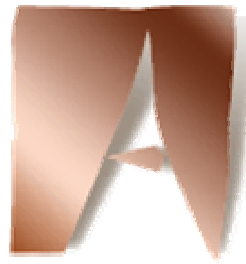


**Disseny i
desenvolupament de
minibioreactors amb
instrumentació per a
l'optimització de cultius
cel·lulars**

**Albert Soley Astals
Memòria per a optar al grau de doctor**



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA

DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA

**Disseny i desenvolupament de
minibioreactors amb instrumentació
per a l'optimització de cultius
cel·lulars**

ALBERT SOLEY ASTALS
Memòria per a optar al grau de doctor per la UAB,
Programa de Doctorat de Biotecnologia

Bellaterra, novembre de 2010

FRANCESC GÒDIA CASABLANCAS, Catedràtic del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, i JORDI JOAN CAIRÓ BADILLO, Professor Titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFIQUEM:

Que el llicenciat Albert Soley Astals ha dut a terme sota la nostra direcció, en els laboratoris del Departament d'Enginyeria Química, el treball que, amb el títol de: **Disseny i desenvolupament de minibioreactors amb instrumentació per a l'optimització de cultius cel·lulars**, es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al grau de Doctor en Biotecnologia.

I perquè en prengueu coneixement i tingui els efectes que correspongui, presentem davant l'Escola de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi signant aquesta certificació a

Bellaterra, novembre de 2010

Francesc Gòdia Casablanca

Jordi Joan Cairó Badillo

Resum

The research and development in the biotechnological field generates a vast amount of new cells and products of interest for various economical sectors. In this framework, it is needed to explore, in reasonable times and with automated means, the potential of the generated, regarding its growth, productivity and quality of the obtained products.

Establishing the culture conditions of a productive process based in cells required accomplishing several stages: from the selection of the cellular system and the realization of molecular biology works to the achievement of a bioprocess having optimized conditions.

In this work the design and development of a multiple minibioreactor system is presented, having the aim of fastening the first stages of the bioprocess development, in a systematic way, and acquiring relevant information regarding the evolution of the main culture variables, making possible the realization of various sorts of experiments such as clone selections, the characterization of its culture performance, the culture medium optimization, and the toxicological evaluation of molecules.

The design of the multiple minibioreactor system combines the benefits of the usual small scale culture systems, such as the consumption of small amounts of medium and the capability of performing multiple parallel cultures, and the benefits of larger scale culture systems, such as the homogeneity and the knowledge of the main culture variables, ensuring these do not have limiting values.

Consequently, special attention has been paid to the development of a stirring system ensuring the homogeneity of the bioreactor content and to the monitoring systems allowing the characterization of the cell growth and metabolism, which permits having sufficient data to upscale the process, minimizing the risks of such duty.

Before starting the technological development stage, a preliminary study has been done with the aim of identifying and characterizing the required equipment features, regarding the auxiliary equipment supplying the culture conditions (stirring, aeration), and also regarding the potentiality and limitations of the monitoring systems. The main culture environmental variables to be monitored are pH and dissolved oxygen, whereas to monitor growth cellular concentration is to be followed. Additionally, oxygen consumption is to be used as a metabolic indicator, and pH is also a variable from which it can be obtained interesting information regarding culture physiology and metabolism.

Given the different design possibilities for the required technologies depending on the cellular models to be used, one of them, precisely mammalian cells have been chosen. Thus, the detailed design and development of the minibioreactor system has been directed towards applications with such cellular model, paying special attention to the characteristic requirements of mammalian cells (basically agitation and aeration), and to the hydrodynamic characteristics of the system. On the other hand, also in the technological development chapter, techniques to monitor cell concentration, pH, dissolved oxygen and oxygen consumption have been implemented.

Once the technological development has been completed and the required functionalities validated, in the last part of this work various cultures are performed with the aim of evaluating the culture reproducibility, and the information obtained by the equipment as it is used for culturing a certain cell line at various conditions.

Finally, it is also interesting to underline the potential fields of development based on this work: new features of the multiple minibioreactor system, such as the pH and dissolved oxygen controls, and the potential use of the system for the culture of bacteria and yeast.

Resum

L'activitat de recerca i desenvolupament en el camp de la biotecnologia genera de forma altament dinàmica noves cèl·lules i productes d'interès en múltiples sectors. En aquest context, cal explorar en temps raonables i amb mitjans altament tecnificats i estandarditzats, el potencial productor de les diferents cèl·lules modificades, en quant al seu creixement, la capacitat producció i la qualitat dels productes obtinguts. Establir les condicions d'un procés productiu basat en cèl·lules requereix completar un nombre d'etapes molt elevat: des de la selecció del model cel·lular i la realització de treballs de biologia molecular fins a assolir un procés productiu amb unes condicions optimitzades.

En aquest treball es presenta el disseny i desenvolupament d'un sistema de múltiples minibioreactors orientats a escometre les primeres fases del desenvolupament del bioprocés de forma ràpida, sistemàtica i amb informació rellevant sobre l'evolució de les principals variables de cultiu, de manera que sigui possible realitzar, entre altres experiments, la selecció de clons, caracterització del seu comportament en cultiu, optimització de medis de cultiu, i proves de toxicitat de molècules sobre els perfils dels cultius.

El disseny del sistema de múltiples minibioreactors presentat reuneix els avantatges dels sistemes habituals de cultiu a petita escala, com són el treball amb volums reduïts i la capacitat de realitzar diversos cultius en paral·lel, així com els avantatges del treball amb reactors de major volum, com són l'homogeneïtat i el coneixement que les principals variables del cultiu estan en valors no limitants per a aquest. Així doncs, s'ha donat una elevada importància a que els minibioreactors disposin d'un sistema d'agitació que permeti assegurar l'homogeneïtat del seu contingut, i a disposar de sistemes de seguiment. Aquests permeten d'una banda conèixer els valors de les variables dels cultius, i d'altra banda la caracterització del comportament de les cèl·lules estudiades, obtenint dades útils per al disseny dels bioprocessos corresponents que puguin ser transferides amb èxit els processos cap a majors escales, i permetent prosseguir el camí cap a l'escala de producció sense que apareguin incidències, bàsicament pèrdues de productivitat, degudes a la manca de coneixement existent habitualment en les cultius a petita escala.

Prèviament a iniciar l'etapa de desenvolupament tecnològic, s'ha realitzat un estudi preliminar per tal de tenir un major coneixement de les prestacions necessàries dels equips, tant pel que fa a la funcionalitat dels sistemes que proporcionen les condicions necessàries per al creixement dels cultius (agitació i aeració), com pel que fa a la

potencialitat i limitacions dels sistemes de seguiment seleccionats. D'entrada, l'objectiu ha estat seguir el pH i l'oxigen dissolt com a variables del cultiu, la concentració cel·lular per a conèixer el creixement, i el consum d'oxigen com a indicador metabòlic, si bé el pH també és una variable que dóna informació interessant relativa al metabolisme i fisiologia dels cultius.

Donats els diferents enfocaments de desenvolupament possibles en funció dels models cel·lulars a emprar, se n'ha seleccionat un d'ells, les cèl·lules animals. Així, el disseny detallat del sistema de minibioreactors s'ha orientat cap a aplicacions amb aquest model cel·lular, i aquesta elecció també s'ha tingut en compte en el capítol de desenvolupament, on s'han posat a punt els sistemes per a permetre la realització d'aquest tipus de cultius (bàsicament agitació i aeració), realitzant una caracterització hidrodinàmica dels minibioreactors desenvolupats. D'altra banda, també en aquest capítol es presenta el desenvolupament de les tècniques per a seguir la concentració cel·lular, el pH, l'oxigen dissolt i consum d'oxigen.

La darrera part d'aquest treball, una vegada desenvolupades i validades les diferents tecnologies, consta de la realització de cultius emprant diferents tipus de cèl·lules, valorant la reproduïbilitat de l'equip i discutint la informació que aquest proporciona quan una línia cel·lular es cultiva a condicions diferents.

Finalment, també cal remarcar que aquest treball obre les portes al desenvolupament de noves prestacions per al sistema de múltiples minibioreactors desenvolupat, com són el control del pH i de l'oxigen dissolt, i la possible utilització del sistema per al cultiu de bacteris i llevats.

ÍNDEX

1. Introducció.....	1
1.1. Generació de nous productes basats en cèl·lules i biomolècules.....	3
1.1.1. De la química a la biotecnologia.....	3
1.1.2. Nous organismes i biomolècules.....	5
1.2. Identificació de necessitats en el desenvolupament de noves biomolècules i organismes.....	10
1.3. Proposta d'un nou sistema d'optimització i cribat cel·lular.....	15
1.3.1. Interès d'un sistema d'optimització i cribat a escala de minibioreactor..	15
1.3.2. Anàlisi de les tecnologies existents.....	18
1.3.3. Proposta d'un nou sistema de múltiples minibioreactors per als cribats en el desenvolupament de bioprocessos.....	27
1.4. Etapes necessàries en el desenvolupament d'equips de laboratori.....	28
2. Objectius.....	31
3. Definició del sistema de cultiu.....	35
3.1. Mesures necessàries.....	37
3.2. Descripció general del sistema.....	43
4. Capacitats i limitacions dels sistemes de seguiment seleccionats.....	47
4.1. Estudi de les condicions d'operació i seguiment de la concentració cel·lular per absorbància.....	56
4.2. Consideracions per al seguiment de la concentració d'oxigen dissolt.....	63
4.3. Consideracions per al seguiment del consum d'oxigen.....	75
4.4. Consideracions per al seguiment de pH.....	81
4.5. Discussió	93
5. Desenvolupament dels sistemes de mesura.....	97
5.1. Desenvolupament d'un sistema de mesura òptic de la concentració cel·lular i el pH.....	101
5.1.1. Desenvolupament d'un sistema de seguiment òptic basat en tecnologia existent.....	102
5.1.1.1. Seguiment òptic de la concentració cel·lular.....	103
5.1.1.2. Seguiment òptic del pH.....	107
5.1.2. Adaptació del sistema òptic desenvolupat a un equip d'un únic minibioreactor.....	111
5.1.2.1. Millora de la sensibilitat de les mesures d'absorbància.....	116

5.1.2.2. Implementació d'una metodologia de càlcul per a les mesures òptiques en el sistema d'un únic minibioreactor.....	130
5.1.3. Adaptació del sistema òptic desenvolupat a un equip de sis minibioreactors.....	135
5.2. Desenvolupament d'un sistema de mesura d'oxigen dissolt.....	138
5.2.1. Elecció de la tecnologia de mesura.....	138
5.2.2. Desenvolupament d'un sistema de mesura polarogràfic.....	140
5.2.2.1. Determinació del potencial de treball.....	141
5.2.2.2. Caracterització de la funcionalitat: intensitat.....	142
5.2.2.3. Caracterització de la funcionalitat: temps de resposta.....	144
5.2.2.4. Caracterització de la funcionalitat: calibratge i validació.....	158
5.2.3. Aplicació de sistemes de mesura d'oxigen dissolt per fluorescència....	164
5.2.3.1. Fonament de les mesures d'oxigen per fluorescència.....	164
5.2.3.2. Tecnologia emprada per a les mesures d'oxigen per fluorescència.....	166
5.2.3.3. Validació funcional del sistema de mesura de fluorescència.....	167
5.3. Altres desenvolupaments.....	172
5.3.1. Desenvolupament d'un sistema d'agitació específic.....	172
5.3.1.1. Elecció del disseny de l'agitador.....	172
5.3.1.2. Estudis hidrodinàmics i d'estrès derivat de les condicions hidrodinàmiques.....	177
5.3.1.2.1. Estudi de la sedimentació.....	177
5.3.1.2.2. Estudi del temps de mescla.....	178
5.3.1.2.3. Estudi de la transferència d'oxigen.....	180
5.3.1.2.4. Estudi del creixement a diferents velocitats d'agitació.....	185
5.3.2. Adaptació d'un sistema de mesura del consum d'oxigen.....	187
5.3.2.1. Determinació de l'estratègia de pas de nitrogen.....	188
5.3.2.2. Repetibilitat i estabilitat de la mesura.....	190
5.3.3. Desenvolupament de sistemes d'humidificació.....	193
5.3.4. Metodologia d'operació del sistema d'aeració.....	197
5.3.5. Possibilitat de realitzar controls de pH i d'oxigen dissolt.....	201
5.3.5.1. Control de pH.....	202
5.3.5.2. Control d'oxigen dissolt.....	203
5.4. Discussió.....	205
6. Utilització de l'equip desenvolupat: cultius amb diferents models biològics...207	
6.1. Cèl·lules animals.....	209
6.1.1. Creixement en suspensió.....	212
6.1.1.1. Creixement d'hibridomes a condicions idèntiques en els sis minibioreactors.....	213
6.1.1.2. Creixement d'hibridomes a diferents concentracions de <i>Foetal Calf Serum</i>	216

6.1.1.3.	Comparació del creixement observat en cultius d'hibridomes amb medi DMEM amb sèrum, i amb medi sense sèrum (SFM).....	220
6.1.1.4.	Comparació del creixement observat en cultius d'hibridomes amb medi DMEM amb sèrum, i amb medi definit per a hibridomes (CD).....	223
6.1.1.5.	Avaluació de la utilització de Neomicina per a la selecció de cèl·lules que no hagin incorporat un gen de protecció contra aquest antibiòtic.....	227
6.1.2.	Creixement en adherència.....	230
6.1.2.1.	Proves d'adherència sobre els materials plàstics emprats pel sistema de sis minibioreactors.....	231
6.1.2.1.1.	Cultiu amb cèl·lules Vero.....	232
6.1.2.1.2.	Cultiu amb condrocits humans.....	233
6.1.2.2.	Cultius adherents amb el sistema de sis minibioreactors.....	234
6.1.2.2.1.	Comparació de l'evolució de cultius de cèl·lules Vero partint de diferents inòculs.....	235
6.1.2.2.2.	Comparació de l'evolució de cultius de cèl·lules HEK293 creixent sobre microcarriers, partint de diferents inòculs.....	237
6.1.3.	Comparació de creixements amb i sense control de pH i d'oxigen dissolt.....	239
6.1.3.1.	Creixements amb i sense control de pH.....	239
6.1.3.2.	Creixements amb i sense control d'oxigen dissolt.....	241
6.2.	Comparació entre diferents sistemes de cultiu.....	244
6.3.	Adequacions per altres sistemes: bacteris i llevats.....	246
6.3.1.	Adequació dels sistemes d'agitació i aeració.....	246
6.3.2.	Adequació del sistema de mesura de pH.....	248
6.3.3.	Cultiu de <i>Escherichia coli</i>	249
6.3.4.	Cultiu de <i>Pichia pastoris</i>	253
6.4.	Discussió.....	257
7.	Conclusions.....	259
8.	Materials i mètodes.....	265
8.1.	Línies cel·lulars i soques emprades.....	267
8.1.1.	Cèl·lules animals.....	267
8.1.1.1.	Hibridomes.....	267
8.1.1.2.	Cèl·lules Vero.....	267
8.1.1.3.	Cèl·lules HEK293.....	268
8.1.1.4.	Condrocits humans.....	268
8.1.2.	Bacteris i llevats.....	268
8.1.3.	Congelació i descongelació.....	268

8.1.4.	Medis de cultiu.....	271
8.1.4.1.	Medis de cultiu per a hibridomes.....	271
8.1.4.2.	Medi de cultiu per a cèl·lules Vero.....	273
8.1.4.3.	Medi de cultiu per a cèl·lules HEK293.....	274
8.1.4.4.	Medis de cultiu per a <i>Escherichia coli</i>	274
8.1.4.5.	Medis de cultiu per a <i>Pichia pastoris</i>	276
8.1.5.	Manteniment en cultiu.....	276
8.2.	Sistemes de cultiu.....	278
8.2.1.	Sistemes de cultiu control.....	278
8.2.2.	Sistemes de cultiu amb minibioreactors.....	279
8.2.2.1.	Minibioreactors individuals.....	279
8.2.2.1.1.	Minibioreactors mecanitzats en metacrilat i poliestirè cristall	279
8.2.2.1.2.	Minibioreactors injectats en poliestirè cristall.....	280
8.2.2.1.3.	Maquinari associat al sistema de cultiu d'un únic minibioreactor.....	284
8.2.2.2.	Sistemes de múltiples minibioreactors.....	288
8.2.2.2.1.	Minibioreactors injectats en poliestirè cristall	288
8.2.2.2.2.	Maquinari associat al sistema de cultiu de múltiples minibioreactors.....	288
8.3.	Sistemes de mesura.....	292
8.3.1.	Instrumentació analítica associada als minibioreactors.....	292
8.3.1.1.	Sondes per a la mesura d'oxigen dissolt.....	292
8.3.1.1.1.	Sonda polarogràfica.....	292
8.3.1.1.2.	Sonda de fluorescència.....	297
8.3.1.2.	Sistemes de mesura òptica de l'absorbància.....	297
8.3.1.2.1.	Sonda òptica per a la mesura de l'absorbància en el sistema d'un únic minibioreactor.....	297
8.3.1.2.2.	Microespectrofotòmetre.....	298
8.3.1.2.3.	Sistema de concentració de llum per a la mesura en múltiples minibioreactors.....	298
8.3.2.	Instrumentació analítica no associada als minibioreactors.....	299
8.3.2.1.	Sondes per a la mesura de temperatura, pH i oxigen dissolt	299
8.3.2.2.	Equips per a l'anàlisi de glucosa i glutamina.....	299
8.4.	Equipament auxiliar.....	300
8.4.1.	Sistemes d'agitació.....	300
8.4.1.1.	Agitadors.....	300
8.4.1.2.	Varetes imantades.....	300
8.4.1.3.	Pèndols.....	300
8.4.2.	Elements d'aeració.....	302
8.4.2.1.	Rotàmetres.....	302

8.4.2.2. Electrovàlvules.....	303
8.4.3. Fonts d'alimentació.....	304
8.4.4. Sistemes d'humidificació.....	304
8.4.5. Equipament per a la gestió de la instrumentació i l'adquisició de dades.....	305
8.4.5.1. Ordinador de gestió.....	305
8.4.5.2. Targeta Advantech PCL-812-PG.....	306
8.4.5.3. Targeta O ₂ probe.....	306
8.5. Programari.....	307
8.6. Protocols i càlculs.....	310
8.6.1. Càlcul de la OUR.....	310
8.6.2. Metodologia de càlcul del pH i la concentració cel·lular a partir de mesures espectrofotomètriques.....	312
9. Bibliografia.....	315

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Generació de nous productes basats en cèl·lules i biomolècules

1.1.1. De la química a la biotecnologia

Durant la segona meitat del segle XIX i la primera del segle XX es pot considerar que la indústria química va ser la que va sofrir una major evolució, generant multitud de productes, des de polímers a pesticides, passant per pigments, combustibles o molècules d'aplicació en el camp de la salut humana i animal (Ihde, 1983; Columbia Encyclopedia, 2008). Sobretot a partir de la segona meitat del segle XX, l'evolució d'aquesta darrera categoria de productes, concretament les molècules d'activitat biològica d'aplicació en el camp de la salut són aquelles que han mostrat majors avanços, degut bàsicament a l'increment de capacitats en el camp de la química combinatòria, i a l'interès creixent en productes d'aplicació en el camp de la salut. Així, la indústria farmacèutica, amb producció de base química, experimentà durant aquest temps un gran creixement i evolució.

