is employed when the limiting substrate or a byproduct related to its consumption exerts an inhibitory effect; hence its supply must be dosed (Enfors, 2011).

Oxygen is an essential nutrient for cellular growth, as it allows the complete oxidation of substrates, which in turn significantly increases the energy efficiency of the organism. Such nutrient is commonly supplied in the gas inlet stream inlet from which is transferred to the liquid phase where it becomes available for microorganisms to consume it.

Generally, oxygen limitation in microbiological cultures promotes the formation of inhibitory byproducts, restricting the biomass formation (Enfors, 2011; John Villadsen & Patil, 2007). Furthermore, high concentrations of dissolved oxygen are toxic, causing oxidative stress and consequently cell lysis (Hassan & Fridovich, 1977). Furthermore, as the biomass concentration rises, the biological oxygen consumption increases exponentially. Hence, high oxygen consumption systems require effective dissolved oxygen control strategies for achieving high cell densities and productivities.

The dissolved oxygen concentration in a suspension of microorganisms depends on the oxygen transfer rate (OTR), i.e. the rate upon oxygen is transported into the cell and on the oxygen uptake rate (OUR), i.e. the rate upon the microorganisms consumes oxygen for growth, maintenance and production of metabolites. Mass transfer is also strongly influenced by the hydrodynamic conditions of the bioreactor, which is mainly a function of: agitation, superficial gas velocity, geometric parameters of the bioreactor, physicochemical properties of the medium and the presence of oxygen consuming cells (Félix Garcia-Ochoa & Gomez, 2004; Saa, Moenne, Pérez-Correa, & Agosin, 2012).

Oxygen transfer rate is generally the limiting step in aerobic bioprocess because of the low solubility of oxygen in the medium. Thus, the correct measurement and/or prediction of the volumetric mass transfer coefficient (k_La) is crucial to design, operate and scale-up fermentation processes. For instance, in stirred tank bioreactors, high oxygen and heat transfer rates may be achieved by proper mixing of the medium. Factors such as the stirrer speed, type and number of mixers, sparger configurations and the superficial gas velocity, are critical to provide the proper mixing (Fujasová, Linek, & Moucha, 2007).

Different strategies have been reported and implemented to increase the oxygen transfer rate (Felix Garcia-Ochoa & Gomez, 2009; MacLennan & Pirt, 1966; Siegel & Gaden, 1962; J Villadsen, Nielsen, & Lidén, 2011). Some modify the configuration of the fermenter and turbines (Arjunwadkar, Sarvanan, Kulkarni, & Pandit, 1998; Fujasová et al., 2007; Moucha, Linek, & Prokopová, 2003), others seek *in situ* generation of oxygen (Ibrahim & Schlegel, 1980; Schlegel, 1977), while others increase the oxygen partial pressure either by enriching the oxygen gas stream (Flickinger & Perlman, 1977, 1979; J Villadsen et al., 2011) or by pressurizing the reactor (Onken & Liefke, 1989; Yang & Wang, 1992).

This article aims to develop and implement an automatic dissolved oxygen control strategy capable of achieving high cell-densities in a reproducible manner on a laboratory scale. To that end, we first characterized empirically the influence of the agitation, aeration and oxygenation on the OTR. Then, we calibrated a dynamic model describing the process, which allowed us to design and tune a split-range control scheme. Finally, we experimentally validated the control system in recombinant *Escherichia coli* fedbatch cultures.

2. Modelling

The microorganism's growth kinetics can be modelled employing a mass balance for the major culture compounds: biomass X (gdw/L), limiting substrate S (g/L) and dissolved oxygen DO (mg/L) (Enfors, 2011; J Villadsen et al., 2011). The instantaneous biomass growth rate is given by Eq. (1) and can be obtained as the product of the total biomass $X \cdot V$ (gdw) and the specific growth rate μ (1/h). The latter can be coupled to the limiting substrate consumption using a

Monod type kinetics as shown in Eq. (2) (John Villadsen & Patil, 2007), where μ_{\max} (1/h) is the maximum specific growth rate and K_S (g/L) denotes the inhibition constant. Thus, the mass balances for the biomass and the limiting substrate considering the feeding terms are the following:

$$\frac{d(X \cdot V)}{dt} = \mu \cdot X \cdot V \quad (1)$$

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad (2)$$

$$\frac{d(S \cdot V)}{dt} = -\frac{\mu \cdot X \cdot V}{Y_{SX}} + F_{in} \cdot S_{in} \quad (3)$$

where F_{in} (L/min) denotes the feeding stream flow, S_{in} (g/L) is the concentration of the limiting substrate in the inlet, V (L) is the liquid volume and Y_{SX} (gdw/g S) is the substrate to biomass yield.

As previously mentioned, the dynamic oxygen mass balance considers two terms: OTR and OUR. Thus, the oxygen mass balance expression is given by,

$$\frac{d(DO \cdot V)}{dt} = \underbrace{k_L a \cdot (DO^* - DO)}_{OTR} \cdot V - \underbrace{\frac{\mu \cdot X \cdot V}{Y_{OX}}}_{OUR} \quad (4)$$

where DO^* (mg/L) represents the oxygen saturation concentration in the medium, $k_L a$ (1/s) denotes the volumetric oxygen mass transfer coefficient and Y_{OX} (gdw/mg O₂) is the oxygen to biomass yield. During the culture's growth, the increasing biomass demands additional substrate as well as oxygen. The additional substrate fed is achieved by adjusting F_{in} to follow an exponential feeding policy associated to the biomass growth (John Villadsen & Patil, 2007). To maintain the dissolved oxygen at an appropriate level, the OTR must be increased. The latter can be accomplished either by increasing the volumetric oxygen mass transfer coefficient ($k_L a$) or the saturation concentration of dissolved oxygen (DO^*).

High cell-density cultures usually increase agitation and manipulate the inlet gas flow to increase the OTR (J Villadsen et al., 2011). Obviously, there is a physical limitation of the oxygenation system, as it possesses a maximum agitation speed and the inlet gas flow cannot exceed certain limits, otherwise the culture's operation would be compromised. Hence, to overcome these limitations, another employed strategy is to enrich the inlet gas flow with pure oxygen (Castan & Na, 2002). This strategy allows increasing the oxygen solubility in the medium as well as the oxygen gradient, which in turn increases the OTR (Eq. 4). Based on these facts, we chose to design a dissolved oxygen control strategy that sequentially manipulates the stirrer speed, air flow and oxygen flow.

3. Materials and Methods

3.1 Reactors and instrumentation

The experiments were carried out in 1 L bioreactors equipped with a stirrer and two Rushton turbines. The inlet gas was dispersed into the reactor through a stainless steel diffuser of 0.4 μm pore diameter located at the bottom.

The temperature, pH, aeration, dissolved oxygen and agitation were regulated employing a SIMATIC PCS7 control system (Siemens, Germany). This system possesses a PLC S7-400 control unit (CPU 416, Siemens) and several distributed remote I/O units connected by an industrial type PROFIBUS DP.

Figure 1 shows the simplified P&ID configuration of the oxygen control loop. The temperature was controlled by a PID control using a PT-100 and on-off valves and modulated by PWM (Pulse Modulation Width). On the other hand, the pH control system comprises a CPS Tophit 471D probe (Endress & Hauser, Germany), peristaltic pumps and a PID algorithm.

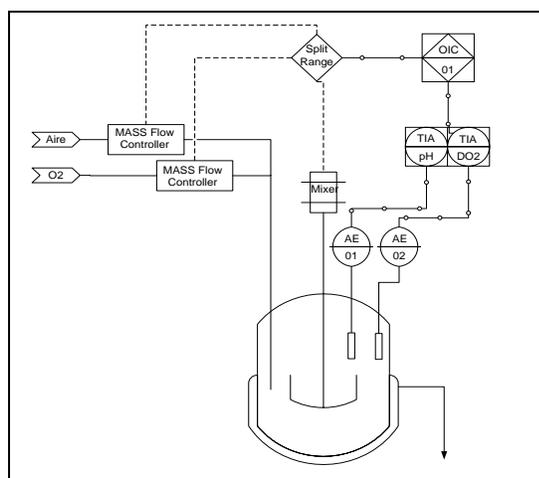


Figure 1. Piping and instrumentation diagram of the bioreactor control system.

The dissolved oxygen measurements were performed using an Oxymax COS22D probe (Endress & Hauser, Germany). This probe has several features that make it ideal for cell cultivation processes. It can not only monitor the dissolved oxygen, but also the oxygen percent saturation, partial pressure and temperature.

The agitation was carried out using stirrer equipped with a variable speed DC motor and an encoder integrated brand VEXTA of 30 pulses per revolution (AXH Series, Oriental Motor). Finally, the inlet gas flows, i.e. air and oxygen, were automatically adjusted employing calibrated mass flow controllers FMA-A2407 (Omega Engineering, Inc., Stamford, USA).

3.2 Dissolved oxygen measurement and control

Oxygen transfer is typically a limiting factor in aerobic cultures. In bioreactors, the manipulated variables influencing the OTR are: agitation speed, aeration and oxygen partial pressure. In order to manipulate these variables, the split-range control scheme is an appropriate solution as it allows manipulating multiple variables and extending the control range (Ogunnaike & Ray, 1994). So, we designed a triple split-range control scheme that sequentially manipulates agitation, airflow and oxygen flow (Fig. 2). The manipulation of the first two variables increases the k_La while keeping the DO^* constant. In contrast, the manipulation of the oxygen flow, maintaining the agitation and total gas flow fixed, allows increasing the DO^* while keeping the k_La constant.

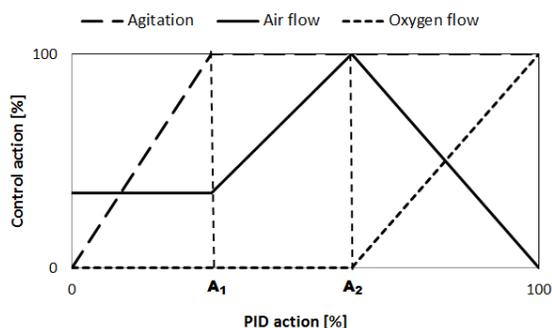


Figure 2. Split-range control scheme.

3.3 Control strategy implementation

The presented control strategy was ultimately implemented in the SIMATIC PCS7 control system using a standard parallel type PID algorithm. The latter has also a configurable dead-band and sample time for integral and derivative actions. The control block was built based on the modularity paradigm, allowing reutilization of driver software sections and exportation to other control systems.

During the system's operation, the PID controller output was employed to compute the control actions on the agitation, air flow and oxygen flow using the split-range scheme specially designed.

3.4 Characterization of the impact of agitation and gas flow on the k_La

In order to characterize the impact of the agitation and aeration on the k_La , several experiments were performed in which the agitation was varied between 300 and 800 rpm, keeping the air flow fixed in 0.2 L/min, and changing the air flow between 0.2 and 0.6 L/min, maintaining the agitation fixed in 800 rpm). All of these studies were carried out in the previously described

bioreactors with 0.4 L working volume, at 30°C and a fixed pH of 6.7 (culture conditions). Finally, to estimate the volumetric oxygen mass transfer coefficient in each run, the conventional dynamic method was employed (Taguchi & Humphrey, 1966).

4. Results and discussion

In order to estimate the dependence of the manipulated variables on the OTR, we characterized the impact of the gaseous flow and agitation on the kLa.

4.1 Influence of agitation on the k_La

Besides increasing the volumetric mass transfer coefficient agitation allows to maintain the culture under homogeneous conditions. However, the maximum value of agitation depends on the physical constraints of the reactor used. Then, the kLa coefficient was characterized for different agitation speeds varying from 300 to 800 rpm and a constant airflow of 0.2 L/min (0.5 vvm) (Fig. 3).

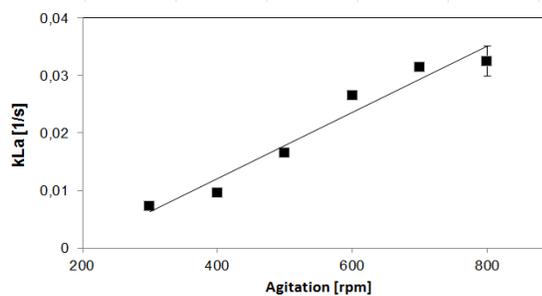


Figure 3. Influence of the agitation condition on the volumetric mass transfer coefficient.

4.2 Influence of aeration on the k_La

Aeration is a key process variable since as well as supplying oxygen to the culture it desorbs the carbon dioxide produced by the cells, which otherwise accumulates to an inhibitory level.

Figure 4 shows the dependence of the mass transfer coefficient for air flows between 0.2-0.6 L/min (0.5 and 1.5 vvm, respectively) and constant agitation of 800 rpm.

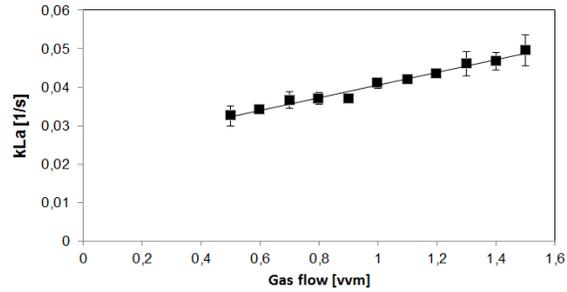


Figure 4. Impact of the gas flow injected on the volumetric mass transfer coefficient

4.2 Influence of oxygen enrichment

To further increase the OTR the inlet air stream was enriched with pure oxygen to increase its solubility in the liquid medium. The oxygen fraction, y_{O_2} , in the gaseous inlet stream is given by:

$$y_{O_2} = \frac{F_{\text{aire}} \cdot y_{O_2,\text{aire}} + F_{O_2} \cdot y_{O_2}}{F_{\text{total}}} \quad (5)$$

where F_i corresponds to the flow rate of gas i (air or oxygen) (L/min) and $y_{O_2,j}$ corresponds to the oxygen fraction of stream j (air or oxygen) in % v/v. Using Henry's law, the solubility of oxygen (DO^*) is calculated as:

$$DO^* = \frac{P_{\text{total}} \cdot y_{O_2}}{H_{O_2}} \quad (6)$$

where P_{total} is the working pressure of 1 atm and H_{O_2} is the Henry's constant for oxygen at 30°C (0.323 atm·L/mg O₂) (Saa et al., 2012). Figure 5 shows the influence of oxygen enrichment (between 0 and 100%) in oxygen solubility.

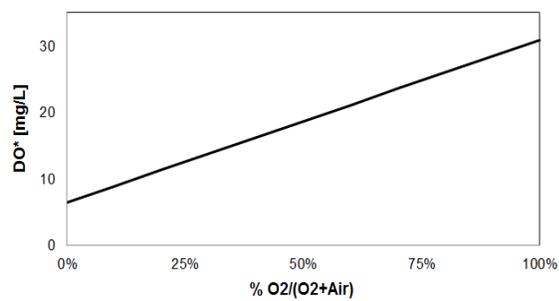


Figure 5. Effect of the oxygen enrichment on the oxygen saturation concentration at 30°C.

4.3 Spit-range parameters determination

To generate a simple linear control action a split-range which initially increases kLa (agitation and then aeration) with constant DO* followed by increasing DO* (oxygen enrichment) with constant kLa was designed. For this purpose, the ranges of action of each manipulated variable (agitation, aeration and oxygenation) were determined so that the controller's action was linear with respect to product, kLa·DO* (Fig. 6).

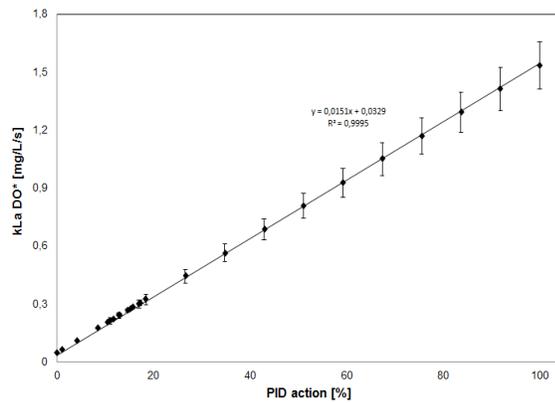


Figure 6. Variation of the kLa·DO* with the PID action. As showed in this Figure, the dependence of these variables is linear.

The resulting graph is shown in Figure 7. The action of each variable was changed from 0-100% according to its selected maximum and minimum values (300-800 rpm for agitation, 0 to 0.6 L/min for aeration; and 0-0.6 L/min for oxygenation). From this analysis it follows that a control action between 0-11% increases the agitation from 300 to 800 rpm, a control action between 11 and 18.5% increases the air gas stream from 0.5 to 1.5 vvm, and ultimately (for control actions over 18.5%) the oxygen gas flow rate is manipulated from 0 to 1.5 vvm, maintaining the total gas flow and kLa constant.

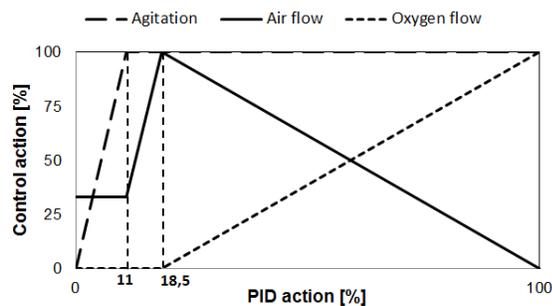


Figure 7. Designed split-range control scheme.

4.4 Simulation and PID tuning

For simulation and tuning of the proposed control scheme Simulink 7.8 software was used (MATLAB® R2011b). Figure 8 shows the simulation scheme.

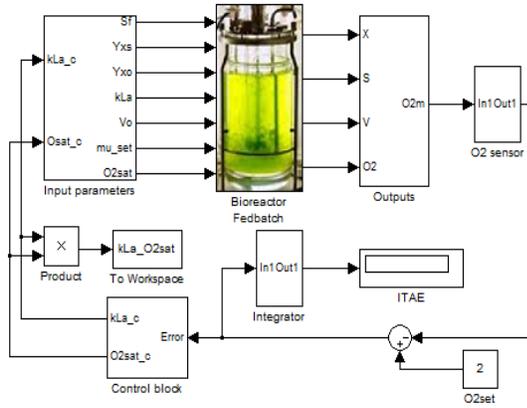


Figure 8. Simulated control block in Simulink

A PI controller was chosen for the calculation of the control action in the designed split-range scheme. The controller parameters tuning was achieved by minimizing the following cost function,

$$ITAE \int_0^{t_f} t \cdot |DO_{set} - DO_{meas}| dt \quad (7)$$

The parameters found were $K = 0.49$ (proportional gain) and $\tau I = 10$ s (integral time). Figures 9 and 10 show simulation results of the fed phase of the culture. The DO remains constant at 2 mg/L while the controller's action increases exponentially according to the growth of the microorganism.

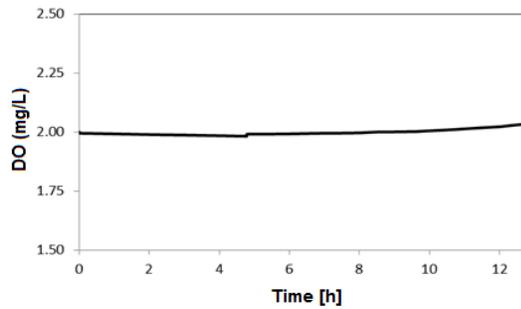


Figure 9. Simulation of the dissolved oxygen control during the fed phase in an aerobic culture.

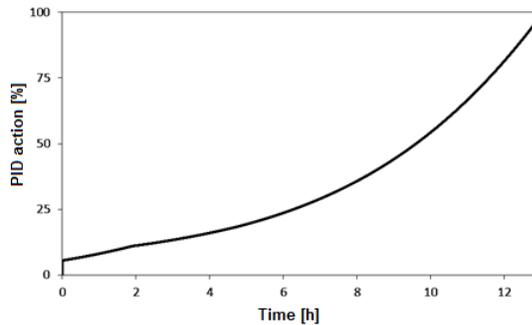


Figure 10. Evolution of the PID action during the fed phase.

4.5. Experimental validation

The experimental validation was performed in fedbatch cultures of *Escherichia coli* grown in a defined mineral media under the same conditions used for $k_{L,a}$ characterization (30 °C and pH 6.7).

Figure 11 shows the controlled variable DO and the controller action as a function of time in a typical fedbatch culture.

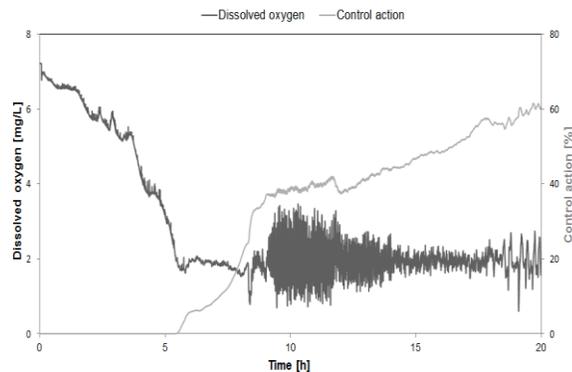


Figure 11. Experimental validation of the presented control strategy

Figure 12 shows the evolution of the manipulated variables: agitation, air and oxygen flow rates as a function of culture time. Time zero corresponds to the inoculation time. Over time the microorganism begins to proliferate and thus biological oxygen consumption increases, consequently DO decreases. Upon reaching the DO set point (2 mg/L) the controller's action increases to maintain the process variable at the desired value. Approximately 9 hours after the start of cultivation, the feeding phase begins and thereby the control signal becomes much noisier. This is mainly due to the use of pulse peristaltic pumps to supply the feeding solution. As a consequence feeding is discontinuous. When the feeding medium reaches the culture the oxygen consumption increases significantly (decreasing the DO) and when the limiting nutrient is completely consumed oxygen consumption decreases (increasing the DO). Despite the

intrinsic noise of the feeding policy the control action is able to maintain a fairly steady value (between 1 and 3 mg/L), and the noise is not propagated to the controllers action.