Durant el segle XX doncs, el desenvolupament industrial comença bàsicament al voltant de productes que es poden considerar pertanyents a la química clàssica, i aquest va derivant cap a productes de tipus bioquímic. Arrel dels avanços en biotecnologia, el pas següent d'evolució en la indústria que hi hagué durant les darreres dècades del segle passat, i que és també una previsió per al futur més proper, ha estat un increment en el camp de les biomolècules (Prentis, 1993), que tenen com a origen cèl·lules (bàsicament procariotes o eucariotes) que les produeixen directament o bé produeixen els enzims responsables de la seva producció. Les cèl·lules productores poden produir de forma natural el producte d'interès, o bé haver estat modificades genèticament per tal que es doni, o s'incrementi aquesta producció.

Cal comentar que, en alguns casos, les biomolècules obtingudes químicament presenten limitacions degut a un nombre elevat de passos de reacció i separació necessaris en la seva obtenció, que implica rendiments que es redueixen progressivament al augmentar el nombre de passos necessaris per al seu procés de fabricació. D'altra banda, la complexitat inherent a moltes biomolècules també pot ser un factor limitant i fer inviable la seva obtenció mitjançant tècniques de química clàssica, afavorint la utilització d'organismes dotats amb la maquinària necessària per produir biomolècules complexes.

Per a il·lustrar un exemple que mostra l'evolució de la química clàssica a la biotecnologia, a continuació es presenta el cas de la producció d'insulina.

La insulina és una biomolècula que té com a funció afavorir la incorporació de la glucosa en sang cap a les cèl·lules. En els casos de diabetis, on els malalts no tenen producció d'insulina al pàncrees (diabetis tipus I), o bé aquesta molècula no és funcional (diabetis tipus II), és necessari administrar als malalts quantitats continuades d'aquesta biomolècula. Tenint en compte el nombre de malalts existents a nivell mundial, la quantitat d'insulina que s'ha de produir anualment es situa en l'ordre de tones. La seva producció per síntesi química presenta unes limitacions que van fer que, des del moment que va començar a ser utilitzada terapèuticament, s'optés per descartar un procés íntegrament químic. Inicialment, s'aïllava insulina d'animals on la molècula era similar a la humana, en concret del porc, i realitzant alguns passos de síntesi enzimàtica, s'humanitzava la molècula. Més tard, per tal de millorar el procés, es van emprar tècniques d'ADN recombinant per tal de clonar el gen responsable de la producció de part o tota la molècula d'insulina en diferents microorganismes (bacteris, llevats) (Kjeldsen, 2000). Finalment també s'han emprat eines d'enginyeria de proteïnes per tal de modificar-la augmentant l'activitat i estabilitat de la molècula (Dunn i Col., 2003; Chapman i Perry, 2004).

Aquest cas és un exemple de les limitacions per a la producció química de molècules amb estructura complexa, i mostra com s'han emprat les diferents eines biotecnològiques per a millorar el procés productiu. Així, la utilització d'eines de genòmica va permetre passar d'utilitzar insulina animal amb un cert nombre de passos de síntesi, a produir-la a partir de microorganismes, evitant la limitació deguda al nombre de pàncrees disponibles (porcins), l'heterogeneïtat entre lots, i obtenint un procés més eficient (més capacitat, menys cost). Dins de la producció emprant microorganismes (des del 1982 hi ha insulina recombinant al mercat), s'ha treballat per tal d'obtenir processos més eficients, bé augmentant l'activitat específica de la molècula, bé augmentant la productivitat (bé augmentant la productivitat específica, o bé incrementant la concentració de microorganismes productors). Totes aquestes possibilitats estan dirigides a poder tenir equips de menors dimensions, que requereixin plantes productives més petites, amb menors costos d'instal·lació i operació i que seran, per tant, més competitives.

A la figura 1.1 es presenten de forma gràfica els elements sobre els quals es pot treballar per a millorar un bioprocés. D'una banda hi intervenen els models cel·lulars emprats, que marcaran fins un cert punt la cinètica del sistema i els medis de cultiu necessaris. Relacionat amb els models cel·lulars hi intervenen eines d'enginyeria genètica que tenen com a objectiu obtenir una productivitat específica el més alta possible. D'altra banda hi intervenen eines d'enginyeria de proteïnes, que tenen com a objectiu bàsic l'augment de l'activitat específica del producte desitjat. I finalment, també es poden emprar eines

d'enginyeria de bioprocés per tal d'incrementar la productivitat volumètrica, millorar els rendiments i reduir costos operatius.

L'existència de tots aquests elements de treball impliquen per cadascun dels productes a desenvolupar es generin un nombre elevat de clons productius i sigui necessari avaluar diferents condicions experimentals per trobar la de més rendiment productiu.

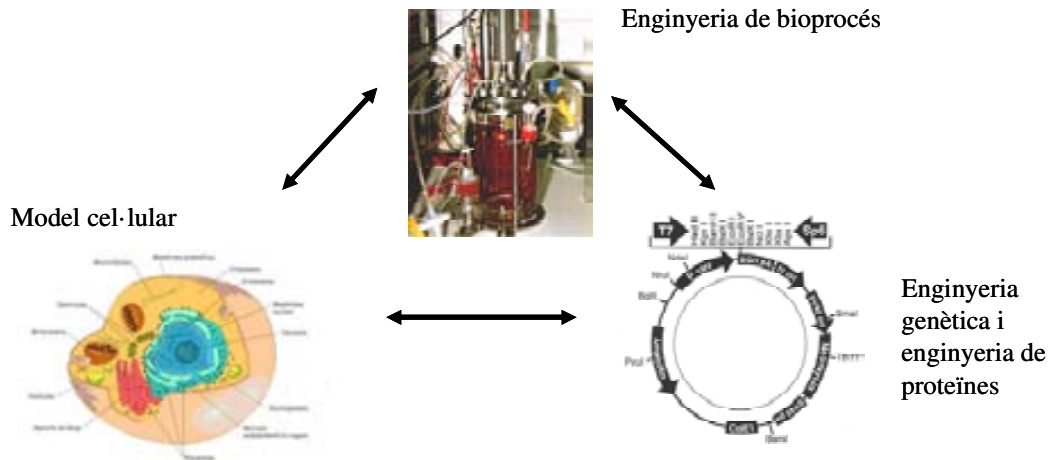


Figura 1.1. Esquema dels diferents elements de treball per a la millora d'un determinat bioprocés.

1.1.2. Nous organismes i biomolècules

A banda de la tendència d'evolució industrial cap a productes d'origen biotecnològic, cal recalcar la importància que aquests han adquirit, degut a les seves nombroses aplicacions, que progressivament s'han anat incrementant en àrees tant diverses com la salut humana i animal (teràpia, diagnòstic i profilaxi), medi ambient, i indústria agroalimentària, entre d'altres. A banda de l'ampli potencial d'aplicació que mostra la diversitat de sectors, cal esmentar que els importants avanços tecnològics produïts en les darreres dècades, han promogut que el nombre de noves biomolècules i organismes que s'han desenvolupat i han pogut penetrar en les àrees d'aplicació comentades sigui molt elevat. Addicionalment, s'espera que en els propers anys el nombre dels nous productes o processos basats en la biotecnologia encara tingui un major augment.

A continuació, es presenta una breu prospectiva en cadascun dels subsectors en què es classifica la biotecnologia en funció de la seva àrea d'aplicació (DaSilva, 2007):

Biotechnologia blanca. Aplicacions en el sector industrial i energètic.

En aquest camp, l'any 2005 a la Unió Europea prop del 5% dels productes químics ja s'obtenien de forma biotecnològica. I en un informe del 2006, la OCDE estimava que en 5-10 anys aquest percentatge podria augmentar fins un 20%, i fins el 60% dels productes de química fina podrien fabricar-se de forma biotecnològica. No obstant, el compliment d'aquestes previsions depèn en gran part de factors com el preu de la matèria primera, l'acceptació del consumidor, així com de polítiques governamentals i inversions que li donin suport (Fundación Genoma España, 2006).

Biotechnologia verda. Aplicacions en el camp de l'indústria agroalimentària.

Aquest camp presenta com a principals aplicacions l'enginyeria genètica de plantes, biofertilitzants, i biopesticides, tot i trobar-se ja fortament implantada en la producció agrària de països com Argentina, Brasil, E.U.A., i països de la UE, té una forta oposició per part de grups ecologistes, que ha conduït a una certa percepció negativa per part dels consumidors finals (Arocena, 2007-2008).

Biotechnologia blava. En aquest cas, no es defineix aquests subsector en funció d'on es dirigeixen els productes sinó en funció del seu origen: marí (de totes maneres engloba aquicultura en general).

El potencial d'aquest camp rau en el fet que el 80% dels éssers vius es troben en ecosistemes marins, de manera que aquests reuneixen gran part de la biodiversitat del planeta. Així, els micro, macroorganismes i biomolècules d'origen marí presenten un gran potencial d'aplicació en aliments funcionals, biomaterials, cosmètica, i també en productes farmacèutics (Arocena, 2007-2008).

Biotechnologia vermella. Aplicacions en salut humana i animal.

Segons els informes sobre biotecnologia de la Comissió Europea, aquest és el camp d'aplicació de la biotecnologia moderna més destacat (EC-JRC-IPTS, 2007). En la línia del que afirma aquest informe, també els informes sectorials del 2008 sobre la situació de la indústria biotecnològica espanyola (ASEBIO, 2008) recalquen l'elevada rellevància de la biotecnologia vermella tant a Espanya com a la resta del món, ja que és l'àrea on són presents un major nombre de productes, patents i empreses. De la mateixa manera és l'àrea que acumula major volum de vendes i inversions en I+D.

El potencial de creixement en aquesta àrea també és destacat, tal com mostren dades com el fet que dels productes d'aplicació terapèutica, en aquests moments un 20% s'obtenen biotecnològicament, però aquest percentatge arriba fins el 50% dels productes que estan en fase clínica (ETEPS, 2007).

Un altre indicador que es pot utilitzar per estimar el potencial de generació de noves aplicacions en el camp de la biotecnologia vermella és la inversió de R+D en la indústria farmacèutica. Precisament la indústria farmacèutica/biotecnològica destaca entre altres sectors on la innovació és un factor important (aeroespacial, comunicacions, automoció) com un dels que major percentatge d'inversió en R+D incorpora. Així, a Espanya, la inversió realitzada per les empreses adherides als plans de foment de R+D en la indústria farmacèutica ha estat l'any 2006 de 844 milions € (Farmaindustria, 2007), mentre que a Europa, aquell mateix any fou de 24.759 milions € (EFPIA, 2008). Per veure quina ha estat l'evolució de la inversió en R+D d'aquestes indústries comparant les dades de l'any 1995 amb les del 2006, a nivell espanyol, l'evolució ha estat de 232 a 844 milions €, i a nivell de la Unió Europea, l'evolució ha estat de 11.423 a 24.759 milions €.

Donats els indicadors anteriors que mostren la importància d'aquest camp de la biotecnologia vermella, a continuació s'aprofundirà en les diferents aplicacions que es dona als productes d'aquest camp, el seu pes relatiu, i els organismes emprats per a la seva producció.

Dins la biotecnologia vermella, la classificació principal dels productes per àrea d'aplicació mostra tres categories diferents: biofàrmacs (biomolècules d'aplicació terapèutica), vacunes recombinants, i eines de diagnòstic basades en biotecnologia. El pes relatiu de cadascuna de les categories anteriors, es reflexa en les dades de facturació a la Unió Europea de l'any 2005 (veure figura 1.2), que mostren l'elevat pes relatiu dels biofàrmacs respecte les altres categories.

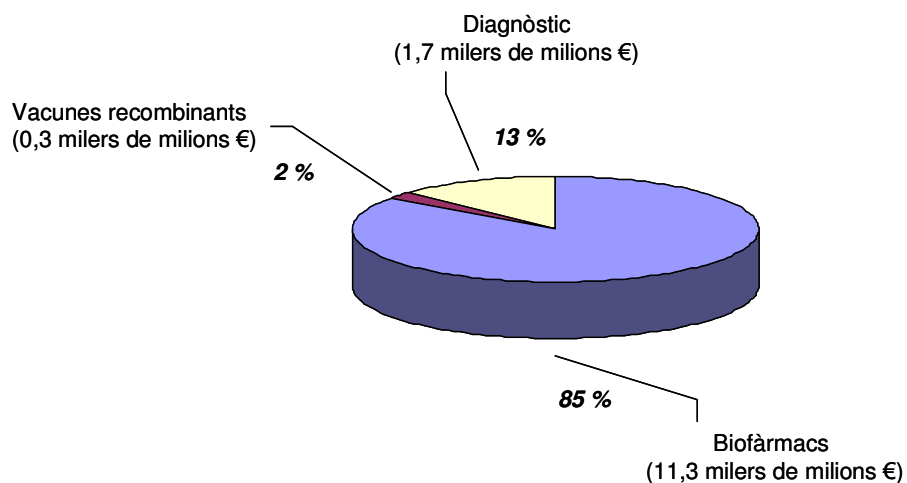


Figura 1.2. Facturació (en valor absolut, i com a percentatge del total) de cadascuna de les categories d'aplicació de la biotecnologia vermella en funció de facturació, a la Unió Europea, l'any 2005. Font: Informe EC-JRC-IPTS (2007).

Dins el camp d'aplicació de salut humana, alguns dels indicadors més emprats són el nombre de molècules en procés d'aprovació per la Food and Drug Administration (FDA), i l'informe anual publicat per l'associació d'indústries farmacèutiques americanes (PhRMA), que xifra les inversions en el sector. L'informe PhRMA 2008 sobre els productes aprovats per la FDA l'any 2007 mostra com durant aquest any foren aprovades 18 noves molècules/teràpies. Tot i que aquest nombre pugui semblar reduït, cal tenir en compte que segons aquest mateix informe es tarden uns 10-15 anys de mitjana entre la descoberta d'una determinada molècula d'interès i la seva aprovació per a ús humà. I també cal considerar que dels molts productes que entren en aquest camí, només uns pocs arriben al mercat. Així, segons aquest informe, de cada 5.000 molècules avaluades en etapes de descobriment i testos preclínic, només 5 entren a proves clíniques, i d'aquestes, només una obté l'aprovació final per part de la FDA.

Aquest *ratio* tant elevat entre molècules que entren en el procés de desenvolupament i les que són finalment aprovades constitueix també un indicador de l'elevat nombre de compostos a ser avaluats en les primeres etapes de desenvolupament i aprovació, com es reflexa en l'important esforç econòmic que les companyies han de fer en els seus programes de desenvolupament de noves entitats. Així, només les empreses que formen part de PhRMA l'any 2006 van invertir en R+D 43.400 milions de dòlars. La comparació d'aquestes dades amb les de 1995 (inversió en R+D: 15.200 milions de dòlars) mostren novament l'alt creixement d'aquesta àrea, que en aquest període de temps ha vist pràcticament multiplicada per tres la inversió en R+D.