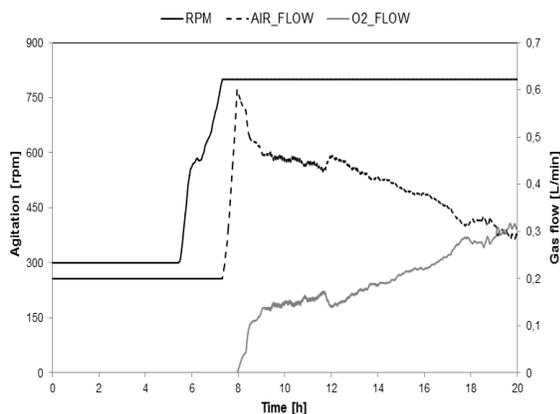


Figure 12. Evolution of the manipulated variables during the experimental validation of the control strategy

5. Conclusions

In this work, we present an effective dissolved oxygen control strategy that sequentially manipulates the agitation, aeration and oxygenation. The latter showed satisfactory results during the operation of high cell-density cultures of recombinant *E. coli*. In fact, despite the intrinsic noise of the process, the control strategy was fairly robust to allow obtaining high biomass concentrations.

The correct characterization of the volumetric coefficient of mass transfer is fundamental to properly design the split-range scheme. The influence of the agitation and aeration on the volumetric mass transfer coefficient must be previously determined in order to accurately estimate its impact on the mass transfer coefficient. The latter allows tuning the split-range control scheme to obtain a linear response on the oxygen transfer.

Overall, the present dissolved oxygen control strategy is a simple and effective way for controlling high cell-density culture growth. Due to its simplicity, this strategy can be easily adapted for different cultures with different growth conditions and feeding strategies, and implemented for scale-up purposes.

Acknowledgements

This research was funded by InnovaChile – Corfo Project SC-0082 and supported by Centrovet company.

REFERENCES

- Akesson, M, Karlsson, E. N., Hagander, P., Axelsson, J. P., & Tocaj, A. (1999). On-line detection of acetate formation in *Escherichia coli* cultures using dissolved oxygen responses to feed transients. *Biotechnology and bioengineering*, 64(5), 590–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10404239>
- Åkesson, M., Hagander, P., & Axelsson, J. P. (2001). Probing control of fed-batch cultivations: analysis and tuning. *Control Engineering Practice*, 9(7), 709–723. doi:10.1016/S0967-0661(01)00020-X
- Akesson, Mats, Hagander, P., & Axelsson, J. P. (1999). A probing feeding strategy for *Escherichia coli* cultures. *Biotechnology Techniques*, 13(8), 523–528. doi:10.1023/A:1008906517033
- Arjunwadkar, S. J., Sarvanan, K., Kulkarni, P. R., & Pandit, A. B. (1998). Gas-liquid mass transfer in dual impeller bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 1(2), 99–106. doi:10.1016/S1385-8947(97)00083-1
- Bae, C.-S., Hong, M.-S., Chang, S.-G., Kim, D.-Y., & Shin, H.-C. (1997). Optimization of fusion proinsulin production by high cell-density fermentation of recombinant *E. coli*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2(1), 27–32. doi:10.1007/BF02932459
- Bauer, K. A., Ben-Bassat, A., Dawson, M., De la Puente, V. T., & Neway, J. O. (1990a). Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutant. *Applied and environmental microbiology*, 56(5), 1296–302. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184398&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bauer, K. A., Ben-Bassat, A., Dawson, M., De la Puente, V. T., & Neway, J. O. (1990b). Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutant. *Appl. Envir. Microbiol.*, 56(5), 1296–1302. Retrieved from <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/56/5/1296>
- Booth, I. R. (1985). Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological reviews*, 49(4), 359–78. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=373043&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Castan, A., & Na, A. (2002). Oxygen enriched air supply in *Escherichia coli* processes : production of biomass and recombinant human growth hormone, 30, 847–854.
- Cutayar, J. M., & Poillon, D. (1989). High cell density culture of *E. coli* in a fed-batch system with dissolved oxygen as substrate feed indicator. *Biotechnology Letters*, 11(3), 155–160. doi:10.1007/BF01026048
- Dewasme, L., Goffaux, G., Hantson, A.-L., & Vande Wouwer, A. (2011). Extended Kalman Filter Design for Acetate Estimation in *E. Coli* Cultures. *IFAC World Congress* (Vol. 18, pp. 6218–6223). Retrieved from <http://www.ifac-papersonline.net/Detailed/49527.html>

- Dewasme, L., Srinivasan, B., Perrier, M., & Vande Wouwer, A. (2011). Extremum-seeking algorithm design for fed-batch cultures of microorganisms with overflow metabolism. *Journal of Process Control*, 21(7), 1092–1104. doi:10.1016/j.jprocont.2011.05.002
- Eiteman, M. A., & Altman, E. (2006). Overcoming acetate in Escherichia coli recombinant protein fermentations. *Trends in biotechnology*, 24(11), 530–6. doi:10.1016/j.tibtech.2006.09.001
- Enfors, S.-O. (2011). *Fermentation Process Engineering*. Stockholm: School of Biotechnology Royal Institute of Technology.
- Flickinger, M. C., & Perlman, D. (1977). Application of Oxygen-Enriched Aeration in the Conversion of Glycerol to Dihydroxyacetone by Gluconobacter melanogenus IFO 3293. *Applied and environmental microbiology*, 33(3), 706–12. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=170747&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Flickinger, M. C., & Perlman, D. (1979). Application of oxygen-enriched aeration in the production of bacitracin by Bacillus licheniformis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 15(2), 282–93.
- Frahm, B., Blank, H.-C., Cornand, P., Oelssner, W., Guth, U., Lane, P., Munack, A., et al. (2002). Determination of dissolved CO₂ concentration and CO₂ production rate of mammalian cell suspension culture based on off-gas measurement. *Journal of biotechnology*, 99(2), 133–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270601>
- Fujasová, M., Linek, V., & Moucha, T. (2007). Mass transfer correlations for multiple-impeller gas–liquid contactors. Analysis of the effect of axial dispersion in gas and liquid phases on “local” values measured by the dynamic pressure method in individual stages of the vessel. *Chemical Engineering Science*, 62(6), 1650–1669. doi:10.1016/j.ces.2006.12.003
- G L Kleman, J. J. C. (1991, April 1). Glucose-stat, a glucose-controlled continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology (ASM). Retrieved from [/pmc/articles/PMC182822/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC182822/?report=abstract)
- Garcia-Ochoa, Felix, & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnology advances*, 27(2), 153–76. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.10.006
- Garcia-Ochoa, Félix, & Gomez, E. (2004). Theoretical prediction of gas–liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chemical Engineering Science*, 59(12), 2489–2501. doi:10.1016/j.ces.2004.02.009
- Gavrilescu, M., & Chisti, Y. (2005). Biotechnology-a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology advances*, 23(7-8), 471–99. doi:10.1016/j.biotechadv.2005.03.004
- Hassan, H. M., & Fridovich, I. (1977). Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, 129(3), 1574–83.
- Ibrahim, M., & Schlegel, H. G. (1980). Oxygen supply to bacterial suspensions of high cell densities by hydrogen peroxide. *Biotechnology and bioengineering*, 22(9), 1877–94. doi:10.1002/bit.260220908

- Johnston, W., Cord-Ruwisch, R., & Cooney, M. J. (2002). Industrial control of recombinant E. coli fed-batch culture: new perspectives on traditional controlled variables. *Bioprocess and biosystems engineering*, 25(2), 111–20. doi:10.1007/s00449-002-0287-8
- Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K., & Woo, S. I. (1994). Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate control using on-line glucose analyzer. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(7), 556–561. doi:10.1016/0141-0229(94)90118-X
- Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, Y. K., & Chang, H. N. (2004). High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat. *Bioprocess and biosystems engineering*, 26(3), 147–50. doi:10.1007/s00449-003-0347-8
- Kleman, G. L., & Strohl, W. R. (1994). Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell-density fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 60(11), 3952–8. Retrieved from /pmc/articles/PMC201921/?report=abstract
- Korz, D. J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E. A., & Deckwer, W.-D. (1995). Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 39(1), 59–65. doi:10.1016/0168-1656(94)00143-Z
- Lee, S. Y. (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in biotechnology*, 14(3), 98–105. doi:10.1016/0167-7799(96)80930-9
- Luli, G. W., & Strohl, W. R. (1990). Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Envir. Microbiol.*, 56(4), 1004–1011. Retrieved from <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/56/4/1004>
- Macaloney, G., Draper, I., Preston, J., Anderson, K. B., Rollins, M. J., Thompson, B. G., Hall, J. W., et al. (1996). At-Line Control and Fault Analysis In an Industrial High Cell Density *Escherichia Coli* Fermentation, Using NIR Spectroscopy. *Food and Bioproducts Processing*, 74(4), 212–220. doi:10.1205/096030896531217
- MacLennan, D. G., & Pirt, S. J. (1966). Automatic Control of Dissolved Oxygen Concentration in Stirred Microbial Cultures. *Journal of General Microbiology*, 45(2), 289–302. doi:10.1099/00221287-45-2-289
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2008). *Brock Biology of Microorganisms (12th Edition)*. (Micheal T Madigan & J. M. Martinko, Eds.) *Cell* (Vol. 2, p. 1168). Benjamin Cummings. Retrieved from <http://www.amazon.com/Brock-Biology-Microorganisms-Michael-Madigan/dp/0132324601>
- Mateles, R. I., & Battat, E. (1974). Continuous culture used for media optimization. *Applied microbiology*, 28(6), 901–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=186853&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mendoza-Vega, O., Hebert, C., & Brown, S. W. (1994). Production of recombinant hirudin by high cell density fed-batch cultivations of a *Saccharomyces cerevisiae* strain: physiological considerations during the bioprocess design. *Journal of biotechnology*, 32(3), 249–59. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7764718>

- Moucha, T., Linek, V., & Prokopová, E. (2003). Gas hold-up , mixing time and gas–liquid volumetric mass transfer coefficient of various multiple-impeller configurations: Rushton turbine , pitched blade and techmix impeller and their combinations. *Chemical Engineering Science*, 58(9), 1839–1846. doi:10.1016/S0009-2509(02)00682-6
- Neeleman, R., Van den End, E. J., & Van Boxtel, A. J. (2000). Estimation of the respiration quotient in a bicarbonate buffered batch cell cultivation. *Journal of biotechnology*, 80(1), 85–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10862989>
- Nielsen, J., Villadsen, J., & Lidén, G. (2002). *Bioreaction Engineering Principles* (Second., pp. 47–94). Kluwe Academic/Plenum Publishers.
- Noronha, S. B., Wagner, L. W., Matheson, N. H., & Shiloach, J. (1999). Use of an ethanol sensor for feedback control of growth and expression of TBV25H in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering*, 63(3), 285–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10099607>
- Ogunnaike, B. A., & Ray, W. H. (1994). *Process Dynamics, Modeling, and Control* (Second., pp. 459–505). New York: Oxford University Press.
- Onken, U., & Liefke, E. (1989). Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. *BIOPROCESSES AND ENGINEERING*, 40. doi:10.1007/BFb0009825
- Paalme, T., Tiisma, K., Kahru, A., Vanatalu, K., & Vilu, R. (1990). Glucose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnology and bioengineering*, 35(3), 312–9. doi:10.1002/bit.260350313
- Pan, J. G., Rhee, J. S., & Lebeault, J. M. (1987). Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnology Letters*, 9(2), 89–94. doi:10.1007/BF01032744
- Park, Y. S., Kai, K., Iijima, S., & Kobayashi, T. (1992). Enhanced beta-galactosidase production by high cell-density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control. *Biotechnology and bioengineering*, 40(6), 686–96. doi:10.1002/bit.260400607
- Petersen, N., Odman, P., Padrell, A. E. C., Stocks, S., Lantz, A. E., & Gernaey, K. V. (2010). In situ near infrared spectroscopy for analyte-specific monitoring of glucose and ammonium in streptomyces coelicolor fermentations. *Biotechnology progress*, 26(1), 263–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19899067>
- Pham, H. T. B., Larsson, G., & Enfors, S.-O. (1999). Modelling of aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a pH-auxostat. *Bioprocess Engineering*, 20(6), 537–544. doi:10.1007/PL00009059
- Pinsach, J., De Mas, C., & López-Santín, J. (2006). A simple feedback control of *Escherichia coli* growth for recombinant aldolase production in fed-batch mode. *Biochemical Engineering Journal*, 29(3), 235–242. doi:10.1016/j.bej.2006.01.001
- Reiling, H. E., Laurila, H., & Fiechter, A. (1985). Mass culture of *Escherichia coli*: Medium development for low and high density cultivation of *Escherichia coli* B/r in minimal and complex media. *Journal of Biotechnology*, 2(3-4), 191–206. Retrieved from

http://www.researchgate.net/publication/222639652_Mass_culture_of_Escherichia_coli_Medium_development_for_low_and_high_density_cultivation_of_Escherichia_coli_Br_in_minimal_and_complex_media

Riesenberg, D., & Guthke, R. (1999). High-cell-density cultivation of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *51*(4), 422–430. doi:10.1007/s002530051412

Riesenberg, D., Schulz, V., Knorre, W. A., Pohl, H.-D., Korz, D., Sanders, E. A., Roß, A., et al. (1991). High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *Journal of Biotechnology*, *20*(1), 17–27. doi:10.1016/0168-1656(91)90032-Q

Rosso, L., Lobry, J., Bajard, S., & Flandrois, J. (1995). Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. *Appl. Envir. Microbiol.*, *61*(2), 610–616. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/61/2/610.short>

Saa, P. A., Moenne, M. I., Pérez-Correa, J. R., & Agosin, E. (2012). Modeling oxygen dissolution and biological uptake during pulse oxygen additions in oenological fermentations. *Bioprocess and biosystems engineering*, *35*(7), 1167–1178. doi:10.1007/s00449-012-0703-7

Schlegel, H. G. (1977). Aeration without air: oxygen supply by hydrogen peroxide. *Biotechnology and bioengineering*, *19*(3), 413–24. doi:10.1002/bit.260190311

Siegell, S. D., & Gaden, E. L. (1962). Automatic control of dissolved oxygen levels in fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, *4*(3), 345–356. doi:10.1002/bit.260040311

Sonnleitner, B., Locher, G., & Fiechter, A. (1992). Biomass determination. *Journal of Biotechnology*, *25*(1-2), 5–22. doi:10.1016/0168-1656(92)90107-K

Soto, R., Caspeta, L., Barrón, B., Gosset, G., Ramírez, O. T., & Lara, A. R. (2011). High cell-density cultivation in batch mode for plasmid DNA production by a metabolically engineered *E. coli* strain with minimized overflow metabolism. *Biochemical Engineering Journal*, *56*(3), 165–171. doi:10.1016/j.bej.2011.06.003

Sundström, H., & Enfors, S.-O. (2008). Software sensors for fermentation processes. *Bioprocess and biosystems engineering*, *31*(2), 145–52. doi:10.1007/s00449-007-0157-5

Svensson, M., Han, L., Silfversparre, G., Häggström, L., & Enfors, S.-O. (2005). Control of endotoxin release in *Escherichia coli* fed-batch cultures. *Bioprocess and biosystems engineering*, *27*(2), 91–7. doi:10.1007/s00449-004-0377-x

Taguchi, H., & Humphrey, A. E. (1966). Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *J. Ferment. Technol.*, *44*, 881–889.

Todar, K. (n.d.). Nutrition and Growth of Bacteria. Retrieved from www.textbookofbacteriology.net

Van Hoek, P., De Hulster, E., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2000). Fermentative capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast. *Biotechnology and bioengineering*, *68*(5), 517–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10797237>

- Veloso, A., Rocha, I., & Ferreira, A. (2009). Monitoring of fed-batch *E. coli* fermentations with software sensors. *Bioprocess and biosystems engineering*, 32, 381–388. doi:10.1007/s00449-008-0257-x
- Vicente, A., Castrillo, J. I., Teixeira, J. A., & Ugalde, U. (1998). On-line estimation of biomass through pH control analysis in aerobic yeast fermentation systems. *Biotechnology and bioengineering*, 58(4), 445–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10099279>
- Villadsen, J., Nielsen, J., & Lidén, G. (2011). *Bioreaction engineering principles*. New York: Springer Verlag.
- Villadsen, John, & Patil, K. R. (2007). Optimal fed-batch cultivation when mass transfer becomes limiting. *Biotechnology and bioengineering*, 98(3), 706–10. doi:10.1002/bit.21451
- Wang, F., & Lee, S. Y. (1998). High cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli* for the production of poly(3-hydroxybutyrate) in a defined medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(2-3), 325–328. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19980420)58:2/3<325::AID-BIT33>3.0.CO;2-8
- Wolfe, A. J. (2005). The acetate switch. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 69(1), 12–50. doi:10.1128/MMBR.69.1.12-50.2005
- Xiong, Z.-Q., Guo, M.-J., Guo, Y.-X., Chu, J., Zhuang, Y.-P., Wang, N. S., & Zhang, S.-L. (2010). RQ feedback control for simultaneous improvement of GSH yield and GSH content in *Saccharomyces cerevisiae* T65. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7), 598–602. doi:10.1016/j.enzmictec.2010.03.003
- Xu, B., Jahic, M., & Enfors, S. O. (n.d.). Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology progress*, 15(1), 81–90. doi:10.1021/bp9801087
- Yang, J. D., & Wang, N. S. (1992). Oxygen mass transfer enhancement via fermentor headspace pressurization. *Biotechnology progress*, 8(3), 244–51. doi:10.1021/bp00015a010
- Yee, L., & Blanch, H. W. (1993a). Defined media optimization for growth of recombinant *Escherichia coli* X90. *Biotechnology and Bioengineering*, 41(2), 221–230. doi:10.1002/bit.260410208
- Yee, L., & Blanch, H. W. (1993b). Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, 41(8), 781–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18609622>
- Yong Tao, Qiong Cheng, & Alexander D. Kopatsis. (2012). *Microbial Metabolic Engineering*. (Q. Cheng, Ed.) (Vol. 834, pp. 283–304). New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-1-61779-483-4

ANEXO B: ARMADO, AUTOMATIZACIÓN Y CONTROL DE BIOREACTORES UC.

1. DESCRIPCIÓN

1.1. Principio

Breve introducción sobre el principio de funcionamiento del bioreactor para cultivos microbiológicos en reactores de 1 L. El software y hardware permiten generar cultivos de alta densidad celular, con control de oxígeno disuelto, pH y temperatura. Registro y visualización de corrientes gaseosas de salida (oxígeno y dióxido de carbono).

1.2. Especificaciones técnicas

Las especificaciones técnicas se especifican en el manual de cada uno de las partes que constituyen el sistema de cultivo.

2. APLICACIONES Y LIMITACIONES

El presente equipo aplica a cultivos microbiológicos de volumen útil 800 mL. La estrategia de control de oxígeno con enriquecimiento de oxígeno puro permite generar cultivos de alta densidad celular. Funciones de alimentación prealimentadas pueden ser programadas al sistema para alargar el crecimiento celular. El sistema permite controlar la temperatura, pH, y oxígeno disuelto en 5 reactores en paralelo. A su vez se registran y visualizan las variables medidas: oxígeno disuelto, pH, temperatura, acciones de control y composición de corriente gaseosa de salida. El sistema permite visualizar las variables medidas de manera remota e incluso manipular la acción de control de una bomba peristáltica para iniciar la fase alimentada.

3. SEGURIDAD

En general, el trabajo con este equipo no requiere medidas de seguridad mayores a las habituales. Los reactivos utilizados son generalmente inocuos, con excepción de las soluciones de ácido y base. Para trabajar con ellas, es imprescindible utilizar guantes y delantal. Si se trabaja con hidróxido de amonio como control básico, utilizar también protección a los ojos al momento de filtrarlo. Esto último, realizarlo en un ambiente altamente ventilado. Las mismas medidas aplican al manipular los estándares de pH y la solución de electrolito de las sondas de oxígeno disuelto. Respecto al biorreactor, se debe proceder con sumo cuidado al momento de lavar y armar, evitando golpes que pudieran

dañarlo. Una vez autoclavado, tener precaución de abrirlo exclusivamente bajo campana para evitar contaminaciones.

4. REACTIVOS, ESTÁNDARES Y CONTROLES

Los reactivos para el armado de los medios pueden encontrarse en el protocolo de elaboración de medios. Los otros reactivos/soluciones necesarios son: Ácido fosfórico 20% (control ácido), hidróxido de amonio 20% (control básico), antiespumante de silicona, etanol 70% e isopropanol 70% (desinfectantes). Para calibrar la sonda de pH, se necesitan dos estándares (pH 4 y pH 7). Para el óptimo funcionamiento de la sonda de oxígeno disuelto Endress-Hauser, tener siempre a mano la solución de electrolito que viene junto con ella.

5. CALIBRACIÓN Y MANTENIMIENTO

5.1. Calibración

Siempre realizar calibración de sonda de pH previo a su utilización, de acuerdo a lo que se indica en el protocolo de calibración respectivo.