Per a un major coneixement dels productes en procés d'aprovació per part de FDA, es presenta la figura 1.3 (Ozturk i Hu, 2006), on es mostra una classificació dels productes per a tractament de malalties que estan en diferents estadis del procés d'aprovació per part de la FDA. En aquesta, es pot observar la gran importància que prenen les cèl·lules de mamífer, ja que són una plataforma de producció àmpliament establerta per a hormones de creixement, factors de creixement, proteïnes recombinants humanes, interferons i anticossos monoclonals. Aquesta dada va en la mateixa direcció que les afirmacions de Würm (2004), que situa entre el 60 i 70% el percentatge sobre el total de les proteïnes recombinants d'utilització farmacològica que basen la seva producció en cèl·lules de mamífer. En el moment de definició de les prestacions del sistema de cultiu que es pretén desenvolupar en aquest treball caldrà tenir en compte aquestes dades, entre d'altres.

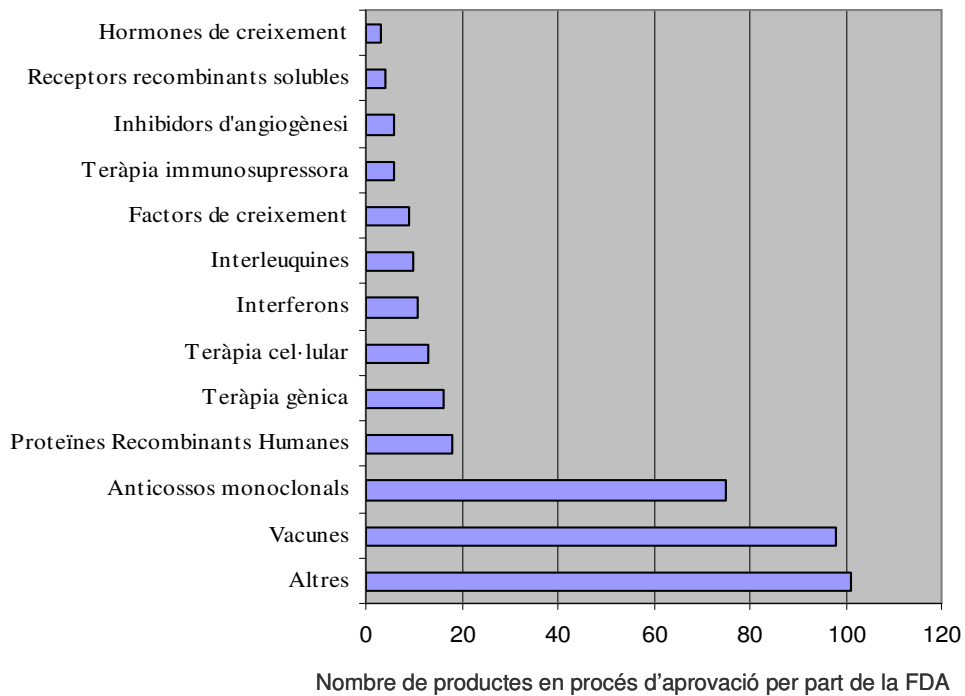


Figura 1.3. Productes terapèutics d'origen biotecnològic en desenvolupament al mercat Nord-Americà (Ozturk i Hu, 2006).

Encara dins l'àrea d'aplicació terapèutica, a banda dels organismes en desenvolupament que tenen com a principal aplicació la producció de determinades biomolècules, cal fer esment a un camp que s'espera que emergeixi en els propers anys, el de la teràpia cel·lular i tissular. La capacitat d'aïllar cèl·lules mare adultes i embrionàries, que aquestes siguin cultivades i, potencialment derivades a teixits reimplantables, obre la porta a la possibilitat de realitzar teràpies cel·lulars i tissulars, i en definitiva a la medicina regenerativa. De totes maneres però, al potencial d'aquest camp encara li manca veure's plasmat en el mercat biomèdic amb un nombre significatiu de productes i, avui en dia, el nombre de tractaments de medicina regenerativa en fases clíniques avançades és encara més reduït.

1.2. Identificació de necessitats en el desenvolupament de noves biomolècules i organismes

Degut a la gran quantitat de nous organismes i molècules que estan essent i seran generats, es necessari poder fer front a la capacitat d'explorar, en temps raonables i amb mitjans altament tecnificats i estandarditzats, tant el potencial productiu de les diferents cèl·lules modificades, en quant al seu creixement i capacitat de producció, així com els efectes terapèutics i/o tòxics de les diferents molècules desenvolupades amb les tècniques mencionades.

Establir les condicions d'un procés productiu basat en cèl·lules requereix completar un nombre d'etapes molt elevat: selecció del model cel·lular, treballs de biologia molecular per expressar la molècula d'interès, selecció clonal, definició del medi i condicions de cultiu, selecció de l'estratègia de cultiu, purificació i expedició final, controlant la qualitat, activitat del producte, i també la seva toxicitat. Tots aquests requeriments han de ser definits i optimitzats amb una elevada precisió per a poder transferir-los amb èxit a escala de producció, que es veurà sotmesa a estrictes normatives GMP, i amb condicions que seran difícilment modificables una vegada els processos hagin estat establerts i validats per les agències reguladores pertinents (FDA, EMEA, etc.).

A la figura 1.4 (Doran, 1998) es mostren de forma genèrica les diferents etapes de les que pot constar el desenvolupament d'un bioprocés. Les primeres etapes (1-7) estan relacionades amb la manipulació genètica de l'organisme hoste, on s'hi incorpora ADN provinent d'un altre organisme i que li confereixi la capacitat de produir una determinada molècula. Les tasques d'enginyeria genètica són realitzades a petita escala habitualment per biòlegs moleculars que, en termes de bioprocés, tenen com a paràmetres principals l'estabilitat de les soques obtingudes i el nivell d'expressió del producte desitjat. Després del clonatge, les característiques de les soques i la seva productivitat es mesuraran en funció de l'ambient de cultiu (etapa 8), de manera que seran necessàries tasques d'optimització de tal ambient de cultiu (medi, temperatura, pH si es pot controlar), realitzant els anàlisis cinètics i de productivitat pertinents. Una vegada conegudes les condicions òptimes del cultiu a petita escala comença el procés de canvi d'escala, començant per un reactor a escala laboratori (500 mL- 5 L), equipat amb instrumentació per a seguir i ajustar temperatura, pH, concentració d'oxigen dissolt, velocitat d'agitació i altres variables del procés. En aquesta etapa (etapa 9) s'obté informació sobre les necessitats d'oxigen, sensibilitat a la cisalla, característiques de generació d'espuma, entre altres, i també caldrà decidir l'estratègia de cultiu (discontinu, discontinu alimentat, continu, perfusió). En les etapes següents (Etapes 10-

11), s'augmentarà progressivament el volum dels bioreactors, tenint com a objectiu que els canvis de disseny, geometria, sistemes d'agitació i aeració no afectin significativament als creixements i productivitats òptimes establertes a escala laboratori. Una part molt important del procés la constitueix la recuperació del producte (Etapla 12). El brou resultant de la fermentació es sotmet a una sèrie de passos per tal d'obtenir el producte final amb la puresa desitjada, en funció de la naturalesa del producte (intracel·lular/extracel·lular), i dels seus contaminants. Cal tenir en compte que la purificació pot suposar una part molt important del cost total del procés, arribant-se en determinats casos fins el 80-90% del cost del procés. Una vegada el producte ha estat aïllat i purificat de forma suficient, aquest pot ser envasat i comercialitzat (Etapla 13).

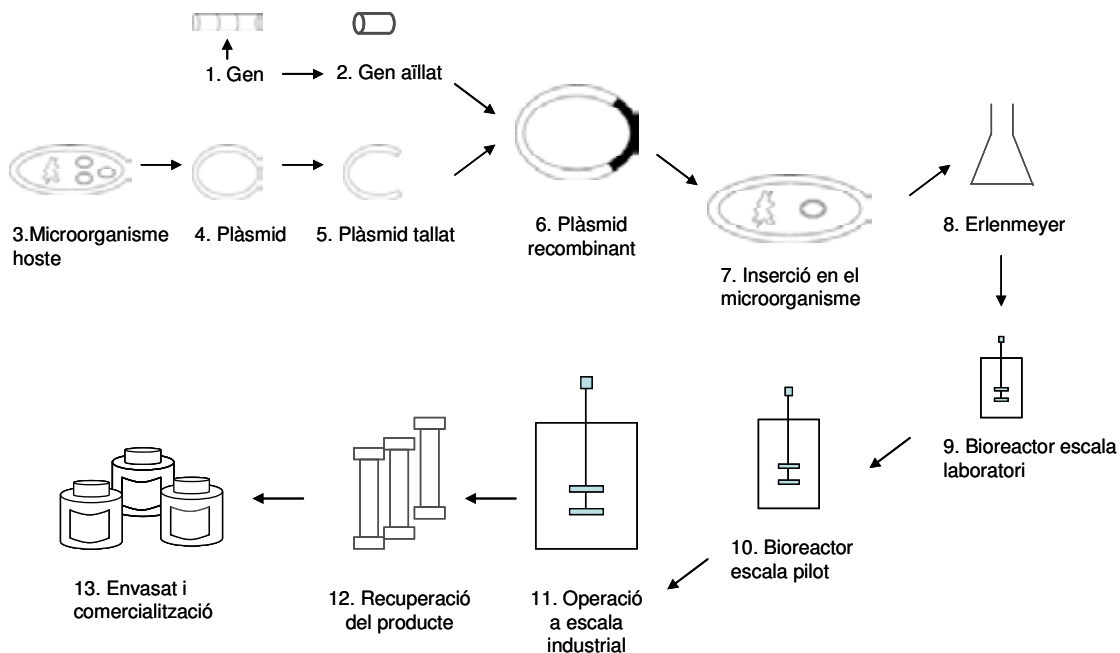


Figura 1.4. Etapes per al desenvolupament d'un bioprocés fins a la fabricació comercial d'un producte biotecnològic derivat de tecnologia de ADN recombinant (Doran, 1998).

Un altre element a tenir en compte en el desenvolupament de bioprocessos és l'elevada importància del factor temps, ja que les empreses intenten minimitzar els mesos dedicats a aquests desenvolupaments per a facilitar l'entrada del procés en la fase productiva i la ràpida comercialització del producte tan bon punt supera les fases clíniques i rep la corresponent aprovació. En alguns casos aquesta pressió per iniciar la fase comercial provoca que es desenvolupin processos de forma subòptima, de manera que quan aquests operen a escala de producció, el volum (i per tant, el cost) de l'equipament de

procés emprat sigui major al que es requeriria si s'hagués realitzat una millor aproximació a l'òptim d'operació.

Parlant des del punt de vista de l'equipament emprat, de forma general es pot considerar que les etapes de desenvolupament d'un determinat producte d'origen biotecnològic, consten d'unes primeres fases d'experimentació a petita escala on el nombre d'experiments a realitzar és molt elevat, i a continuació, una vegada identificades les molècules/clons d'interès, es procedeix cap a majors escales, acostant-se progressivament a la que serà l'escala de producció.

Per a afrontar l'experimentació de les primeres fases de cribat, existeixen sistemes a petita escala i d'una gran capacitat, amb elevats graus de robotització i automatització. Aquests sistemes han adquirit la denominació de *High Throughput Screening* (HTS) (figura 1.5).

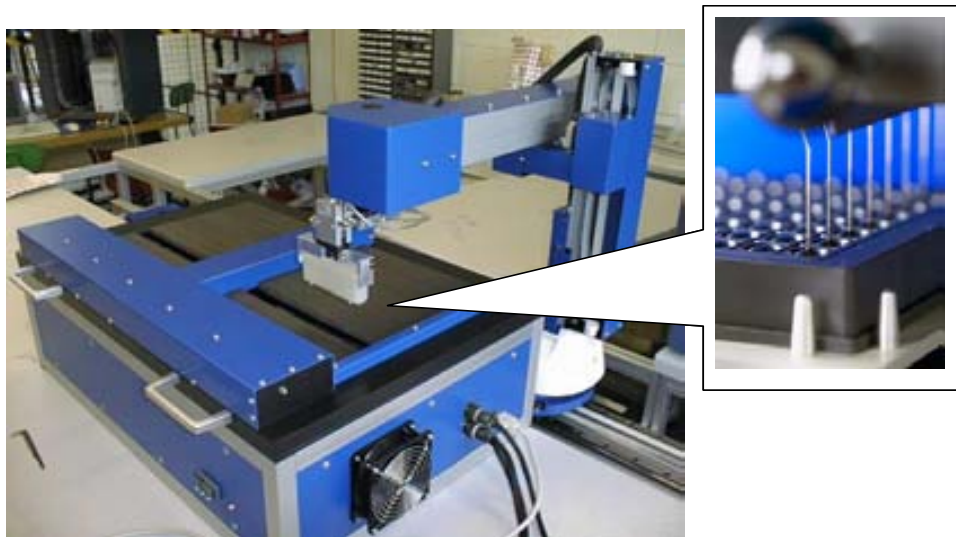


Figura 1.5. A l'esquerra, vista general d'un equip per a High Throughput Screening (ST Robotics), amb un braç robòtic per al treball amb plaques multipou de fins a 3456 pous per placa. A la dreta, vista de detall del treball del braç robòtic amb una placa multipou.

En els sistemes de *High Throughput Screening* és interessant el treball a nivell molecular, amb diferents finalitats, com la identificació de l'expressió de determinats gens, la realització d'assajos enzimàtics o d'activitat per a determinar l'interès de determinades molècules o la possible capacitat d'obtenció de productes per part de cèl·lules.

Completades aquestes primeres etapes de cribat on es detecten activitats d'interès i es seleccionen les cèl·lules o molècules, es passa a les etapes posteriors de desenvolupament dels processos basats en aquestes cèl·lules/molècules. En aquestes etapes, tal com es recull a la figura 1.6, es van realitzant cultius des d'una escala més petita a una escala cada vegada més gran, fins assolir finalment l'escala productiva desitjada.



Figura 1.6. Etapes en el canvi d'escala dels bioprocessos. Font imatges: www.sartorius-stedim.com, www.labdepotinc.com

Es ben conegut (Schmidt, 2005) que l'escala final de producció i les condicions físiques (hidrodinàmica, grau de mescla, dissipació energètica, transferència matèria i calor, estrès mecànic, entre altres) afecten el comportament dels sistemes biològics, al afectar les condicions a les quals es realitzen els cultius. Aquest fet pot alterar de forma considerable el procés productiu (creixement i productivitat) del producte d'interès. Per

aquesta raó el desenvolupament de bioprocessos segueix etapes en les que els equips emprats van augmentant d'escala des d'uns pocs mil·lilitres fins a l'escala de producció. En aquest procés de canvi d'escala és molt important poder relacionar les activitats cel·lulars observades amb les condicions ambientals en què s'han produït, per tal de poder obtenir informació rellevant de cara al disseny del bioprocés en estudi. Així, moltes vegades es treballa amb el concepte *scale-down* (Bylund, 1999), en el marc del qual s'estudia el comportament a una escala de laboratori, en la que es reproduïxen les condicions (a vegades locals) que hom espera tenir a l'escala de producció, i d'aquesta manera anticipar quin serà el resultat obtingut en termes de producció/productivitat, per exemple.

Un dels aspectes més crítics en tots aquests estudis per tal d'assegurar la consistència del bioprocés, és que els equips emprats en les etapes inicials, on es proven moltes condicions diferents en volums relativament petits (uns pocs mil·lilitres), garanteixin una bona homogeneïtat per tal que totes les cèl·lules estiguin exposades a les mateixes condicions, en absència de gradients locals, i estiguin correctament monitoritzades, per tal de conèixer l'evolució temporal de les variables físico-químiques més importants en el sistema de cultiu i els seus valors en els òptims de producció.

En les primeres etapes d'estudi del bioprocés, on s'empren equips amb un volum d'uns pocs mil·lilitres el grau de monitorització o control sobre el que s'està esdevenint acostuma a ésser força reduït. Així, en el cas de cultius de diferents microorganismes o línies cel·lulars, en aquestes etapes de desenvolupament els cultius s'acostumen a realitzar en Erlenmeyer, flascons o en plaques multipou (veure figura 1.6), havent-hi un coneixement escàs de paràmetres tant crítics sobre el procés com poden ser la concentració d'oxigen dissolt o el pH. Això pot comportar que una vegada hagi estat identificat un compost d'interès i es desitgi realitzar un escalat fins a portar-lo a producció, no es puguin reproduir les condicions de cultiu en què aquest ha estat generat i, per tant, es perdi la possibilitat de continuar amb el seu desenvolupament.

Posant un cas d'exemple, quan s'està realitzant una optimització de medi per a cèl·lules animals en suspensió, el creixement s'acostuma a fer en plaques multipou, on les cèl·lules creixen sedimentades sobre la base de la placa, experimentant gradients de concentració, i sense disposar de monitorització de pH, ni d'oxigen dissolt. Una vegada s'ha determinat el medi que aparentment és òptim en base a la informació de creixement i producció, quan s'intenta reproduir el cultiu en un bioreactor, amb agitació, i control sobre pH i oxigen, es pot donar que les dades de creixement, o bé les de producció, siguin dràsticament diferents a les determinades prèviament. Així, pot esdevenir-se que el creixement en suspensió provoqui estrès a les cèl·lules, que els contactes cèl·lula-

cèl·lula que es produïen en placa fossin responsables d'una productivitat diferent, que les possibles limitacions d'oxigen produïdes a la placa induïssin determinats canvis metabòlics en el cultiu, etc. Per exemple, en experiments realitzats amb una línia d'hibridoma (Sanfeliu, 1995) es pot observar com al reduir la concentració d'oxigen dissolt es produeix un canvi metabòlic, de manera que els cultius produeixen concentracions més elevades d'àcid làctic, una substància inhibidora per al creixement del cultiu.