Realizar calibración de sonda de oxígeno disuelto tal como se indica en el protocolo de calibración. Cambiar solución de electrolito aproximadamente cada dos semanas.

El método de calibración del sensor BlueSens está especificado en su superficie. Calibrar una vez al mes, previo a utilizarse.

5.2. Mantenimiento

Chequear mensualmente que el filtro de aire no esté tapado, en tal caso, cambiarlo por uno nuevo.

Asegurarse que la frita de aire a utilizar no esté suelta y que esté adecuadamente sonicada antes de usar.

Cambiar solución electrolito a las sondas de oxígeno disuelto tal como se indicó en la sección “Calibración” y revisar que la membrana se encuentre en buen estado.

Realizar un control semanal de las válvulas de agua de cada unidad, de modo de evitar que se obstruyan (lo que implicaría dificultades para realizar el control de temperatura).

En caso de problemas con el PLC, recurrir a Samuel Torres (segundo piso).

6. PROCEDIMIENTO

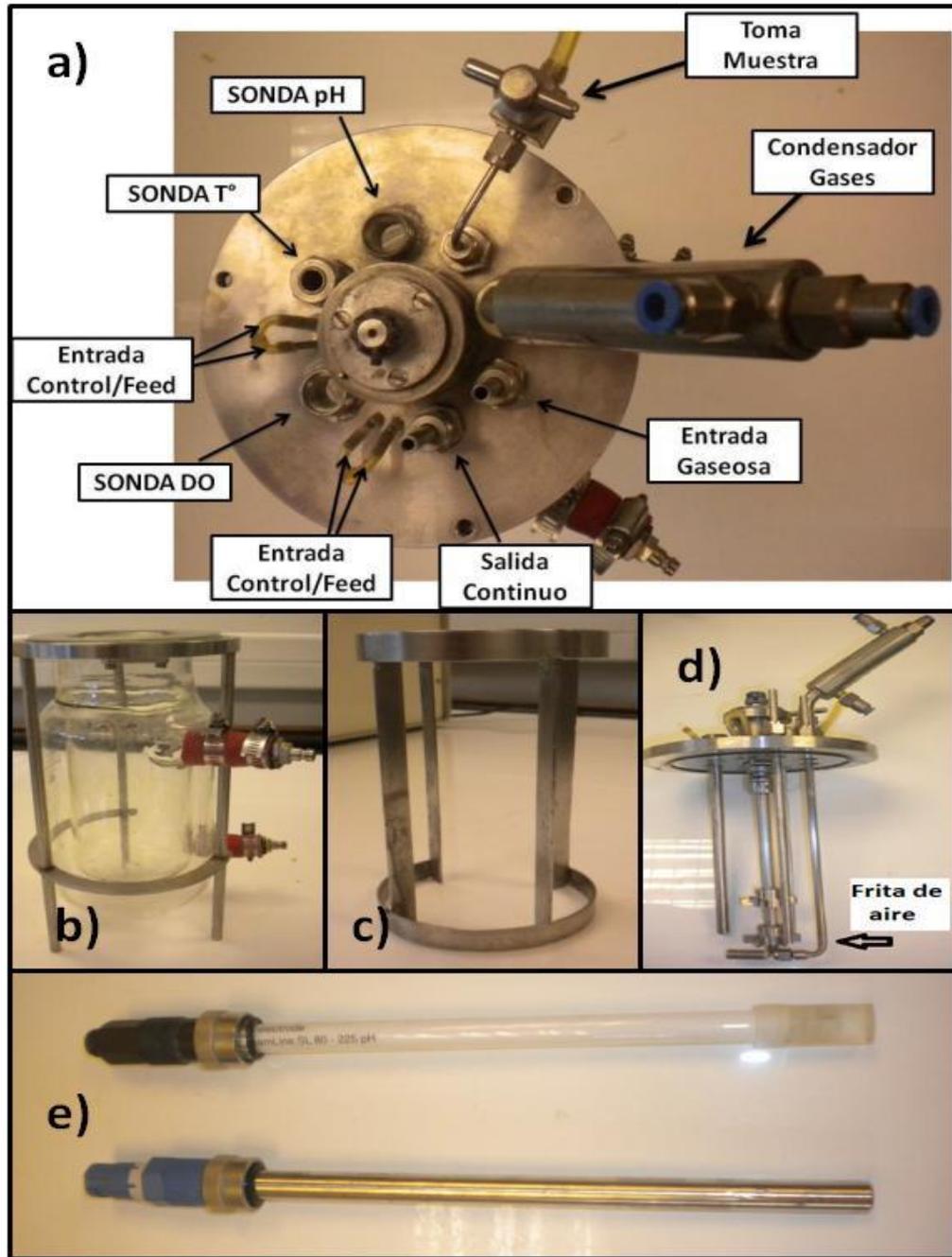


Figura 1. Esquema y partes del bioreactor **A)** Vista superior tapa bioreactor y conexiones. **B)** Vista lateral del bioreactor. **C)** Baffles. **D)** Vista lateral de tapa bioreactor. **E)** Sondas de pH (superior) y de oxígeno disuelto (inferior).

PARTE I: PREPARACIÓN REACTOR.

▪ **Lavado:**

- Lavar el interior del reactor y su tapa con detergente (Quix). Especial cuidado en el lavado de las aspas, entradas de sondas, baffles e interior del toma muestra. Enjuagar bien con agua destilada y etanol 70%. Dejar secar.
- Retirar frita de aire y llevarla a sonicar (15 minutos, 45°C) en una mezcla etanol/agua destilada.
- Limpiar sondas de oxígeno disuelto y pH con cloro y agua. Enjuagar con etanol.

▪ **Armado:**

- Colocar el baffle al interior del reactor.
- Colocar la frita de aire. Poner la tapa y cerrar.
- Las sondas marca Endress Hauser (pH y oxígeno disuelto) pueden autoclavarse junto con el reactor. En este caso, colocar las sondas en sus respectivas entradas y añadir un volumen suficiente de agua destilada dentro del reactor tal que los extremos de ambas queden sumergidos (para las sondas marca Schott y Mettler Toledo, éstas deben dejarse sumergidas en etanol 70% durante 15 minutos y conectarse bajo campana al reactor ya autoclavado. En este caso, las entradas de las sondas deben cubrirse con alusa foil antes de autoclavar).
- Sellar y cubrir con alusa foil la entrada del toma muestra, el filtro de aire, la salida del condensador y la parte superior de ambas sondas. Sellar también las 4 entradas pequeñas de la tapa.
- Autoclavar (20 minutos, 121°C). Dejar enfriar.



Figura 2. Reactor armado y autoclavado.

- Llevar reactor a campana, y comenzar con el armado del medio correspondiente. Será necesario sacar una de las sondas (en el caso de que se hubieran autoclavado junto con el reactor) para agregar el medio al interior.
- Conectar los schotts de ácido, base y antiespumante (previamente esterilizados) al reactor, a través de las 4 entradas pequeñas presentes en la tapa (Fig. 2a y 2b).

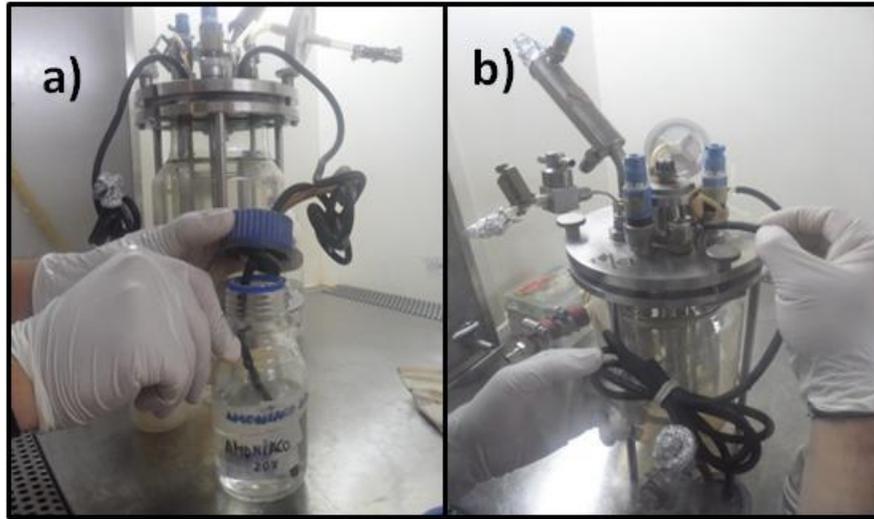


Figura 2. A) Conexión schott base. B) Conexión Schotts al reactor.

- Al terminar, y antes de salir de campana, asegurarse que el reactor haya quedado herméticamente cerrado.

PARTE II: INICIO PROGRAMA REGISTRO ONLINE DE DATOS.

NOTA: El programa para registrar online los datos se encuentra generalmente abierto; en caso contrario, para abrirlo, seguir los siguientes pasos.

- En el computador (PLC), seguir la ruta: Start/WinCC/WinCC V6.0. A continuación, seguir ruta Start/SIMATIC/SIMATIC Manager. Se abrirá la ventana PCS 7 Wizard: New Project. Poner Cancelar.
- En la siguiente interfaz, se tiene a la izquierda los Blocks y Charts (Fig 3a). Click en Charts y luego abrir el “CFC” correspondiente (Fig. 3a. CFC1 corresponde a la unidad A, CFC2 a la B, etc). Luego, click en Blocks y abrir la unidad con la que se va a trabajar (Fig. 3b. Unidad A, Unidad B, etc.).

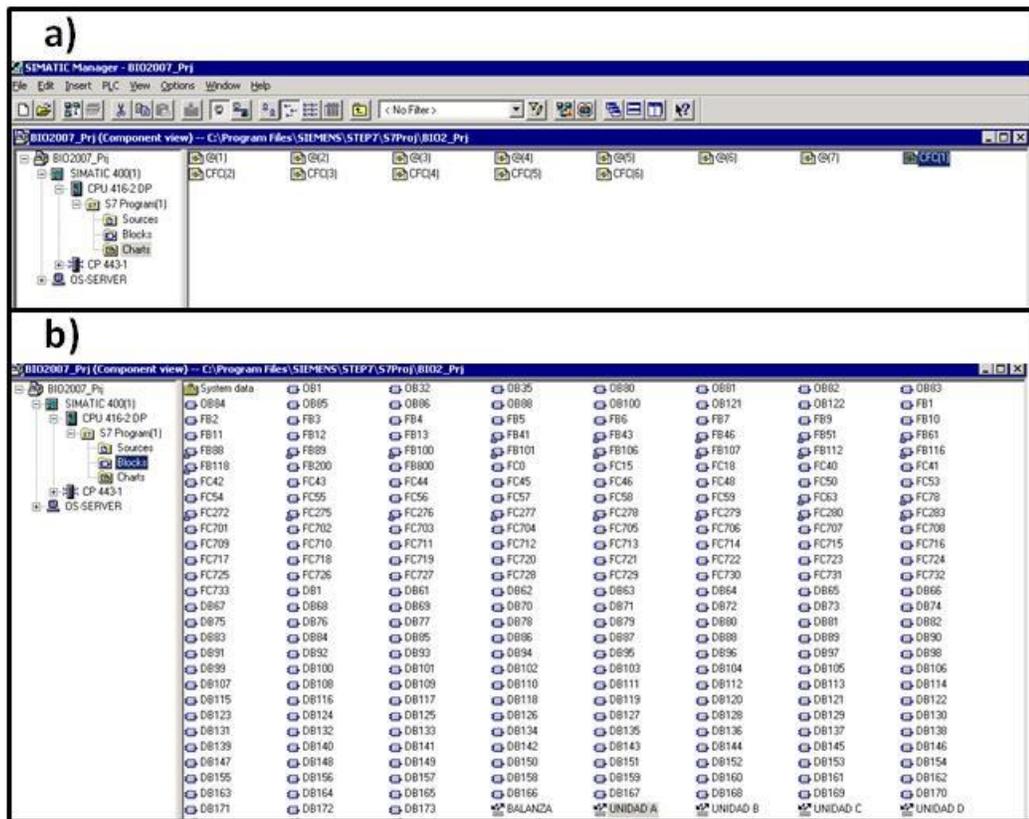


Figura 3. A) Interfaz programa SIMATIC Manager para apertura de cuadros de control de variables de cada unidad. **B)** Interfaz programa SIMATIC Manager para abrir bloques de control de cada unidad.

NOTA: Si al abrir SIMATIC Manager no se despliegan automáticamente los cuadros de Blocks y Charts (Fig. 3a y 3b), seguir ruta **File/Open/BIO2007_Prj**.

- Apretar el botón de Windows, y seleccionar WinCC-Runtime. Se abrirá la interfaz principal, que permite controlar todas las variables de trabajo (Fig 4):

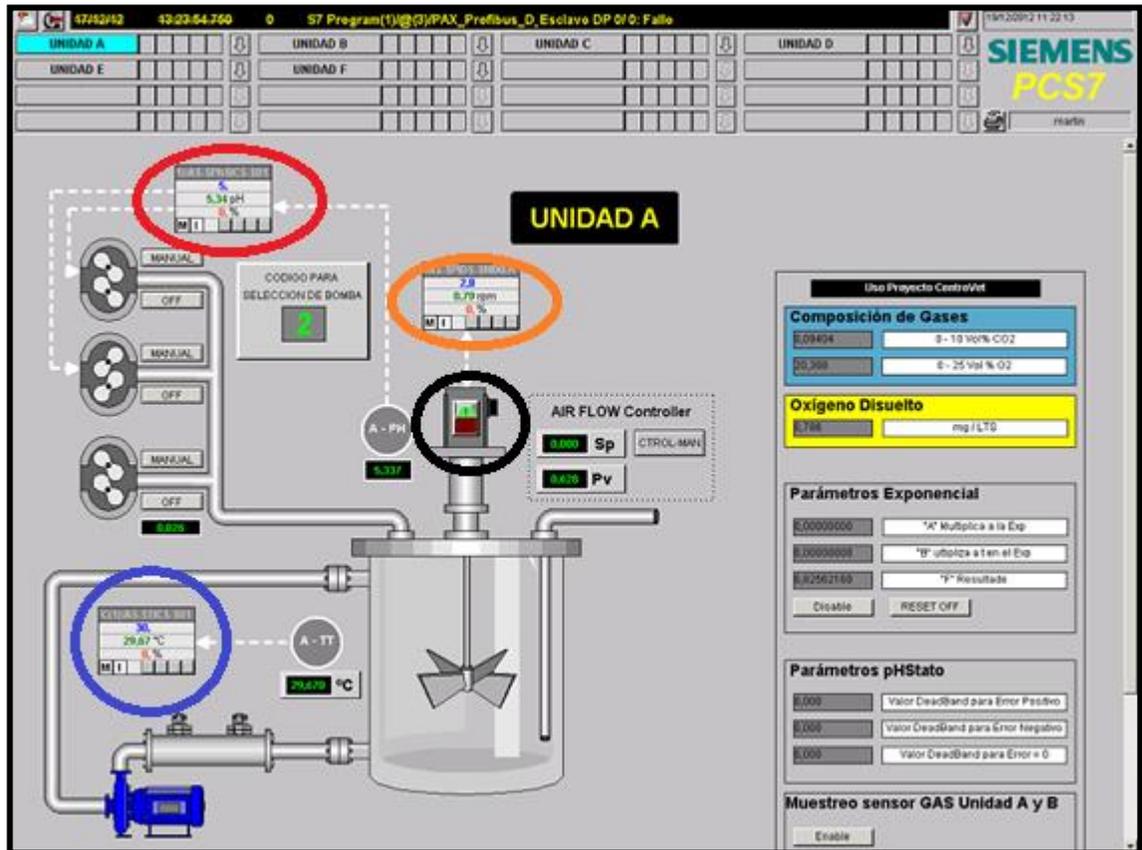


Figura 4. Interfaz principal de control. Círculo rojo: control de pH; círculo azul, control de temperatura; círculo naranja, control de oxígeno disuelto; círculo negro, control (interruptor) de agitación. En la parte superior, es posible acceder a las distintas unidades del sistema.

PARTE III: AUTOMATIZACIÓN Y CONTROL DE VARIABLES

- **Encendido de la unidad:** Girar al interruptor general de la unidad hacia la derecha. Se encenderán también los flujómetros presentes sobre cada unidad (Fig. 5).



Figura 5. Encendido unidad.

- **Control de temperatura:** Conectar las dos mangueras que tienen entrada rápida en la camisa presente en el reactor. La manguera “**Camisa ←**” (flujo de agua desde la unidad a la camisa) se conecta a la entrada inferior del reactor, mientras que la manguera “**Camisa →**” (flujo desde camisa a la unidad) se conecta a la entrada superior (Fig. 6a y 6b):

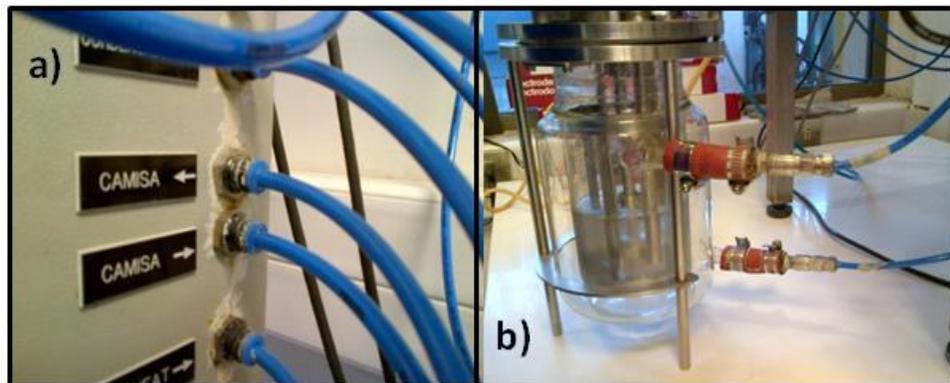


Figura 6. A) Mangueras desde y hacia la camisa. B) Conexión mangueras a la camisa.

La manguera “**Condensador ←**” (hacia el condensador) se conecta en la entrada superior del condensador, mientras que la manguera “**Condensador →**” (desde el condensador a la unidad) va en la parte inferior del mismo (Fig. 7a y 7b).

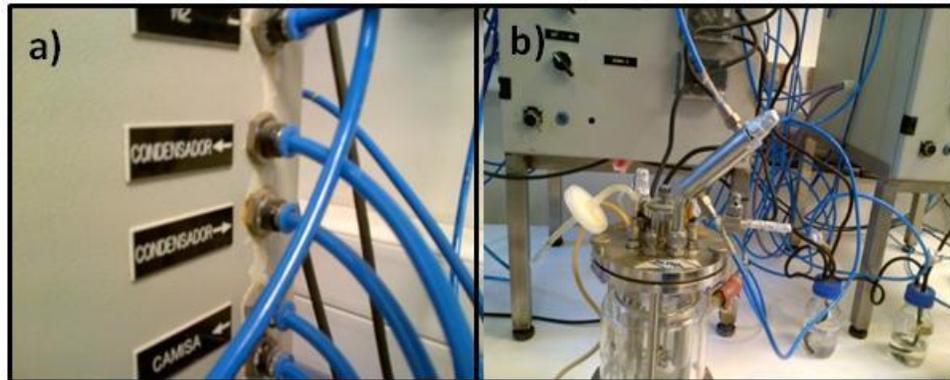


Figura 7. A) Mangueras desde y hacia el condensador. **B)** Conexión mangueras al condensador.

- En el PLC (Fig. 8), hacer click sobre el control de temperatura (círculo negro). Se abrirá una ventana (círculo rojo) en donde se muestra el set-point fijado de temperatura (SP), el valor actual de medición (PV) y el porcentaje de acción de la válvula de control (MAN).

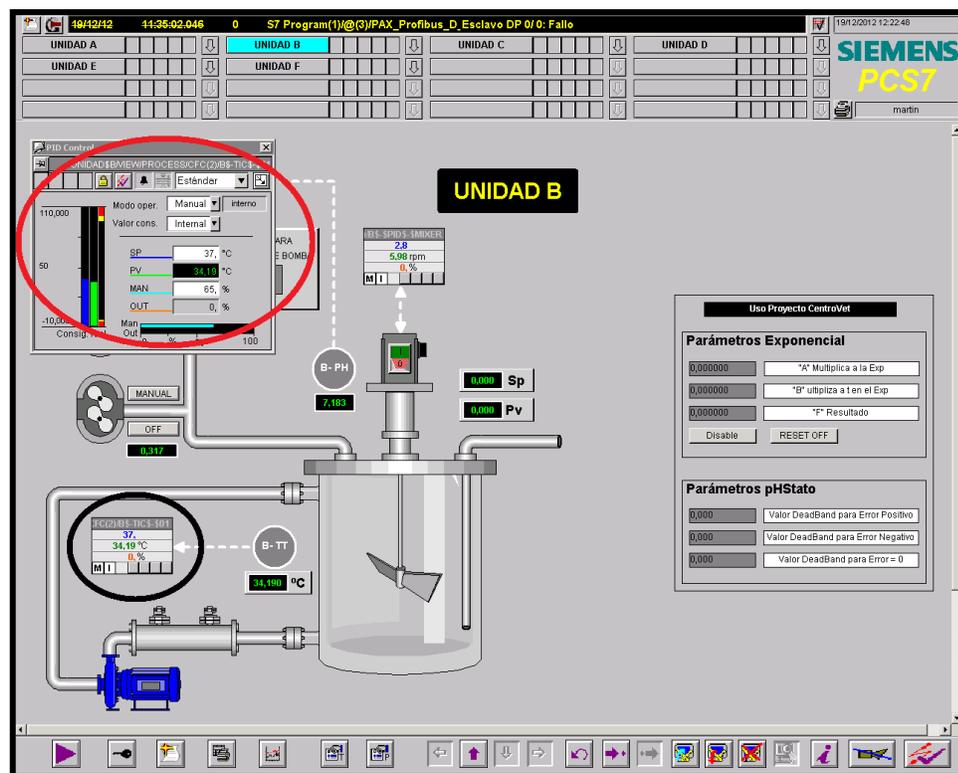


Figura 8. Interfaz principal de control. Se destacan en círculos los apartados para el control de temperatura.