En resum, el desenvolupament d'un bioprocés serà millor en la mesura que es disposi de sistemes més homogenis i millor caracteritzats en totes les etapes del mateix (recollides a la figura 1.6). És precisament la no existència d'equips que compleixin amb aquestes característiques per realitzar la primera de les etapes (fase de cribat inicial) la principal motivació d'aquest treball.

1.3. Proposta d'un nou sistema d'optimització i cribat cel·lular

1.3.1. Interès d'un sistema d'optimització i cribat a escala de minibioreactor

Mentre que en les primeres etapes de cribat inicial existeixen robots que permeten l'anàlisi d'activitats d'un nombre molt elevat de cèl·lules i molècules en temps reduïts, a escala comercial pràcticament no existeixen productes amb un concepte similar al de HTS a nivell de minibioreactors, que permeti realitzar de forma fiable i en petits volums (d'uns pocs mil·lilitres) les proves que habitualment es realitzen o bé en sistemes de cultiu sense seguiment de les variables crítiques o bé en bioreactors de volums més elevats, que fan que els processos de cribat siguin lents i tinguin associat un cost elevat.

Així doncs, es considera que seria altament interessant disposar de sistemes de múltiples minibioreactors agitats i monitoritzats que permetin escometre les primeres fases del desenvolupament del bioprocés de forma ràpida, sistemàtica i amb informació rellevant sobre l'evolució de les principals variables de cultiu, de forma que es pugui passar a les següents etapes del procés (amb bioreactors de volum superior) amb un coneixement real de les capacitats d'un determinat cultiu en relació a les principals variables del cultiu. D'aquesta manera, en els subseqüents canvis d'escala es podrà discriminar entre aquells efectes directament relacionats al mateix, i els provocats pels canvis en les condicions ambientals del cultiu.

Per tal d'exemplificar aquesta argumentació, a continuació es presenta un exemple amb incidències en el canvi d'escala degut a les diferències en les condicions ambientals entre els sistemes de cultiu, que es podrien evitar.

- Exemple 1. Incidències en el canvi d'escala. Un dels models cel·lulars emprats per la producció d'anticossos monoclonals és el de les cèl·lules d'hibridoma. Aquestes cèl·lules s'obtenen mitjançant la fusió d'un limfòcit que produeix l'anticòs d'interès amb un altre tumoral, per tal d'obtenir una línia immortalitzada. En aquest procés es generen un determinat nombre de clons, que són cultivats i expandits en plaques multipou (com la que es mostra a la figura 1.6). Al no incloure entre els criteris de selecció dels clons la comprovació que aquests puguin ser cultivats en sistemes agitats, un problema que apareix eventualment és el fet que quan aquestes cèl·lules intenten ser cultivades en bioreactors agitats, aquestes no suporten l'estrès produït, de manera que s'ha de tornar enrere en el desenvolupament del bioprocés i seleccionar un altre clon que permeti el seu cultiu en bioreactors. Aquest tipus d'incidència podria ser evitada, si en el procés de selecció dels clons, aquests fossin cultivats en sistemes agitats de minibioreactors, on addicionalment, podrien identificar-se altres possibles problemes a partir del seguiment dels paràmetres crítics del cultiu.

Una altra característica molt desitjable en els sistemes de múltiples minibioreactors que es pretén desenvolupar és que, de forma semblant al que es dona en les plaques de cultiu de laboratori, estiguin fabricats en material plàstic d'un sol ús, que arribi al usuari en condicions estèrils. D'aquesta forma, el temps de posada en marxa i aturada dels bioreactors es redueix dràsticament en comparació amb els bioreactors convencionals de laboratori.

Un dels principals avantatges de la miniaturització, acompanyada del desenvolupament d'una plataforma de múltiples minibioreactors, està associada a les reduccions notables que es poden obtenir, fonamentalment pel que fa a medis de cultiu i al temps necessari per realitzar l'experimentació.

Totes aquestes consideracions es reflecteixen a continuació d'una forma pràctica en comparar, només pel que fa al temps d'operació i als costos de medi de cultiu, la realització de sis experiments en un bioreactor convencional de 2-L i en una plataforma de múltiples minibioreactors com la que es plantejarà més endavant en aquest treball.

- Exemple 2. Agilització en el desenvolupament de bioprocessos. A continuació es planteja un determinat experiment amb un cert nombre de condicions a avaluar, i es compara el temps necessari i cost (únicament de medi) per la utilització d'un bioreactor 2-L i d'un sistema amb sis minibioreactors operant en paral·lel.

Nº condicions experimentals a avaluar = 4 (per exemple, medis de cultiu diferents)
Nº repeticions per a cada condició = 3
Nº experiments totals = 12

Utilització d'un bioreactor 2-L

Capacitat experimental = 1 experiment per operació
Temps per experiment = 6 dies (1 muntatge, 1 esterilització i calibratge, 3 cultiu, 1 rentat)
Volum de medi per experiment = 2 L (preu Aprox. 100€/L)

Consum total:
Temps = 72 dies
Volum de medi = 24 L (2400€)

Utilització d'un sistema amb sis minibioreactors

Capacitat experimental = 6 experiments per operació
Temps per experiment = 3 dies (3 dies de cultiu)
Volum de medi per experiment = 12 mL (preu Aprox. 100€/L)

Consum total:
Temps = 6 dies
Volum de medi = 144 mL (14,4€)

Com es pot observar, les diferències són molt elevades, i a més no s'han tingut en compte els costos derivats de l'elevada dedicació de personal que requereixen els bioreactors convencionals. Precisament l'alta dedicació i qualificació de personal és una de les preocupacions de la indústria biotecnològica, de manera que caldrà que els sistemes de múltiples minibioreactors que es pretén desenvolupar tinguin una alta automatització que en permeti un funcionament pràcticament autònom.

En tot cas, cal indicar des d'un principi que el desenvolupament i utilització dels minibioreactors no implicaria una substitució total dels bioreactors convencionals, on caldria continuar efectuant els estudis de canvi d'escala, però sí que permetria la realització de sèries d'experiments molt més àmplies en un temps menor, menors costos, i amb resultats rellevants que, per tant, permetrien millorar de forma notable la quantitat i qualitat de les dades obtingudes en les primeres etapes de desenvolupament de bioprocés, abans de passar a les següents on ja s'emprarien bioreactors convencionals, a partir de l'extens coneixement previ adquirit.

Una darrera àrea d'interès per als sistemes de múltiples minibioreactors és la dels sistemes *in vitro* per a la realització d'experiments amb cèl·lules animals. Això permetria una certa reducció de l'experimentació amb animals de laboratori (o bé la substitució de tests amb alts requeriments de ma d'obra), en els processos de desenvolupament o avaluació de noves substàncies terapèutiques, en el qual es requereix l'avaluació de activitats farmacològiques i toxicològiques.

Una vegada identificades les necessitats i l'interès de disposar de sistemes de múltiples minibioreactors d'uns pocs mil·lilitres de volum, es creu convenient analitzar les característiques de les tecnologies existents que puguin complir amb alguns d'aquests atributs.

1.3.2. Anàlisi de les tecnologies existents

En aquest apartat, i per tal d'identificar d'una forma més concreta les prestacions que s'intentarà que tingui el sistema de minibioreactors que es vol desenvolupar, es recullen en primer lloc quines són les característiques del sistema de referència actual en les tasques de desenvolupament de bioprocessos a tots els laboratoris de biotecnologia. Aquest sistema de referència són els bioreactors de laboratori, que solen tenir capacitats en el rang de 500 mL a 5 L. A continuació es fa també un anàlisi de diferents sistemes desenvolupats a petita escala, observant en cada cas quines prestacions es continuen mantenint, quin valor afegit aporten i quines limitacions tenen,.

Pel que fa a bioreactors de laboratori, emprats de forma massiva en el desenvolupament de bioprocessos, les seves prestacions bàsiques contemplen el manteniment acurat de la temperatura, l'agitació, l'oxigen dissolt i el pH en el brou de cultiu. L'agitació s'efectua mitjançant eixos amb diferents tipus de turbines, pales o altres accessoris. La temperatura es manté en el valor desitjat mitjançant canvis externs amb aigua termostatada. Per a l'aeració s'empren diferents accessoris, des de membranes de silicona a través de les quals es difon l'oxigen cap al medi, a diferents sistemes d'alimentació directa d'aire per bombolleig. Finalment, es disposa de sistemes de monitorització i control de l'oxigen dissolt (mitjançant el control de la vàlvula d'entrada d'aire-oxigen, i en alguns casos de nitrogen), del pH (mitjançant addició d'àcid i base), agitació i temperatura (T). A la figura 1.7 es presenta una representació esquemàtica d'un bioreactor i les seves prestacions.

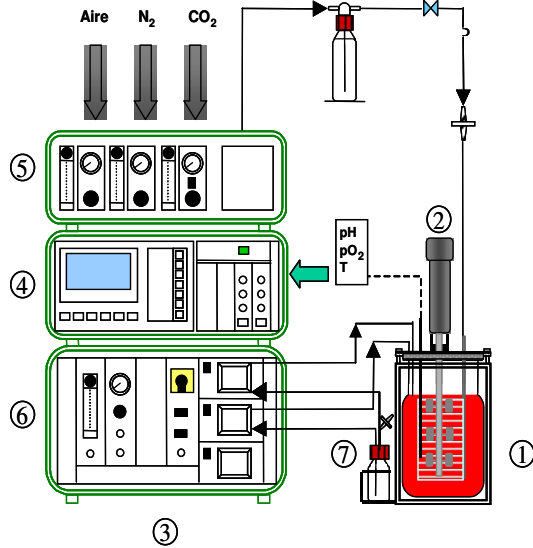


Figura 1.7. Representació esquemàtica d'un bioreactor de 500 mL - 5 L per a cultiu cel·lular amb les prestacions bàsiques més habituals. 1) Cuba, 2) Sistema d'agitació, a l'interior del bioreactor amb pales o altres accessoris, 3) Estació de treball, incloent 4) unitat de control (controladors T, pH, i [O₂]) 5) estació de mescla de gasos que alimenta els gasos cap a l'interior del bioreactor, 6) sistemes d'addició de 7) solucions àcid/base. Les sondes de T, pH i [O₂] no presents en aquesta representació, es troben submergides al líquid del bioreactor, i les seves senyals de sortida s'alimenten a la unitat de control digital.

Cal indicar també una important tendència de mercat que s'ha donat en els darrers anys en els bioreactors per a cultiu cel·lular, com és la introducció dels equips d'un sol ús, fets de plàstic biocompatible. En els darrers anys les pressions existents dels elevats requeriments de temps i necessitats de validació en sistemes reutilitzables han conduït cap a una utilització cada vegada més extensa de sistemes d'un sol ús (Rao i Col., 2009). La raó principal d'aquest canvi és la major senzillesa dels procediments de treball amb els sistemes d'un sol ús, que porten a una implantació menys costosa de les normes *Good Manufacturing Practice* (GMP) habituals en aquest sector industrial. A nivell del desenvolupament del bioprocés, els equips d'un sol ús afegeixen com un avantatge addicional la reducció quasi total del temps necessari per preparar els experiments (rentat, esterilització, etc.), fet que permet optimitzar de forma notable el temps i els recursos humans dels equips de desenvolupament.

Pel que fa a la miniaturització de minibioreactors, tot i que no molts d'ells estan disponibles com a productes comercials, hi ha hagut un cert nombre de desenvolupaments que d'acord amb Betts i Baganz (2006), i Kumar i Col. (2004), es solen dividir en (veure'n imatges exemplificatives a la figura 1.8):

- Sistemes agitats externament, mitjançant plaques agitadores externes que es mouen juntament amb els minibioreactors, de forma orbital. Aquests sistemes per tal de ser utilitzats han d'operar dins de sistemes d'incubació per tal de

mantenir la temperatura i una certa humitat per tal d'evitar l'evaporació del líquid.

- Dins aquesta categoria trobem els Erlenmeyers agitats mitjançant plaques orbitals, que han estat emprats de fa dècades per al creixement de diversos organismes. El seu volum comprèn aproximadament dels 10 a uns 500 mL (Büchs, 2001). En la major part de casos no tenen instrumentació que permeti el seguiment de variables del cultiu, encara que recentment s'han acoblat sistemes de mesura de pH i oxigen dissolt. Tot i que originàriament el material de construcció era pràcticament únicament vidre, actualment també n'hi ha de plàstic d'un sol ús.
 - Spin tubes. Una altra alternativa que ha estat emprada per a augmentar la capacitat experimental del concepte dels Erlenmeyers són els tubs de centrífuga. A aquests se'ls afegeix filtres a la seva tapa superior per tal de facilitar l'aeració i plaques orbitals sota seu per tal de mantenir les cèl·lules suspensió. Tot i els intents de correlacionar la seva funcionalitat amb la de bioreactors de major volum, no s'han emprat aquests sistemes amb instrumentació que permeti conèixer quines són les condicions de pH, oxigen dissolt, ni seguir de forma automàtica el creixement (Stettler, 2007).
 - Plaques multipou. Les plaques multipou estan disponibles en formats de 6-12-24-48-96-384 pous (en alguns casos, n'hi ha de fins a 3456 pous). Per a ser emprades com a sistemes de micro o minibioreactors són acoblades a plaques d'agitació orbital, dins sistemes atemperats, i poden incloure diferents tipus d'instrumentació per al seguiment no invasiu de determinades variables (veure sistemes Bioscreen C MBR i Das Gip Biolector, presentats més endavant en l'anàlisi de productes comercials). Una de les limitacions d'aquests sistemes és la pèrdua de volum de líquid per evaporació, que per a ser reduïda ha portat a la utilització de membranes a la part superior de les plaques de microbioreactors (Zimmermann i Col., 2003), i també la incapacitat de tenir volums de mostra suficients per a fer determinats anàlisis.
- Sistemes agitats internament, mitjançant pèndols o eixos d'agitació incorporats en els minibioreactors. Els sistemes que han constituït la base de disseny per als minibioreactors d'aquesta categoria han estat els flascons agitats (*spinner flasks*). Aquests estan fabricats en vidre o en diferents materials plàstics d'un sol ús. En aquests recentment s'han incorporat sistemes de mesura de pH, oxigen dissolt, i en alguns casos també han incorporat un cert grau d'automatització, essent

comercialitzats com a sistemes de múltiples minibioreactors (Das Gip, Alemanya), incorporant fins i tot sistemes de mesura del consum d'oxigen. Dins aquesta categoria s'inclouen sistemes que amb la base de disseny de flascons agitats i bioreactors de major volum proposen diferents dissenys per aconseguir minibioreactors de pocs mil·lilitres de volum i prestacions com les de bioreactors de major volum (Bartholomew i Tansey, 2007; Vallejos i Col., 2006; Gill i Col., 2008).

- Microbioreactors basats en tecnologies de fabricació amb *polydimethylsiloxane* (PDMS) i de microfluídica. Aquestes tecnologies han permès obtenir bioreactors de volums tant reduïts com 5 µL, mantenint prestacions com la mesura de pH i oxigen dissolt (mitjançant sensors òptics) i aeració mitjançant membranes permeables a gasos (Zanzotto i Col., 2004). A partir d'aquesta base, s'ha demostrat la capacitat de realitzar cultius en discontinu, discontinu-alimentat i continu (Zhang i Col. 2007), així com la capacitat de construir sistemes de múltiples microbioreactors (Maharbiz i Col., 2004).
- Altres sistemes de cultiu. D'entre altres aproximacions que s'han realitzat per al disseny de sistemes de minibioreactors, es poden destacar els sistemes tubulars amb bombolleig. Aquest tipus de reactors empren el bombolleig de l'aeració com a mitjà d'agitació. Infors HT durant un temps va comercialitzar un equip amb aquest disseny però finalment fou retirat del mercat. Micro-Reactor Technologies també va desenvolupar un sistema basat en aquest concepte, tot i que en aquest cas encaixant amb la definició de sistemes agitats externament. Aquest es comercialitza amb el nom de Micro 24 Bioreactor (veure més endavant, en l'anàlisi de productes comercials). D'altra banda, també cal tenir en compte els desenvolupaments que, basats en els sistemes robotitzats SimCell® (Bioprocessors Corp., Billerica, USA), s'estan realitzant amb la finalitat de realitzar múltiples (fins a 1500) experiments en paral·lel per a realitzar optimització de bioprocessos.



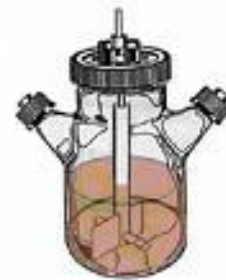
Erlenmeyer



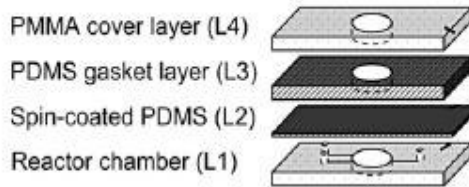
Spin tubes (Sartorius-Stedim)



Placa multipou



Flascó agitad



Microbioreactors (Zhang i Col., 2007)



Sistemes tubulars (Applikon)

Figura 1.8. Imatges de diferents sistemes de minibioreactors.

Pel que fa als sistemes de minibioreactors disponibles a nivell comercial, a continuació es presenta un resum de les seves característiques principals:

- Bioscreen C MBR (Oy Growth curves, Helsinki, Finlàndia) és un sistema per a l'automatització de treball microbiològic, que permet el cultiu en microplaques fins a 200 pous de cultiu, amb una capacitat de 400 μL cadascun. L'equip disposa d'un sistema d'agitació orbital de la placa, control de temperatura i mesura d'absorbància a diferents longituds d'ona. Es dirigeix al cultiu de bacteris i llevats. No hi ha mesura ni control de la concentració d'oxigen dissolt. Les mesures en línia de creixement es realitzen a partir de la terbolesa del medi,

sense donar cap informació addicional sobre l'estat metabòlic del cultiu. A la figura 1.9 es mostra una imatge de l'equip, així com el tipus d'informació obtinguda al realitzar cultius. Concretament les corbes de creixement que es mostren corresponen a cultius de *Salmonella*, dels quals s'estudia els temps de latència després de tractaments tèrmics.

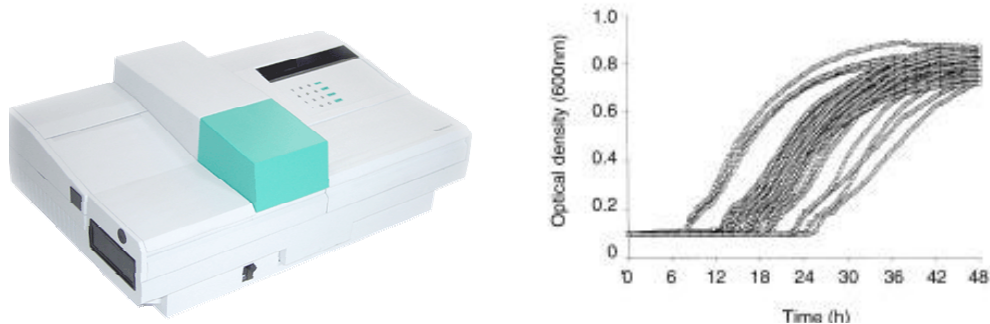


Figura 1.9. A l'esquerra, imatge del sistema de minibioreactors Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves, Finlàndia). A la dreta, corbes de creixement (evolució de l'absorbància a 600 nm en el temps) per a cultius de *Salmonella* obtinguts amb aquest equip. Font: Stephens i Col. (1997), i www.bioscreen.fi

- Cellstation™ (Fluorometrix, USA). El concepte d'aquest producte és d'un sistema de múltiples bioreactors (12 en paral·lel) on es controlen paràmetres com l'agitació, oxigen dissolt i pH, i es segueix l'evolució de la concentració cel·lular a partir de l'absorbància. En aquest cas, no són d'un sol ús i, per tant, requereixen neteja i esterilització en cada ús. A la figura 1.10 es mostra una imatge de l'equip, així com el tipus d'informació obtinguda al realitzar cultius. En aquest cas, es mostren les corbes de seguiment per a un cultiu de *Escherichia coli* realitzades durant la validació tecnològica del sistema, on es segueix l'evolució del cultiu mitjançant l'absorbància a 600 nm, el seguiment del pH (que mostra una basificació progressiva fins que aquesta s'estabilitza quan el cultiu arriba a un *plateau* de creixement), i de l'oxigen dissolt que en aquest cas evidencia limitacions en el sistema d'aeració.

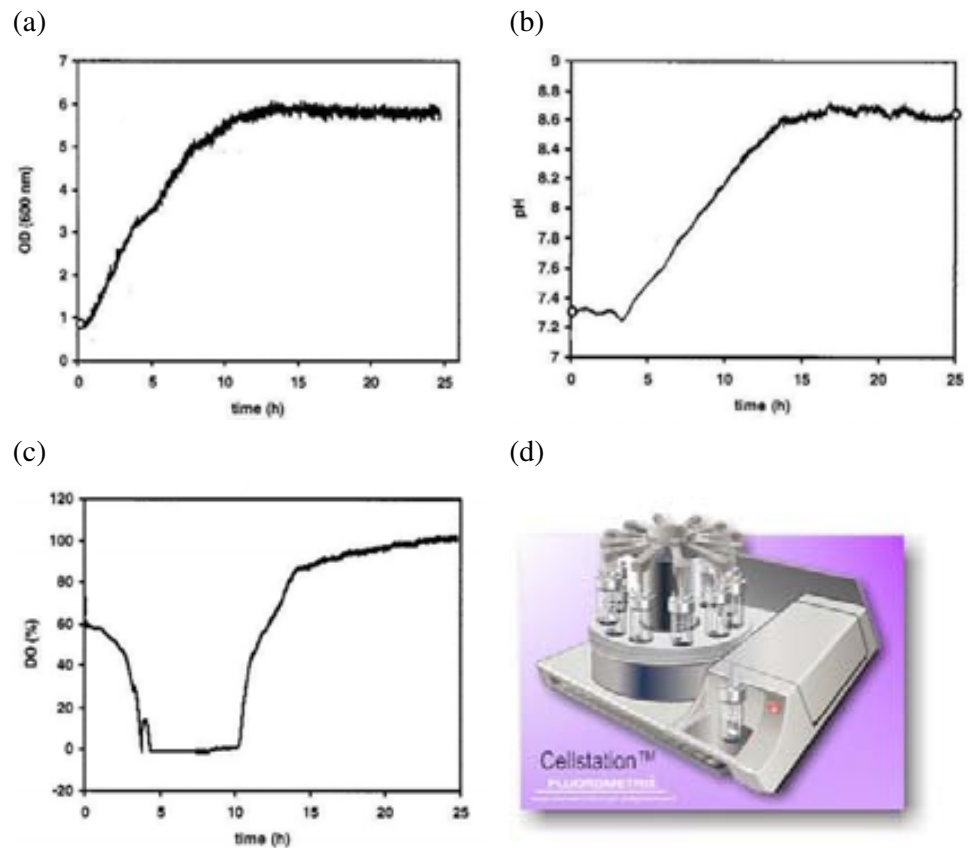


Figura 1.10. (a) Evolució temporal de l'absorbància (OD) a 600 nm, (b) evolució temporal del pH, (c) evolució temporal de l'oxigen dissolt, i (d) imatge del sistema de minibioreactors CellstationTM (Fluorometrix, USA). Font: Kostov i Col. (2001), i www.fluorometrix.com.

- Micro 24 Bioreactor[®] (MicroReactor Technologies, Mountain View, USA; actualment part de Pall Life Sciences). Sistema amb 24 minibioreactors que poden operar en paral·lel, amb capacitat de controlar diferents temperatures a cadascuna de les posicions. El conjunt de minibioreactors està inclòs en una placa d'un sol ús, que s'agita mitjançant una placa agitadora externa que es mou juntament amb els minibioreactors. Cadascun d'ells té uns 10 mL de volum, de forma tubular, efectuant-se l'aeració a través de membranes permeables a gasos. El seguiment de pH i d'oxigen dissolt es du a terme mitjançant membranes amb fluoròfors incorporats. A la figura 1.11 es mostra una imatge de l'equip, així com el tipus d'informació obtinguda al realitzar cultius. En aquest cas, es mostren les corbes de seguiment per a 24 cultius a una única condició amb cèl·lules de CHO, on es monitoritza l'oxigen dissolt i l'evolució del pH.

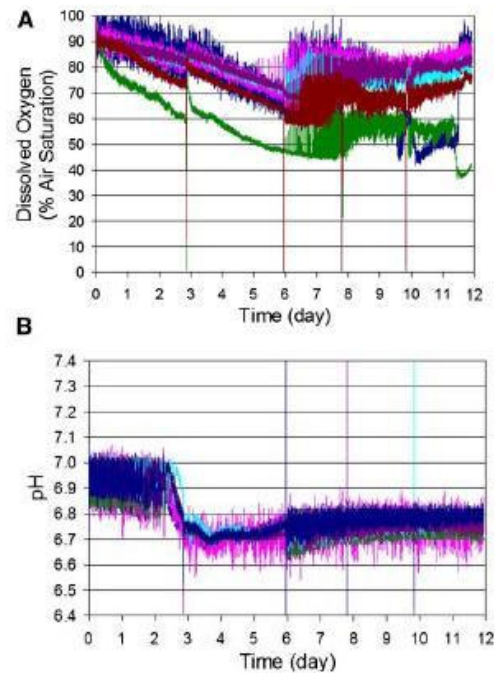


Figura 1.11. A l'esquerra, imatge del sistema de minibioreactors Micro 24 Bioreactor[®] (MicroReactor Technologies, Mountain View, USA). A la dreta, corbes de seguiment per a 24 cultius de CHO a les mateixes condicions. A dalt seguiment de l'oxigen dissolt (dissolved oxygen) en el temps, i a baix, seguiment de l'evolució del pH en el temps. Font: Chen i Col. (2009) i www.applikon-bio.com (nota: Applikon ha estat el distribuïdor de l'equip durant els darrers anys fins a l'adquisició de l'empresa per part de Pall).

- Biolector[®] (m2p-labs, Aachen, Alemanya). En aquest cas es tracta d'un lector de plaques multipou, amb capacitat per allotjar plaques de 48 i 96 pous. L'agitació és realitzada mitjançant placa agitadora orbital situada sota els minibioreactors que es mou juntament amb aquests. L'equip té la capacitat de seguir, individualment per cada minibioreactor, pH, oxigen dissolt i absorbància. A la figura 1.12 es mostra una imatge de l'equip, així com el tipus d'informació obtinguda al realitzar cultius. En aquest cas es mostren les corbes de creixement per a 96 clons diferents de *Hansenula polymorpha* (es segueix la terbolesa a partir de la llum dispersada), així com la producció de GFP (s'empra el canal de mesura de fluorescència, que alternativament pot ser utilitzat per a seguir o l'oxigen dissolt o el pH).

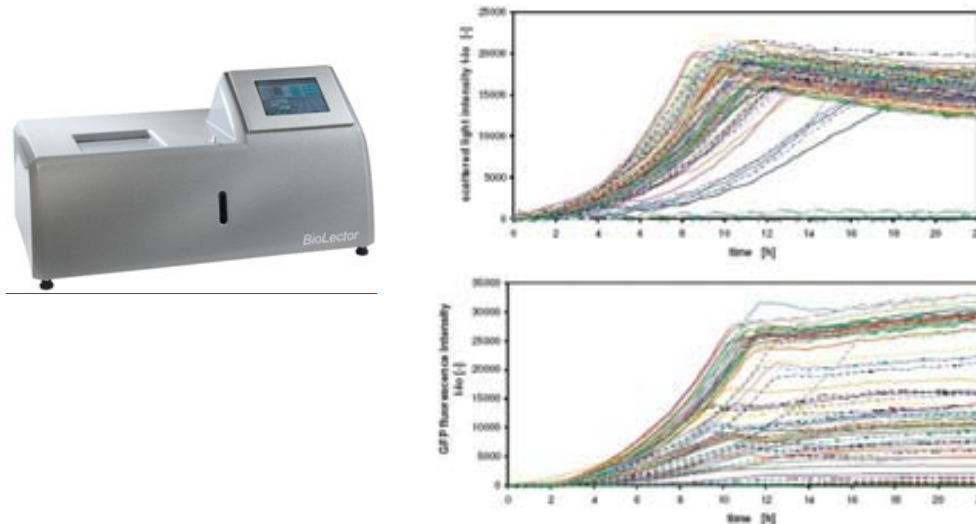


Figura 1.12. A l'esquerra, imatge del sistema de minibioreactors Biolector (m2p-labs, Aachen, Alemanya). A la dreta, corbes de creixement de *Hansenula polymorpha* seguint a dalt el creixement dels cultius per la terbolesa de la suspensió cel·lular (scattered light intensity) i a baix, emprant el canal de mesura de fluorescència que pot ser emprat per a seguir el pH o l'oxigen dissolt, per a seguir l'expressió de green fluorescent protein. Font: www.dasgip.com (distribuïdor actual equip).

A continuació es presenta una taula (1.1) per tal de resumir i comparar les prestacions dels sistemes de minibioreactors comercials, emmarcats entre els sistemes habitualment emprats al laboratori (plaques multipou i reactors 500 mL – 5 L), que parcialment poden substituir per a augmentar-ne la capacitat i reproduïbilitat.

Prestacions / Producte	Agitació	Aeració	Nº bioreactors	Volum (mL)	Seguiment variables	Un sol ús	Preu (€)
Plaques multipou	NO	NO	6-96	0.01-3	NO	SI	2-5€
Bioscreen C MBR	SI ²	NO	200	0,4	absorbància	SI	30.000 màquina
Micro Bioreactor	SI ²	SI	24	10	pH, [O ₂]	SI	>80.000 màquina
Biolector®	SI ¹	NO	48-96	0,01-0,1	absorbància, pH, [O ₂]	SI	NA
Cellstation™	SI ¹	SI	12	35	absorbància, pH, [CO ₂], [O ₂]	NO	80.000-125.000
Bioreactors 500 mL - 5 L	SI ¹	SI	1	2000-5000	pH, [O ₂]	NO	40.000-50.000

Taula 1.1. Comparativa dels diferents sistemes de minibioreactors, i dels que aquests substituirien parcialment. Els superíndexs mostrats en agitació corresponen a: 1. Agitació mitjançant plaques agitadores externes que es mouen juntament amb els minibioreactors, i 2. Agitació mitjançant sistemes incorporats i autocontinguts en els minibioreactors.

1.3.3. Proposta d'un sistema de múltiples minibioreactors per als cribats en el desenvolupament de bioprocessos

De la comparació entre les característiques dels equips existents, i les que s'han identificat com a desitjables, es considera que cap d'ells les aconsegueix de forma completa, essent aquest el punt de partida per a proposar el desenvolupament d'un nou equip.

El sistema de múltiples minibioreactors proposat planteja un rang de treball d'uns 10-15 mL, volum entre els dels sistemes basats en plaques multipou (< 1 mL de capacitat), i dels reactors d'escala de laboratori (500 mL - 5 L). Aquest rang de volum ha de permetre emprar sistemes d'agitació autocontinguts en els bioreactors, que no poden ser utilitzats en sistemes de menor volum, que utilitzen plaques orbitals que es mouen juntament amb els bioreactors.

Pel que es refereix al nombre de minibioreactors, es desitja tenir com a base 6 minibioreactors, però el disseny de l'equip haurà de permetre operar de forma conjunta diferents equips, obtenint un nombre total de minibioreactors múltiple de 6. D'aquesta manera un sol equip, o un conjunt reduït d'equips pot permetre realitzar un nombre considerable d'experiments, i fer-ne un tractament estadístic.

També s'ha cregut convenient, degut a la major facilitat d'ús que suposa, que el sistema consti d'una estació de treball fixe, on s'incorporin les sondes, components òptics, elèctrics i mecànics, i d'una part d'un sol ús corresponent als bioreactors Així, es proposa que les plaques de minibioreactors siguin fabricades en plàstic biocompatible, i que siguin emprades com a components d'un sol ús. Això permetrà estalviar en temps morts dedicats a neteges i esterilitzacions, i també resultarà d'un gran interès per a aplicacions farmacèutiques i mèdiques que segueixin normatives de qualitat amb requeriments elevats.

L'equip haurà de permetre la realització de cultius de múltiples models cel·lulars a condicions reproduïbles, havent-hi una monitorització del creixement dels cultius, així com seguiment/control de les variables físico-químiques que es considerin claus.

Finalment, per a que el sistema resulti interessant tant per a l'optimització de cultius com per al cribat de compostos serà necessari que a banda de que es puguin realitzar múltiples cultius en paral·lel i que es realitzi un seguiment del creixement i activitat dels cultius, es tingui en compte l'automatització del treball amb el sistema, així com

l'adquisició de dades. La desaparició del requeriment de mostreig manual permetrà una major automatització dels experiments i una reducció en costos de ma d'obra.

1.4. Etapes necessàries en el desenvolupament d'equips de laboratori

Una vegada identificada la proposta general del sistema de múltiples minibioreactors que es pretén desenvolupar, cal tenir en compte que per passar de la idea a un equip que pugui ser emprat a qualsevol laboratori de cultiu són necessaris una sèrie de passos, alguns dels quals es cobriran en el marc d'aquest treball de tesi doctoral. A la figura 1.13 es presenta de forma simplificada una generalització dels passos necessaris per a completar el desenvolupament d'un equip de laboratori, i a continuació es realitza una descripció d'aquests, particularitzant com ha estat la seva execució en el projecte presentat i la seva ubicació en la memòria d'aquest treball.