- Una vez fijado el SP, poner MAN = 0, “Ejecutar” y proceder a abrir al máximo las llaves de agua que van a la unidad respectiva (Fig. 9, mangueras “H₂O HEAT” y “H₂O COOL”). La camisa comenzará a llenarse de agua. Una vez llena, aumentar “MAN” a 45, y comenzar a regular la temperatura.

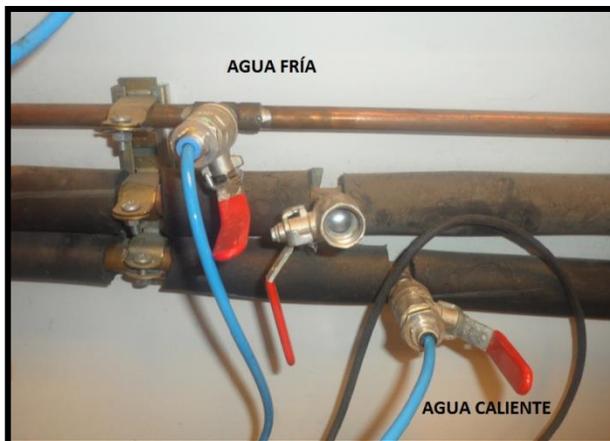


Figura 9. Mangueras de agua para el control térmico del cultivo.

- **Conexión sondas pH y temperatura. Agitación y aireación:** Conectar los cables respectivos de cada sonda (Fig. 10a, cada cable está debidamente rotulado). Con cuidado, colocar el rotor de la agitación en la posición adecuada (Fig. 10b) y enchufarlo en su entrada (presente en el extremo inferior izquierdo de la Unidad). Finalmente, conectar la manguera “O₂/N₂” desde la unidad al filtro de aire presente en la tapa del reactor (Fig. 10c). Encender válvulas de aire y oxígeno ubicadas en la pared tras cada unidad (Fig. 10d). En el PLC, encender la agitación haciendo click sobre el interruptor de agitación (Fig. 4, círculo negro). Si no comenzara a agitar, click sobre el interruptor, apagar la unidad unos segundos, volver a encender y click sobre interruptor de agitación.

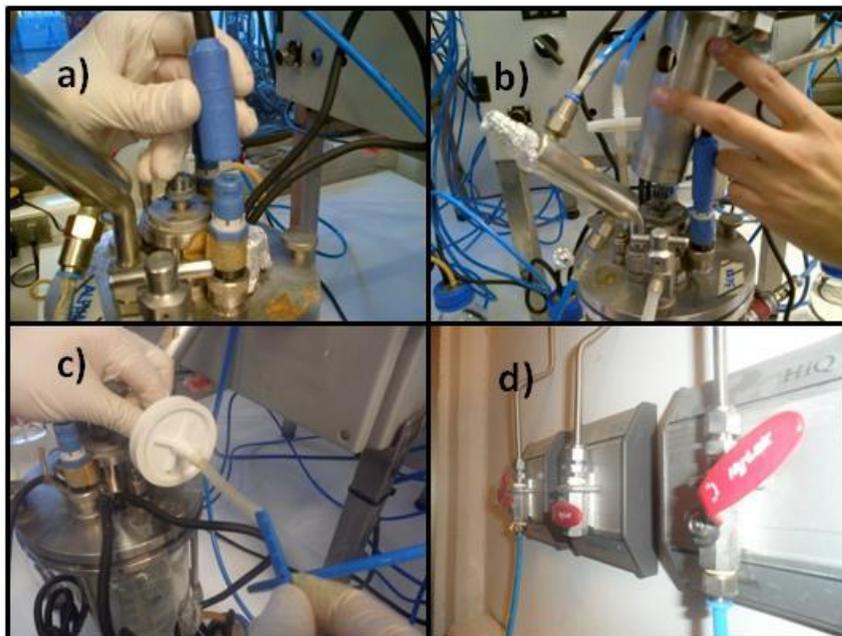


Figura 10. A) Conexión sondas. B) Conexión rotor agitación. C) Conexión manguera gases. D) Válvulas de gases.

- Conexión bombas peristálticas y cebado de mangueras:** Conectar la manguera de **ácido** en la **bomba 1** y la manguera de **base** en la **bomba 2** (Fig. 11a y 11b). Si se requiere conectar un schott de **alimentación**, usar la **bomba 3**. En caso contrario, usar esta bomba para la manguera de **antiespumante** (en el caso en que no queden bombas disponibles para éste último, utilizar una bomba externa a la unidad [Fig. 11c]). Una vez conectadas las mangueras, realizar cebado manual de las mismas (abrir las hasta que empiece a caer dentro del reactor).



Figura 11. A) Conexión ácido. B) Conexión base. C) Bomba peristáltica externa.

- Regulación y control de pH:** En la interfaz principal de control, click sobre el control de pH (Fig. 4, círculo rojo). Se desplegará una ventana con los mismos parámetros que para el control de temperatura (set-point, valor actual de medición y porcentaje acción bomba) (Fig. 12). Fijar SP deseado y manualmente mover la

bomba correspondiente (ácido y/o base) para alcanzar ese valor. Notar que al lado de las bombas aparece un número verde; este indica qué tipo de control realizará el sistema (1: sólo control ácido; 2: sólo control básico; 3: control ácido y básico). Si, por ejemplo, se requiere sólo control básico, una vez alcanzado el pH en forma manual, poner MAN = 0, y fijar “Modo oper” en modo automático. Finalmente, click sobre la bomba respectiva (en este caso particular, la segunda) para pasarla desde Manual a Automático. (Nota: esto es similar para el caso en que se requiera sólo control ácido, aunque en este caso, el número verde debe cambiarse a 1, y la bomba que se pasa a automático es la primera. Por otra parte, si es necesario control ácido y básico, cambiar el número a 3, fijar MAN = 50 y pasar bomba 1 y 2 a automático).

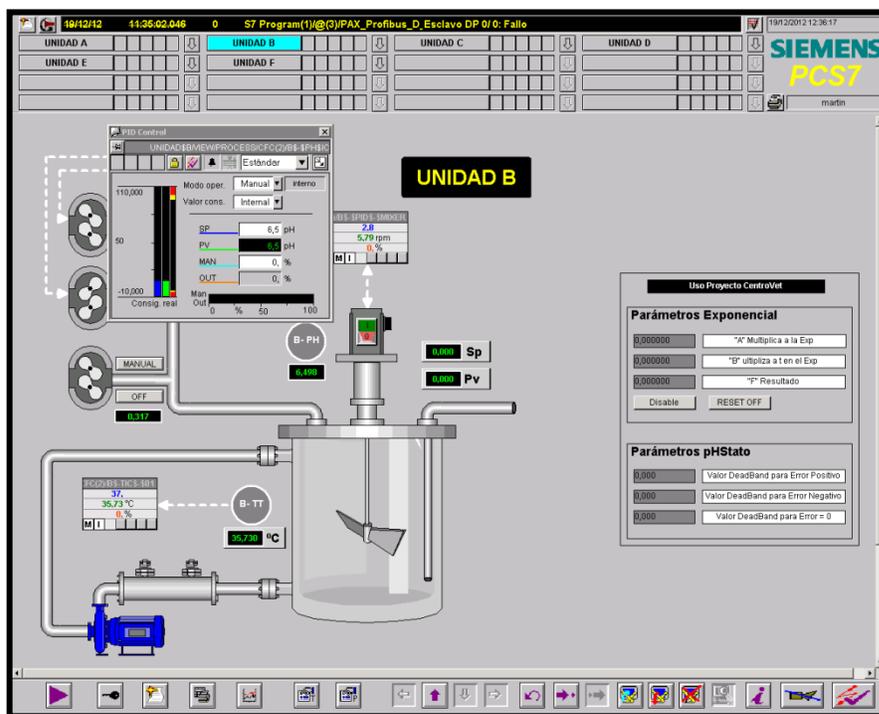


Figura 12. Interfaz principal de control. Se muestra desplegada la ventana de control de pH.

- **Control oxígeno disuelto:** Una vez calibrada la sonda de oxígeno (consultar manual de la misma), click sobre el control de DO (Fig. 4, círculo naranja). Fijar el set-point, y pasar “Modo oper” a automático.
- **Salida gases:** A partir de la salida del condensador, conectar una manguera – previamente rociada abundantemente con etanol 70% - hasta el sensor de gases que se esté utilizando (**BlueSens** y/o sensor de la **Unidad F**). Entre la manguera y el sensor se recomienda colocar un filtro de aire, para proteger el sensor. Asegurarse que no haya fuga de gas desde el reactor (en tal caso, sellar con parafilm). Para verificar esto, colocar la salida del filtro mencionado en una solución

de agua o etanol y chequear que burbujee. Si esto ocurre, significa que no hay fuga de gas y/o que el filtro no está tapado.

Al cabo de estos pasos, todas las variables debieran estar con control automático, observándose tal como la Figura 13.

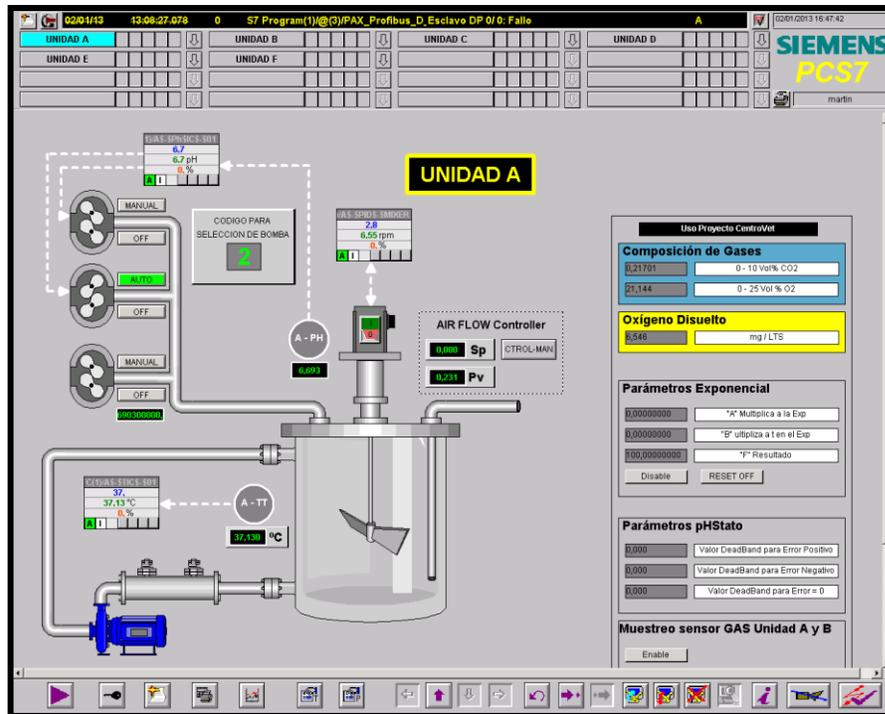


Figura 13. Interfaz final con todas las variables en control automático.