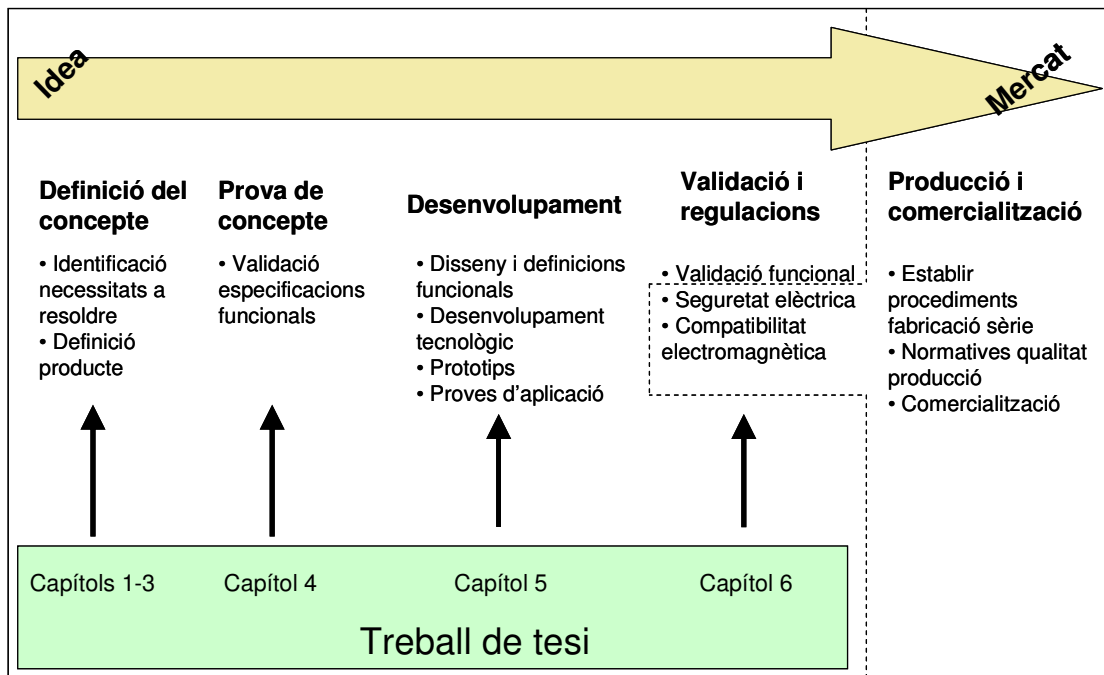


Figura 1.13. Passos necessaris per a completar el desenvolupament d'un equip de laboratori. A la part inferior de la figura, es mostren els capítols del treball de tesi en els quals es tracta cadascun dels conceptes. Els passos que queden a la dreta de la línia discontinua són aquells que no han estat abordats en el treball presentat.

Una vegada detectada la necessitat a la qual es vol donar resposta, el primer element a treballar per a iniciar un projecte de desenvolupament d'un producte és la seva definició

acurada (aquest aspecte es tracta al capítol 3). En el cas d'aquest treball, la definició de producte l'ha realitzada internament l'equip del projecte, mantenint una composició multidisciplinària per a permetre una visió prou àmplia de totes les etapes de desenvolupament que haurà de superar el producte proposat. Concretant, l'equip ha estat compost per enginyers electrònics (UPC), enginyers químics i biòlegs (UAB), enginyers industrials i economistes (ASCAMM). De forma general cal fer esment a que en cas que s'identifiquin elements d'innovació tecnològica importants dins la proposta elaborada, cal valorar l'interès de sol·licitar la corresponent patent per a poder explotar i protegir els futurs resultats del projecte.

Una vegada realitzada la conceptualització de producte, aquesta s'ha de sotmetre a un filtre que permeti validar la proposta realitzada i realitzar els ajustos que es creguin necessaris. D'una banda, és necessari contrastar la idea amb usuaris potencials, mitjançant reunions amb profunditat, o bé presentacions a grups d'usuaris als quals s'interpel·larà per tal que la seva opinió. Dins la investigació de mercat, aquesta etapa correspon a l'etapa d'investigació qualitativa, on els usuaris valoren de forma general les idees presentades i s'intenta que aportin idees pròpies que permetin identificar errades de concepte, o bé oblitats en la definició de prestacions (Ortega Martínez, 1992). En etapes posteriors d'investigació de mercat és més habitual emprar tècniques quantitatives (les més habituals de les quals són les enquestes) per tal de quantificar la importància de les característiques de producte i el posicionament comparatiu respecte altres productes presents al mercat. D'altra banda, i en paral·lel amb la validació de la idea per part de potencials usuaris, pot ser interessant, tot i que no en tots els casos, validar la funcionalitat de les especificacions fixades. Així, amb tecnologia convencional es poden realitzar experiments que mostrin la validesa de hipòtesis realitzades.

En aquest treball es presenta una validació de l'enfocament tecnològic que s'ha donat al producte (veure capítol 4), amb la finalitat de contrastar si les estratègies de monitorització preseleccionades mostraven la seva validesa a fi de seguir els paràmetres físico-químics principals, creixement i metabolisme dels cultius. En aquest treball no es presenten els resultats de la investigació de mercat, ja que aquestes tasques formen part d'un projecte de caire empresarial.

Una vegada validat el concepte de producte i seleccionades les funcionalitats desitjades es procedeix a les etapes de desenvolupament. En un context tecnològic com el que emmarca aquest projecte, les etapes de desenvolupament són aquelles que de forma general requereixen més temps. Addicionalment cal tenir en compte que tot i que s'estableixin acurats mecanismes de gestió i control del projecte, a mesura que es desitja

desenvolupar més tecnologia pròpia, major és el risc que s'acumulin endarreriments en l'execució del projecte. Conseqüentment, és important escollir quins són els desenvolupaments clau que el projecte haurà d'abordar internament, i quins podran ser evitats, essent substituïts per la integració de tecnologia externa. En aquest treball, els dissenys i desenvolupaments dels diferents elements del sistema de minibioreactors es presenten al capítol 5. Una vegada seleccionats els sistemes de mesura per a permetre el seguiment de les principals variables físico-químiques, creixement i metabolisme dels cultius (capítol 4), en aquest capítol es realitza una selecció acurada del tipus de tecnologia a emprar. Un dels principals elements que s'ha tingut en compte ha estat la dimensió dels minibioreactors. Al tractar-se de sistemes miniaturitzats, no ha estat possible emprar les tecnologies habituals en bioreactors de majors dimensions, sinó que les limitacions d'espai i la necessitat de múltiples canals de mesura ha forçat un disseny personalitzat.

Completada l'etapa de desenvolupament, prèvia la possible entrada dels equips al mercat, és necessària la realització de tasques de validació, comprovant la conformitat respecte a les normes existents, i industrialitzant processos de producció i qualitat. D'entre aquestes tasques, en aquest treball es presenten les tasques de validació funcional en cultius (capítol 6). Les altres tasques comentades novament serien part d'un projecte empresarial. Referent a les tasques de validació, és necessari comprovar que el funcionament dels prototips construïts compleix la funcionalitat per la qual han estat dissenyats. D'entrada cal realitzar proves internes, i superades aquestes, també serà necessari realitzar-ne en les instal·lacions d'usuaris potencials (*β -tests*). Tot i que no formin part d'aquesta memòria cal fer esment que, també des del punt de vista funcional, dins la etapa de validació poden englobar-se les tasques d'assegurament del compliment dels requeriments normatius de l'àmbit d'aplicació on han de ser utilitzats els aparells. Com a requeriments bàsics existeixen els de conformitat a les normatives de seguretat elèctrica i compatibilitat electromagnètica, i depenent de l'aplicació (equips a pressió, equips de diagnòstic, etc.), hi haurà requeriments addicionals.

En paral·lel a la validació, cal establir els procediments de fabricació per tal d'evolucionar des de les etapes inicials de fabricació de prototips fins a processos de producció seriada, amb control de components i proveïdors, protocols de fabricació normalitzats, i qualitat de producte constant. Com s'ha comentat anteriorment, tant les tasques de validació externes, com la comprovació de conformitat a normes existents, i industrialització dels processos de producció i qualitat no formen part del treball presentat.

NOMENCLATURA

Abreviatura

Descripció

A	Acumulació
Abs	Absorbància
ABS	<i>Acrylonitrile/Butadiene/Styrene</i> , material termoplàstic per al prototipatge ràpid
CHO	Cèl·lules de <i>Chinese Hamster Ovary</i>
C_{elec}	Concentració d'analit al si de l'electrolit
$C_{elec,i}$	Concentració d'analit a la interfície membrana-electrolit
C_L	Concentració d'analit al si del medi de cultiu
$C_{L,i}$	Concentració d'analit a la interfície medi-membrana
C_{mes}	Concentració d'analit mesurada per la sonda
$[CO_2]$	concentració de diòxid de carboni dissolt
CFR	<i>Code of Federal Regulations</i>
DO	<i>Dissolved Oxygen</i> (emprat en figures d'altres treballs presentades com a referència)
DMEM	Medi de cultiu <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
E	Entrada
f_0	frequència de màxima interferència de l'oxigen en el temps de vida del fluoròfor
FBS	<i>Foetal Bovine Serum</i>
FCS	<i>Foetal Calf Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i>
FPM	Elastòmer fluorocarbònic
G	Generació
GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
GPSS	<i>General Purpose Polystyrene</i>
HEK293	Cèl·lules de <i>Human Embryonic Kidney 293</i>
I_0	Intensitat de llum de fluorescència emesa en absència d'oxigen
I	Intensitat de llum de fluorescència emesa en una presència determinada d'oxigen
I_L	intensitat lumínica mesurada per l'espectrofotòmetre
$I_{L,0}$	intensitat lumínica mesurada per l'espectrofotòmetre del blanc
$I_{L,negre}$	intensitat lumínica mesurada per l'espectrofotòmetre amb la llum apagada
K_{des}	constant de desorció de l'oxigen dissolt
$K_{L,a}$	constant de transferència de l'oxigen dissolt
k_q	Constant de velocitat de desactivació que depèn de les constants físiques del sistema
LB	Medi de cultiu <i>Luria Bertani</i>
M9	Medi mínim per al cultiu de <i>Escherichia coli</i>
$N_2 P$	paràmetre proporcional del controlador d'oxigen dissolt assignat al pas de nitrogen-5% CO_2

[O ₂]	concentració d'oxigen dissolt
[O ₂ *]	concentració d'oxigen dissolt en equilibri amb l'atmosfera del capçal del minibioreactor
[O _{2,mes}]	Concentració d'oxigen dissolt mesurada
O ₂ P	Paràmetre proporcional del controlador d'oxigen dissolt assignat al pas d'aire-5% CO ₂
OD	<i>Optical Density</i> (emprat en figures d'altres treballs presentades com a referència)
OUR	<i>Oxygen Uptake Rate</i>
pO ₂	Oxigen dissolt (emprat en figures d'altres treballs presentades com a referència)
PBS	Solució salina <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDMS	<i>Polydimethylsiloxane</i>
PEI	PoliEterImida
pK _i	Constant d'equilibri àcid-base
PMMA	PoliMetilMetacrilat
PS	<i>PolyStyrene</i>
PVC	<i>PolyVinyl Chloride</i>
q _{O2}	Consum específic d'oxigen
S	Sortida
t	Temps
t O ₂ min	Paràmetre del controlador d'oxigen dissolt. Temps de pas mínim d'aire-5% CO ₂
t O ₂ max	Paràmetre del controlador d'oxigen dissolt. Temps de pas màxim d'aire-5% CO ₂
t N ₂ min	Paràmetre del controlador d'oxigen dissolt. Temps de pas mínim de nitrogen-5% CO ₂
t N ₂ max	Paràmetre del controlador d'oxigen dissolt. Temps de pas màxim de nitrogen-5% CO ₂
T	Temperatura
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
X	Concentració cel·lular
X _v	Concentració de cèl·lules viables
X _d	Concentració de cèl·lules no viables
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Medi de cultiu <i>Yeast Peptone Dextrose</i>
Y _{x/o}	Rendiment biomassa / oxigen
τ	Temps de resposta de la sonda d'oxigen dissolt
τ _F	Temps de vida del fluoròfor
τ _{F,0}	Temps de vida del fluoròfor en absència d'oxigen
μ	Velocitat de creixement
φ	fase mesurada de l'ona emesa pel fluoròfor de mesura d'oxigen dissolt

L'objectiu principal d'aquest treball és desenvolupament d'un sistema de múltiples minibioreactors que permeti agilitzar el desenvolupament i optimització de bioprocessos, així com reduir els fracassos en aquestes tasques degut a la manca de seguiment de les variables del procés.

La filosofia que es desitja incorporar al sistema de minibioreactors contempla que aquests tinguin una escala petita (10-15 mL) comparada amb els bioreactors que s'utilitzen habitualment per al desenvolupament de bioprocessos (500 mL – 5 L), però no massa com per a perdre les capacitats de control sobre les variables del procés (agitació, pH, temperatura, oxigen dissolt). El sistema de cultiu haurà de poder realitzar el seguiment d'uns determinats paràmetres per tal que s'hi puguin aplicar diferents models cel·lulars i es pugui obtenir informació interessant sobre el seu comportament i estat.

Els requeriments generals que haurà d'acomplir el sistema de cultiu a desenvolupar són:

- Permetre l'estudi de nous organismes i molècules de forma fiable, simple, automatitzada i amb una gran capacitat de treball.
- Permetre l'experimentació a petita escala mantenint unes condicions de cultiu monitoritzades i controlades, minimitzant la quantitat de reactius a utilitzar.
- Permetre el seguiment de l'activitat biològica d'interès mitjançant diferents tipus de mesures.
- Permetre la realització de múltiples experiments en paral·lel sense necessitat de realitzar mostreig manual, minimitzant els requeriments de mà d'obra.

I els requeriments específics:

- Permetre la monitorització i control de variables de procés crítiques per al funcionament d'aquest. Per al cas del creixement de microorganismes o cultius cel·lulars, els paràmetres a monitoritzar/controlar seran l'oxigen dissolt, el pH, l'agitació i la temperatura.
- Permetre el creixement de diferents tipus de microorganismes i cultius cel·lulars en múltiples condicions. La temperatura s'haurà de poder mantenir entre 28-37 °C (aproximadament), l'agitació haurà de mantenir homogeni el contingut del minibioreactor, i el cabal d'oxigen/nitrogen haurà de ser suficient per mantenir condicions entre el 0-100% d'oxigen dissolt.

- Permetre la monitorització en línia del creixement i activitat metabòlica de diferents microorganismes mitjançant diferents tecnologies.

2. OBJECTIUS

3. DEFINICIÓ DEL SISTEMA DE CULTIU

Tal com s'ha descrit a la introducció, una vegada identificades les necessitats a resoldre i realitzat un primer enfocament sobre el sistema de múltiples minibioreactors a desenvolupar, en aquest capítol es treballarà a fons la definició de producte, fins assolir unes especificacions de disseny prou detallades com per iniciar les tasques de desenvolupament (per a una millor ubicació d'aquest capítol en les etapes de desenvolupament d'equipament veure la figura 1.13).

La primera de les consideracions a realitzar per a conceptualitzar el sistema a desenvolupar es refereix de forma general a l'àrea d'activitat on aquest donarà servei: la biotecnologia. L'element central de les activitats compreses en aquesta àrea és el biocatalitzador. Si bé en aquest treball es pretén desenvolupar un sistema de minibioreactors, cal tenir en compte que cada cèl·lula també es comporta com un reactor individual, catalitzant substrats i produint noves cèl·lules, productes, subproductes (essent alguns d'aquests àcids i bases), CO₂ i aigua. El seguiment cinètic de l'evolució dels paràmetres cel·lulars, ja siguin les pròpies cèl·lules o bé els seus substrats/productes/subproductes és el que permet determinar les característiques de cada catalitzador, i permetre l'elecció i desenvolupament dels bioprocessos basats en aquest catalitzador.

3.1. Mesures necessàries

Prèviament a seleccionar quines eines de monitorització requerirà el sistema de múltiples minibioreactors per a realitzar el seguiment dels cultius que s'hi realitzin, és interessant analitzar un gràfic de creixement per intentar identificar l'origen de l'interès de seguiment al qual s'haurà de donar resposta.

Observant una corba de creixement per a una línia cel·lular d'hibridoma (veure figura 3.1) que ens mostra l'evolució de la concentració cel·lular en funció del substrat limitant, veiem que una vegada s'assoleix un exhauriment del substrat limitant, el cultiu atura el seu creixement i s'inicien els processos de mort del cultiu, reduint-se ràpidament la concentració de cèl·lules viables.

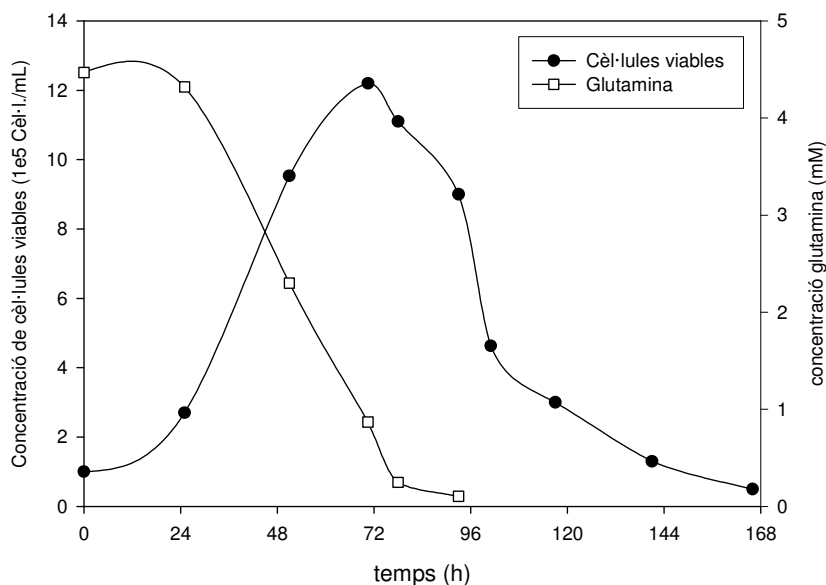


Figura 3.1. Exemple de l'evolució de la concentració de cèl·lules viables i del substrat limitant (glutamina) per a un cultiu d'hibridoma. Font: Sanfeliu (1995).

Tal com es mostra en aquesta gràfica, i com també succeeix de forma general en el camp dels cultius, les dades de seguiment del creixement són la base de la caracterització dels cultius, i permeten establir els límits d'aquests en unes determinades condicions. Així doncs, en el sistema de minibioreactors a desenvolupar es considera interessant incorporar una mesura que permeti seguir el creixement del cultiu.

Si bé les mesures de creixement permeten obtenir una caracterització inicial del cultiu, no permeten conèixer quines són les limitacions que fan que el creixement s'aturi en un determinat punt (en el cas de la figura 3.1, l'aturada era deguda a l'exhauriment d'un dels nutrients, la glutamina). I precisament en el desenvolupament i optimització de bioprocessos una de les tasques essencials és la detecció de les limitacions dels cultius, necessària per poder presentar propostes de millora per a obtenir majors concentracions cel·lulars i productivitats. Així doncs, és d'especial interès que els sistemes de minibioreactors a desenvolupar permetin aquesta identificació en paral·lel al seguiment de l'evolució de la concentració cel·lular, principal indicador del creixement del cultiu.

Referent a les possibles limitacions, d'una banda caldrà identificar si aquestes són de tipus cinètic, degudes a paràmetres del procés (temperatura, pH) o bé degudes a l'estequiometria dels substrats (font de carboni, nitrogen, fòsfor, oxigen). Per tal que el sistema de minibioreactors a desenvolupar permeti la identificació de les limitacions, caldrà que els paràmetres mesurats siguin d'una banda els de procés (temperatura, pH), i d'altra banda, tot i la dificultat de mesurar de forma directa la limitació dels diferents

nutrients, donada la seva àmplia variabilitat, caldrà incorporar mesures que permetin la seva identificació.

A cavall de les mesures de procés i de substrats, es troba el cas de l'oxigen dissolt, que es pot considerar una variable de procés, ja que més enllà de la seva disponibilitat en el medi de cultiu, també pot controlar-se la seva concentració al voltant de determinades consignes, per tal de tenir una cinètica determinada. Donada la baixa solubilitat de l'oxigen en els medis de cultiu, aquest és un nutrient que, si no hi ha un sistema d'aeració que garanteixi una elevada transferència, habitualment presenta limitacions, de manera que serà d'elevat interès disposar de sistemes que en permetin el seguiment per tal de conèixer si aquestes limitacions existiran o no.

A la figura 3.2 es presenta un exemple bibliogràfic (Vasala i Col., 2006) del seguiment de l'oxigen dissolt en un cultiu de *Escherichia coli* en un Erlenmeyer amb agitació orbital sense cap sistema d'aeració addicional més enllà de l'agitació orbital. A la figura s'observa que ràpidament (aproximadament a les 5 h de cultiu) s'arriba a una limitació d'oxigen dissolt que condueix a una aturada en el creixement. Així doncs, donades les elevades probabilitats de que ens els cultius s'assoleixin concentracions d'oxigen dissolt limitants, i que el desconeixement d'aquestes pugui donar lloc a diferències metabòliques que no puguin ser reproduïdes en etapes d'escalat posteriors, es desitja també que el sistema de minibioreactors a desenvolupar incorpori tecnologies de mesura d'aquesta variable.

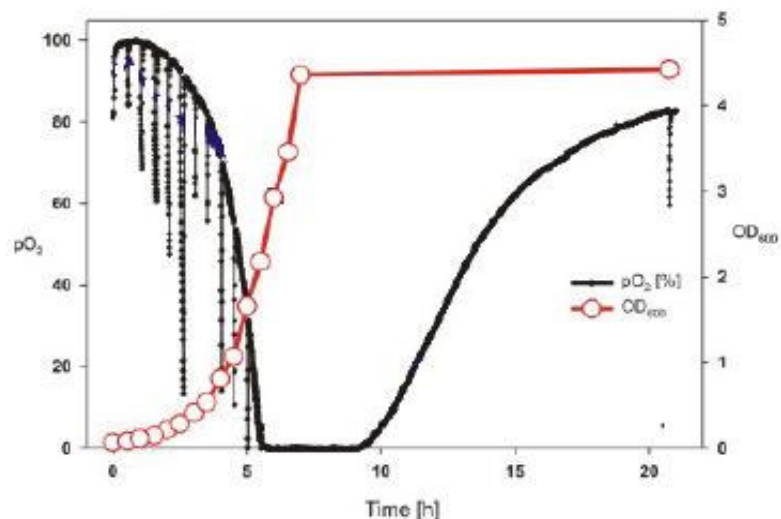


Figura 3.2. Seguiment de la concentració cel·lular (a la figura OD_{600}) i l'oxigen dissolt (pO_2) en un cultiu de *Escherichia coli* en un Erlenmeyer amb agitació orbital. Font: Vasala i Col. (2006).

Entre les tres mesures seleccionades fins aquests moments (temperatura, pH i oxigen dissolt) cal esmentar diferències existents entre si, ja que mentre d'una banda es desitja que es pugui realitzar un seguiment i un potencial control sobre l'oxigen dissolt i el pH individual per a cada minibioreactor, s'estableix com a variable de disseny que la temperatura sigui comú per a cada placa de 6 minibioreactors. Aquesta decisió es fonamenta en el fet que en les etapes d'experimentació inicials del desenvolupament del bioprocés, la temperatura acostuma a ésser un paràmetre fixat, i només en les etapes finals, on està molt més acotat el clon i medi que s'utilitzaran, es realitza un nombre d'experiments molt més limitat (comparat amb l'experimentació anterior) estudiant com afecta la variació de la temperatura a la productivitat.

Seguint en les possibles limitacions degudes a paràmetres de procés, cal tenir en compte que a banda de disposar de les mesures comentades, cal assegurar la no existència de gradients que podrien provocar limitacions no detectades. Així doncs, caldrà dotar al sistema d'elements d'agitació per tal de mantenir homogeneïtat la fase líquida del bioreactor. Tal com en el cas de la temperatura, aquest serà un paràmetre comú per als sis minibioreactors.

D'altra banda, la identificació de les possibles limitacions de creixement/producció degudes a l'estequiometria dels nutrients en el medi de cultiu (altres que no siguin l'oxigen) presenta dificultats per a que puguin ser mesurades de forma directa i sense necessitat d'extreure mostres fora de línia. En cas que es desitgés detectar tots els possibles substrats limitants, la complexitat del sistema s'incrementaria de forma exponencial com més informació del cultiu es volgués subministrar a l'usuari. Donada la impossibilitat i inviabilitat d'incloure totes les mesures que utilitzen els nombrosos sistemes d'experimentació amb diferents models cel·lulars, s'ha de cercar un sistema de seguiment senzill, que de forma indirecta permeti identificar possibles limitacions a partir d'indicadors metabòlics.

Per a discutir quins podrien ser aquests indicadors, novament es presenten dades (figura 3.3) d'un cultiu bibliogràfic (Kensy i Col., 2005) d'*Escherichia coli* amb seguiments derivats dels paràmetres de procés dels quals ja es disposa (concretament de l'oxigen dissolt i del pH). Tot i que les dades de creixement no es mostren a la figura, aquest ha mostrat un comportament exponencial fins aproximadament les 4 h de cultiu, quan un exhauriment de nutrients porta a una frenada pronunciada del creixement. Els seguiments del pH i oxigen dissolt durant el cultiu (figura 3.3) mostren que mentre hi ha creixement exponencial es produeix un canvi del pH, en aquest cas una basificació deguda a la desaminació d'aminoàcids i pèptids, que es veu frenada una vegada es redueix el creixement.

Pel que fa al comportament de l'oxigen dissolt, si el cultiu s'alimenta amb una determinada carència d'aeració, a mesura que augmenta la concentració cel·lular, l'oxigen dissolt disponible al medi té la tendència a reduir-se, degut al major consum del cultiu. Una vegada s'assoleix una limitació en el medi, la concentració d'oxigen dissolt torna a augmentar degut a la reducció de l'activitat metabòlica del cultiu.

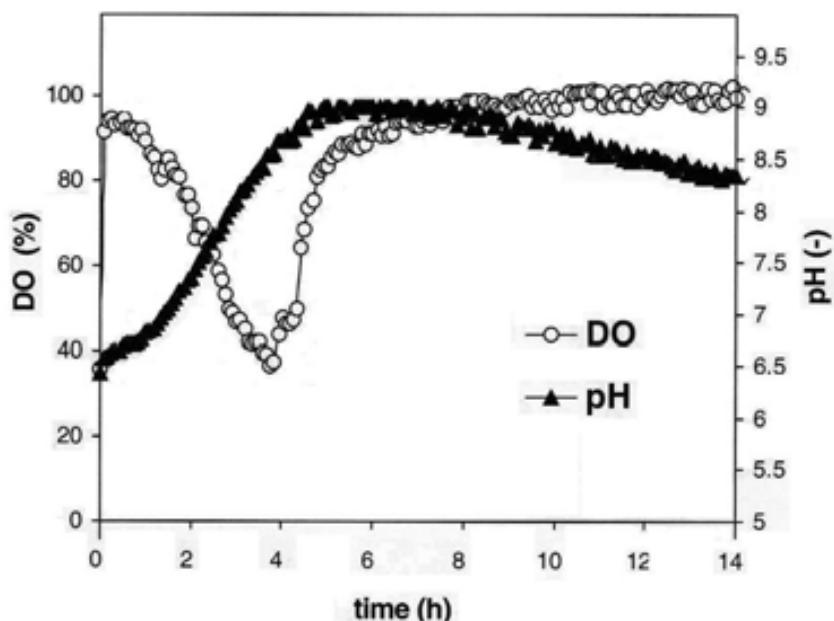


Figura 3.3. Evolució de l'oxigen dissolt (DO) i el pH en el temps (time) en un cultiu de *Escherichia coli* en medi LB. Font: Kensy i Col. (2005).

S'ha pogut veure doncs, que com a mínim en el cas presentat, tant l'oxigen dissolt com el pH són mesures que de forma indirecta indiquen els punts en els quals es donen limitacions en el cultiu que impliquen aturades del creixement i canvis metabòlics.

En el cas del pH, cal tenir en compte que, addicionalment, aquesta mesura potencialment no indicarà únicament que s'està donant una frenada en el metabolisme, sinó que pot mostrar canvis en el consum de determinats nutrients, que es podran relacionar amb l'acidificació o basificació del medi.

I en el cas de l'oxigen dissolt, on ja de forma intuïtiva s'observava que a majors consums la concentració d'oxigen es reduïa, i a menors consums la seva concentració augmentava, a la bibliografia es troben diferents sistemes de seguiment del metabolisme de cultius basats en la mesura del consum d'oxigen. Aquests han estat emprats en aplicacions en nombrosos models cel·lulars, des d'aplicacions de depuració

(Vanrolleghem i Col., 1994) a altres amb bacteris (Scheidle i Col., 2007) i cèl·lules animals (Dorresteijn i Col., 1996).

A continuació es presenta una figura bibliogràfica (Gámez, 2000) (figura 3.4) on es mostra la funcionalitat de la mesura del consum d'oxigen (a la figura referida com a *Oxygen Uptake Rate*, OUR), per al seguiment d'un cultiu d'hibridomes. A la figura s'observa que mentre el cultiu creix de forma exponencial, l'increment del consum d'oxigen també segueix aquesta tendència, mentre que quan s'assoleix una limitació en el medi de cultiu (en aquest cas de glutamina), el consum d'oxigen mostra una reducció dràstica. Així doncs, aquest també es mostra com un indicador interessant per detectar possibles limitacions.

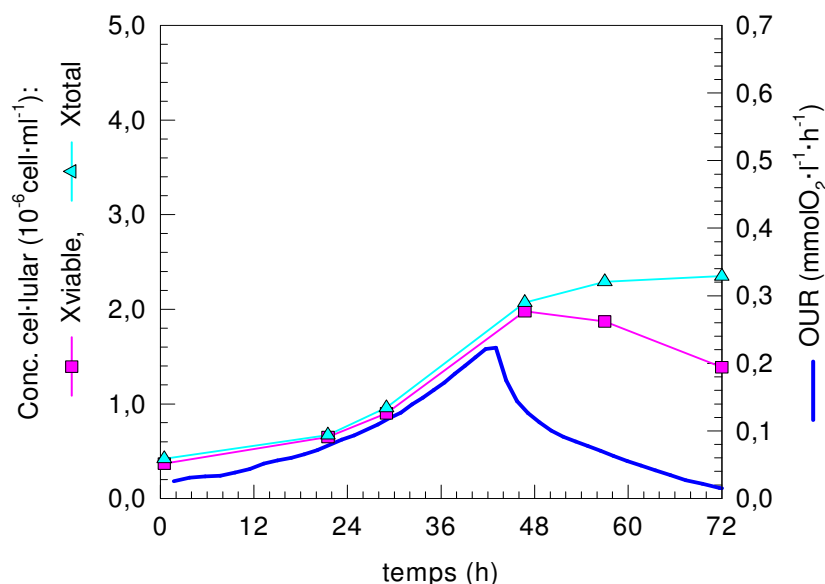


Figura 3.4. Evolució de la concentració de cèl·lules viables (X_{viable}), cèl·lules totals (X_{total}) i del consum d'oxigen (*Oxygen Uptake Rate*, OUR) en un cultiu d'hibridomes. Font: Gámez (2000).

A la vista de la discussió anterior, si a banda de seguir l'evolució de la concentració cel·lular, es desitja que l'equip a desenvolupar tingui un cert grau de seguiment del metabolisme per tal de detectar possibles limitacions, s'opta per un sistema de seguiment que tingui l'evolució del pH i la mesura del consum d'oxigen (implica disposar també de mesures d'oxigen dissolt) com a indicadors del metabolisme.

3.2. Descripció general del sistema

Una vegada definit el nombre de minibioreactors desitjat, el seu volum, la necessitat de sistemes d'agitació, de mantenir una temperatura comú per als sis minibioreactors, i dels sistemes de seguiment necessaris, s'ha realitzat una proposta de disseny preliminar per al sistema de minibioreactors a partir de la qual començar a treballar.

En el sistema a desenvolupar es distingiran dues parts clarament diferenciades:

- **Minibioreactors plàstics d'un sol ús.** El bloc constituït pels sis minibioreactors i el seu bany de termostatació comú, que estaran fabricades en poliestirè cristall (plàstic per a cultiu cel·lular) i seran d'un sol ús. Aquestes es presentaran esterilitzades i tancades en una bossa, de tal manera que el procediment per a omplir-les de medi, inocular-les i connectar-les al sistema no precisi de més utilitatge que una cambra de flux laminar (figura 3.5).

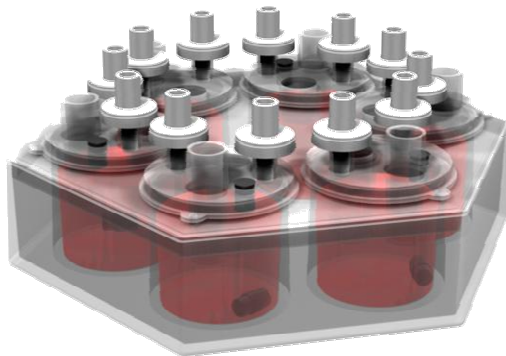


Figura 3.5. Disseny 3D d'una placa de 6 minibioreactors. L'espai remanent entre els minibioreactors és l'emprat per a tenir un bany d'aigua per a mantenir la mateixa temperatura a tots els minibioreactors.

El disseny de cada minibioreactor incorpora els diversos elements per a permetre mantenir les condicions desitjades i obtenir informació en línia sobre el creixement i el metabolisme dels cultius. Tal com es mostra a la figura 3.6, cada minibioreactor disposa d'un agitador (5) per a permetre mantenir el cultiu en suspensió. L'agitador consistirà d'un material imantat, al qual es transferirà l'energia des d'un sistema de bobines exterior que creï un camp magnètic giratori. L'entrada i sortida de gasos es produirà a través de filtres que permetin assegurar l'esterilitat del contingut del bioreactor (2). La base i la tapa mostrades a la figura 3.6 tindran un sistema de clipatge que una vegada els bioreactors s'hagin esterilitzat, no es tornarà a obrir. Així doncs, per a realitzar els inòculs i extreure mostres una vegada finalitzats els cultius, si així es desitja, s'emprarà un sèptum de cautxú flexible, a través del qual es podrà accedir a l'interior dels

minibioreactors mitjançant una xeringa amb una agulla (3). El cautxú emprat com a sèptum haurà de ser prou flexible com per a que l'agulla no deixi cap forat permanent en el material, a través del qual podrien entrar contaminacions. Finalment, referent a les entrades per les sondes de pH, oxigen dissolt i biomassa, en aquest moments es plantegen dues entrades (1,4), però hi hauria espai per a una tercera opcional en cas que aquesta fos necessària. Cal tenir en compte però, que el disseny final dels ports on s'hauran d'ubicar les sondes dependrà de les decisions i resultats obtinguts durant el procés de desenvolupament (capítol 5).