PARTE IV: REGISTRO ONLINE DE DATOS

- Seguir la ruta **Inicio/Programas/Microsoft Visual Studio 6.0/Microsoft Visual Basic 6.0**. Se abrirá la ventana New Project. Click en Cancelar.
- A continuación, abrir **File/Muestreo Sensor**, y hacer click en ícono **“Play”**. Se abrirá la siguiente ventana (Fig. 14).

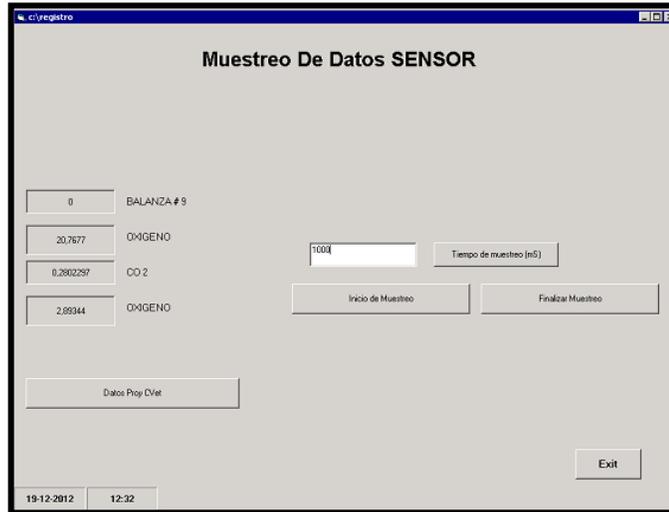


Figura 14. Ventana para comenzar el registro online de datos mediante sensor caja F.

- Fijar el intervalo de tiempo en que se registrará los datos (1000 mS en el ejemplo), y click en **Inicio Muestreo**. Comenzarán a registrarse los datos de la unidad que esté conectada al sensor de la caja F (unidad C, por ejemplo).
- Para comenzar el registro de datos de las unidades conectadas al sensor BlueSens (Unidad A y/o B), hacer click en **Datos Proy CVet** que se observa en la Fig. 14. Se desplegará la siguiente ventana (Fig. 15):

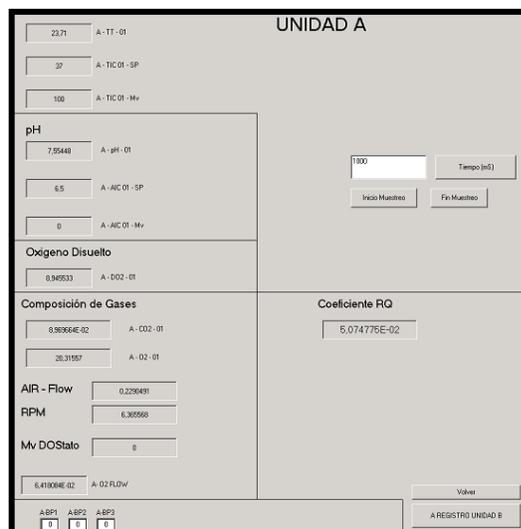


Figura 15. Ventana para comenzar el registro online de datos mediante sensor BlueSens.

- Click sobre **Inicio muestreo** para la unidad A. Si también se requiere registrar los datos de la unidad B, click sobre “A Registro Unidad B”, en la parte inferior. Allí, click sobre Inicio muestreo.
- Los datos se registrarán en la siguiente ruta: **Programas/Accesorios/Windows Explorer/My Computer/System (C:)/Registro**, con el nombre “Sensor”, para los datos de la unidad conectada al sensor de la caja F, y en **Programas/Accesorios/Windows Explorer/My Computer/System (C:)/Registro/Centrovvet**, con el nombre DATA_CV y DATA_CV_B, para los datos de la(s) unidad(es) conectada(s) al sensor BlueSens.

PARTE V: INOCULACIÓN

- Una vez listas las variables de trabajo, se procede a inocular el medio con el microorganismo correspondiente. Bajo campana, tomar el volumen de preinóculo correspondiente (con jeringa estéril). Ya en el reactor, rociar con etanol 70% la manguera del toma muestra, conectar jeringa, abrir válvula de toma muestra e inyectar todo el volumen. Antes de quitar la jeringa, cerrar válvula y llave del toma muestra y rociar etanol 70%.

PARTE VI: DETENCIÓN REGISTRO, DESARMADO REACTOR Y EXTRACCIÓN DATOS

- Para detener registro luego de terminar el cultivo, click sobre “Finalizar muestreo” (Fig. 14 y 15) para la(s) unidad(es) con las que se esté trabajando. Los datos quedarán registrados en las rutas mencionadas previamente.
- Para desmontar el reactor, pasar todas las variables (T° , pH, oxígeno disuelto) a modo MANUAL. Tomando como ejemplo el control de T° (Fig. 8), pasar “Modo oper” desde AUTO a MANUAL. Lo mismo para el control de pH y oxígeno disuelto. Llevar todos los valores de MAN A 0% (Fig. 8, círculo rojo. Lo mismo para control de pH y oxígeno disuelto). También pasar a MANUAL las bombas que estén siendo utilizadas (ejemplo, Fig. 13, bomba de control básico). Apagar interruptor de agitación (Fig. 4, círculo negro). Cortar las válvulas de agua y las de gases (Fig. 9 y 10d).
- Desmontar los schotts de ácido, base, antiespumante y alimentación (si procede) de las bombas peristálticas y desconectarlas del reactor.
- Desmontar cuidadosamente el rotor de agitación, los cables y las sondas de pH y temperatura; desconectar la manguera de gases (Fig. 10c), las mangueras del condensador (Fig. 7b) y las de la camisa térmica (Fig. 6b). Apagar el interruptor general de la Unidad.
- Abrir el reactor y añadir cuidadosamente un pequeño volumen de cloro, agitar y descartar el contenido por el desagüe.

- Para extraer los datos registrados, en otro computador abrir navegador Mozilla Firefox y seguir la ruta **Herramientas/Desarrollador web/FireFTP** (Fig. 16)

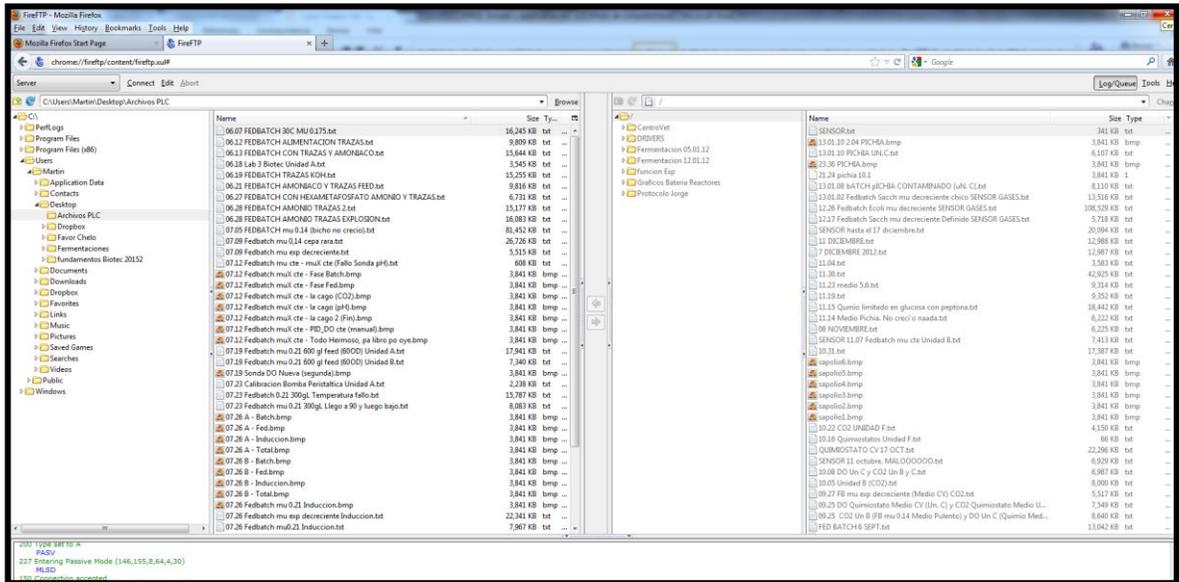


Figura 16. Extracción de datos registrados online en el PLC.

- A la izquierda de la pantalla está el equipo hacia el cual trasladaremos los datos, mientras que en la derecha se muestra donde están alojados los datos (PLC).
- Click en **Connect**, (user: martin, password: bio88a), seleccionar los archivos que se van a extraer (desde la derecha de la pantalla) y click sobre la flecha verde del centro para comenzar el traspaso de datos.
- Una vez terminado, click en **Disconnect**. Los archivos se habrán traspasado al destino que uno escogió en el otro computador.

7. TROUBLESHOOTING

En caso de fallar el control de temperatura, cortar agua y revisar el estado de las válvulas antirretorno de la respectiva unidad. Chequear que éstas dejen pasar agua sólo en un sentido, en caso contrario, será necesario cambiarla. En caso de haber fuga de gases desde el reactor, se debe cambiar y/o mejorar el sellado de la unión tapa/reactor utilizando parafilm.

Si el rotor deja de agitar, retirarlo cuidadosamente y ajustar la goma negra que va en su interior; en ocasiones puede ocurrir también que el engranaje del eje sobre el que se inserta la goma se suelte, en tal caso apretar con una llave Allen.

Si el flujo de gas(es) hacia el interior del reactor se corta, chequear la apertura de las válvulas (Fig. 10d) y del compresor de gases, ubicado en la parte posterior del Dpto.

Si fallara algún componente del PLC, seguir la recomendación sugerida en la sección "Mantenimiento".

8. DOCUMENTOS RELACIONADOS

Protocolo elaboración medios.

Protocolo calibración sondas oxígeno disuelto.

Protocolo calibración sondas de pH.

9. APÉNDICES

Manual de sonda oxígeno disuelto Endress-Hauser.

Manual calibración sonda pH SCHOTT.