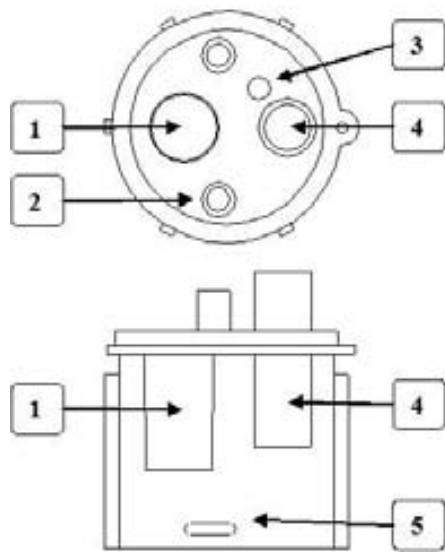


Figura 3.6. Descripció dels elements de cada minibioreactor: 1), 4) ports per sensors de monitorització dels cultius (per a major concreció, veure el capítol de desenvolupament), 2) orificis per a situar els filtres d'entrada i sortida d'aire, 3) sèptum per a la introducció de l'indòcul, 5) agitació magnètica.

- **Estació de treball.** Les plaques de 6 minibioreactors disposaran d'una carcassa externa que allotjarà la placa de minibioreactors i inclourà el sistema de monitorització i control (veure disseny 3D a la figura 3.7).

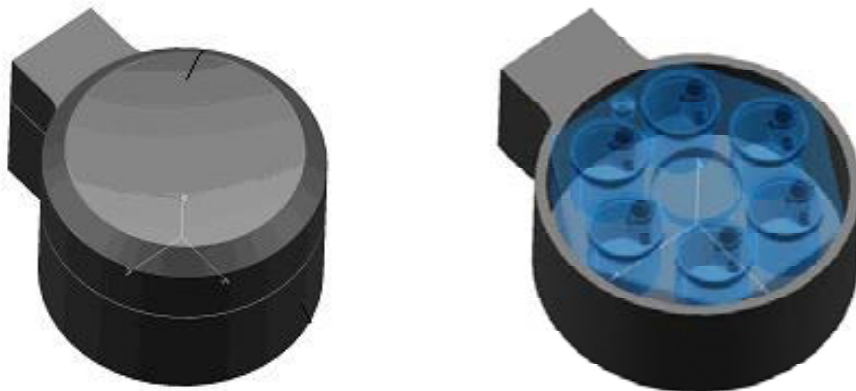


Figura 3.7. Model 3D de la carcassa de l'estació de treball que contindrà els minibioreactors plàstics. A l'esquerra, carcassa tancada. A la dreta, detall de la carcassa oberta, amb una placa de minibioreactors al seu interior.

A continuació es presenten les prestacions de l'estació de treball (a la figura 3.8 es mostra la ubicació dels diferents sistemes):

- Allotjament de les plaques de minibioreactors i posicionament de les sondes no invasives.
- Intercanvi de gasos a través de filtres estèrils, amb aeració per capçal. L'estació de treball haurà de disposar d'un sistema d'electrovàlvules per tal de poder proveir d'una consigna d'aeració individual per a cada minibioreactor.
- Bescanvi de calor amb el bany situat a la placa de minibioreactors consumible, per a termostatar els 6 minibioreactors simultàniament. A la part inferior on es situï la placa de minibioreactors hi haurà una placa conductora, que l'aïlli de la carcassa inferior de l'estació de treball (veure figura 3.8), on estarà ubicat l'element calefactor.
- Transmissió d'energia als 6 agitadors individuals. Es proposa construir un sistema d'agitació electromagnètic que sota de cada minibioreactor ubiqüi un element que provoqui un camp magnètic giratori, que transmeti el moviment a l'agitador (element imantat) de cada minibioreactor.
- Sondes i sistemes d'adquisició per a monitorització no invasiva a cada minibioreactor del creixement, oxigen dissolt i pH.

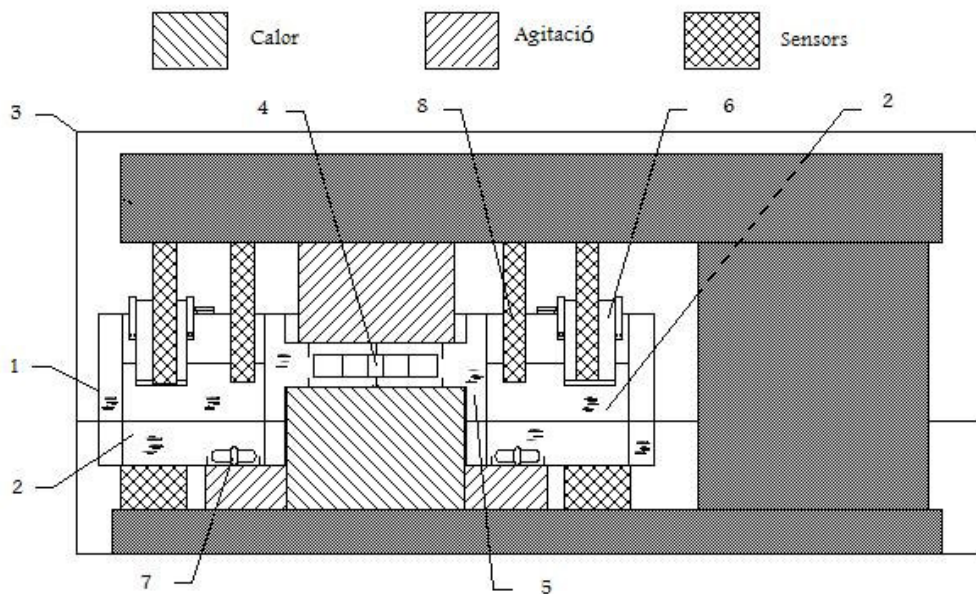


Figura 3.8. Distribució dels elements de termostatació, agitació i de posicionament dels sensors en la carcassa de l'estació de treball. 1) placa de minibioreactors d'un sol ús, 2) minibioreactor individual, 3) carcassa de l'estació de treball, 4) agitador del bany de termostatació central, 5) bany de termostatació central, 6) port per a sondes de mesura, 7) agitador individual, 8) port per a sondes de mesura.

Finalment, des del punt de vista del disseny, un aspecte important serà la geometria de l'equip, que permetrà que sigui de tipus modular. És a dir, les plaques de cultiu que són la base de l'equip podran ser multiplicades n vegades en funció del nombre de proves que requereixi l'aplicació final.

El disseny presentat fou protegit amb una sol·licitud de patent (PCT/ES2003/00607), que posteriorment ha portat a l'obtenció d'una patent espanyola (ES2208127), una patent als Estats Units d'Amèrica (US7442538), una patent japonesa (JP4394005), així com una patent europea (EP1580261) que està en tràmits d'entrada a fases nacionals en diferents països de la Unió Europea.

**4. CAPACITATS I
LIMITACIONS DELS SISTEMES
DE SEGUIMENT
SELECCIONATS**

Una vegada analitzades les característiques dels sistemes de cultiu actuals i les prestacions necessàries per a millorar les tasques de desenvolupament i optimització de bioprocessos (capítol 1), i havent definit a continuació com ha de ser el sistema de cultiu que es pretén desenvolupar (capítol 3), el primer pas previ a iniciar el desenvolupament tecnològic que ha de permetre assolir els objectius proposats ha estat realitzar una prova de concepte. En aquesta fase (figura 1.13) s'ha validat l'interès de les especificacions funcionals fixades per al sistema a desenvolupar, tot fent una primera aproximació a la forma de treballar que es proposa, encara que amb tecnologies comercials no adaptades als requeriments del projecte, però que s'espera que permetin avaluar l'interès real de les prestacions proposades, les perspectives d'èxit i possibles limitacions que poden aparèixer posteriorment en els estadis de desenvolupament.

Bona part de l'experimentació realitzada en aquest capítol té com a finalitat comprovar la viabilitat de realitzar el seguiment d'un bioprocés mitjançant els paràmetres proposats (pH, concentració cel·lular, oxigen dissolt i consum d'oxigen). Amb aquest objectiu, s'han realitzat cultius amb diferents models biològics, avaluant si els paràmetres de seguiment seleccionats proporcionaven informació sobre l'estat i l'avanç dels cultius, els seus comportaments metabòlics o estats fisiològics. Addicionalment, amb la informació obtinguda a partir dels sistemes de seguiment, s'ha determinat quina finestra d'aplicació es podria obtenir en els minibioreactors que s'han definit anteriorment, al emprar-los amb els diferents tipus de cèl·lules.

Al no disposar de tecnologia pròpia adaptada a les dimensions de treball desitjades, per a la realització dels experiments, s'han utilitzat minibioreactors mecanitzats de mides semblants a les dels que s'han de desenvolupar i sondes convencionals de les quals es disposava al laboratori de cultiu.

A la figura 4.1.1 es mostra una representació esquemàtica del prototip de minibioreactor que s'ha emprat per a la realització dels experiments inicials. Per a agitar, s'ha col·locat una vareta imantada al fons del minibioreactor (1), que es situava sobre una placa d'agitació magnètica. Per a aerar (per capçal) i ventejar s'han efectuat dos orificis a la tapa del minibioreactor, on s'encaixen tubs de silicona, a un extrem dels quals es situen filtres per a gasos (2). Per a l'inducul, s'ha efectuat un altre orifici a la tapa, que es cobreix amb un cilindre de cautxú (3). Finalment, per a poder realitzar mesures de pH i oxigen dissolt, s'han efectuat dos orificis de 12 mm a través dels quals es poden introduir les sondes corresponents (4).

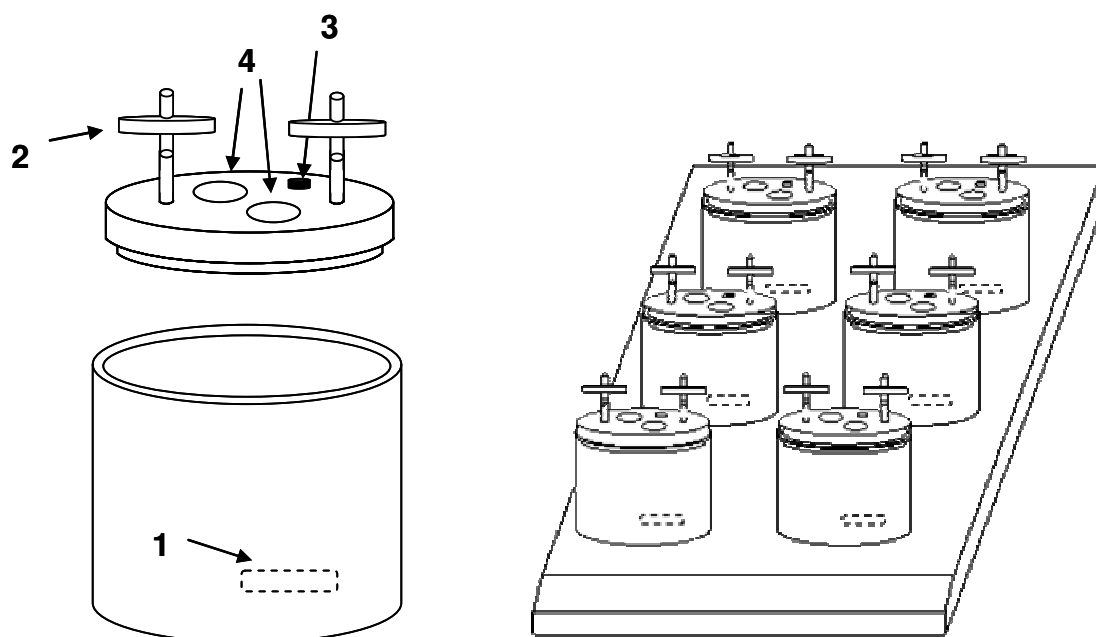


Figura 4.1.1. Esquerra: prototip de minibioreactor que s'ha mecanitzat per a la realització dels experiments inicials (1) vareta imantada, (2) filtres per a l'aeració i ventall, (3) sèptum per a la inoculació, i (4) orificis per a la introducció de sondes convencionals. Dreta: muntatge experimental amb diversos minibioreactors. Aquests, juntament amb una placa agitadora per a transmetre el moviment a les varetes imantades, es situen en un incubador a la temperatura que es desitgi treballar.

Cal aclarir que, pel que fa a la temperatura, a diferència de les altres variables, aquesta no dóna informació sobre l'avanç del cultiu, sinó que únicament mostra si aquest paràmetre s'ha mantingut estable (la qual cosa depèn del sistema de termostatació utilitzat) i serveix per a la compensació de les altres variables. Per a la temperatura no s'ha desenvolupat cap tipus de sonda específica, de manera que aquesta mesura no s'esmenta ni en aquest ni en el següent capítol (veure les sondes emprades a materials i mètodes). De fet, en aquest capítol, els cultius s'han realitzat dins d'un incubador, de manera que la temperatura s'ha mantingut i mesurat en aquest equip i no amb cap sonda específica incorporada al sistema en desenvolupament.

Referent a la selecció d'organismes per a la realització de les proves de validació, s'ha intentat cobrir un rang ampli de velocitats de creixement, de consums de nutrients, i de diversitat de metabolisme en general. Per a una millor comprensió de com s'ha realitzat aquesta selecció, es presenten a grans trets els diferents tipus d'organismes considerats, les característiques fonamentals que els distingeixen morfològicament i les diferències que aquestes impliquen a nivell metabòlic.

Les cèl·lules s'agrupen bàsicament en dos dominis principals: procariota i eucariota (veure'n les principals diferències de forma gràfica a la figura 4.1.2). En aquest treball, al parlar de procariotes ens referirem principalment a bacteris (ja que són la major part de procariotes amb aplicació industrial), mentre que d'entre els eucariotes, ens referirem principalment a llevats (fongs unicel·lulars), cèl·lules animals i vegetals.



Figura 4.1.2. Esquema comparatiu entre cèl·lules eucariotes i cèl·lules procariotes.

Els trets fonamentals que diferencien aquests tipus d'organismes són els següents (Tintó, 1999; Madigan i Col., 1997):

- Els bacteris tenen com a diàmetre uns 0,3-1 µm, els llevats 3-7 µm, i les cèl·lules eucariotes tant animals com vegetals, tenen un diàmetre d'entre 5 i 200 µm.
- Tant els bacteris, com els llevats, fongs i cèl·lules vegetals disposen de paret cel·lular que els confereix rigidesa. Les cèl·lules animals, en canvi, disposen únicament fins a membrana plasmàtica, de manera que les cèl·lules són molt més sensibles a esforços de cisalla.

- Les cèl·lules eucariotes, a diferència de les procariotes, presenten gran quantitat de membranes internes que no es troben unides a la membrana plasmàtica i que separen regions específiques de la resta del citoplasma. Aquestes membranes defineixen un conjunt d'estructures subcel·lulars anomenades orgànuls (nucli, mitocondri, reticle endoplasmàtic, aparell de Golgi, etc.) que tenen una funció cel·lular específica.
- Les cèl·lules eucariotes tenen una quantitat major d'ADN que les procariotes. En el cas dels bacteris, l'ADN s'organitza en un únic cromosoma que no es troba separat del citoplasma per cap embolcall nuclear i, fins i tot, determinades espècies contenen també plasmidis (petites estructures circulars d'ADN amb capacitat d'autoreplicació). El DNA de les cèl·lules eucariotes es troba associat a múltiples proteïnes i s'estructura en parelles de cromosomes continguts dins del nucli.

Aquestes diferències implicaran una sèrie de variacions en el comportament dels cultius, com són el temps de duplicació, el metabolisme (consum d'oxigen, glucosa, generació subproductes del metabolisme, etc.), i la sensibilitat a l'estrès per cisalla.

Pel que fa al metabolisme, les principals diferències venen donades per les fonts d'obtenció d'energia i per a la síntesi de precursors cel·lulars emprades pels microorganismes, així com per les vies catabòliques i anabòliques que aquestes segueixen. Depenent de les fonts d'energia emprades es parla de metabolisme quimiolitotròfic o fotolitotròfic. El més habitual en aplicacions de producció industrial és trobar espècies que bàsicament utilitzen la respiració aeròbia, tot i que també és habitual que aquestes vies es saturin i n'utilitzin altres en paral·lel per tal d'assimilar al màxim els nutrients disponibles. A la figura 4.1.3 es mostren com a exemples els esquemes simplificats del metabolisme dels híbridomes i de *Escherichia coli*. En el cas dels híbridomes, una vegada es satura el catabolisme de la glucosa via el cicle de Krebs, es produeix lactat, arribant en determinats casos a uns rendiments de 1,5-2 mols de lactat per mol de glucosa consumida (Gámez, 2000), que provoquen acumulacions en el cultiu que acaben essent perjudicials per al mateix. En el cas de *Escherichia coli*, una vegada saturat el catabolisme de la glucosa via el cicle de Krebs, no només es produeix lactat, sinó també altres àcids (principalment acetat), i en aquest cas, si hi ha limitació d'oxigen, s'activen de forma més o menys marcada (en funció del grau de limitació) les vies de metabolisme anaerobi.

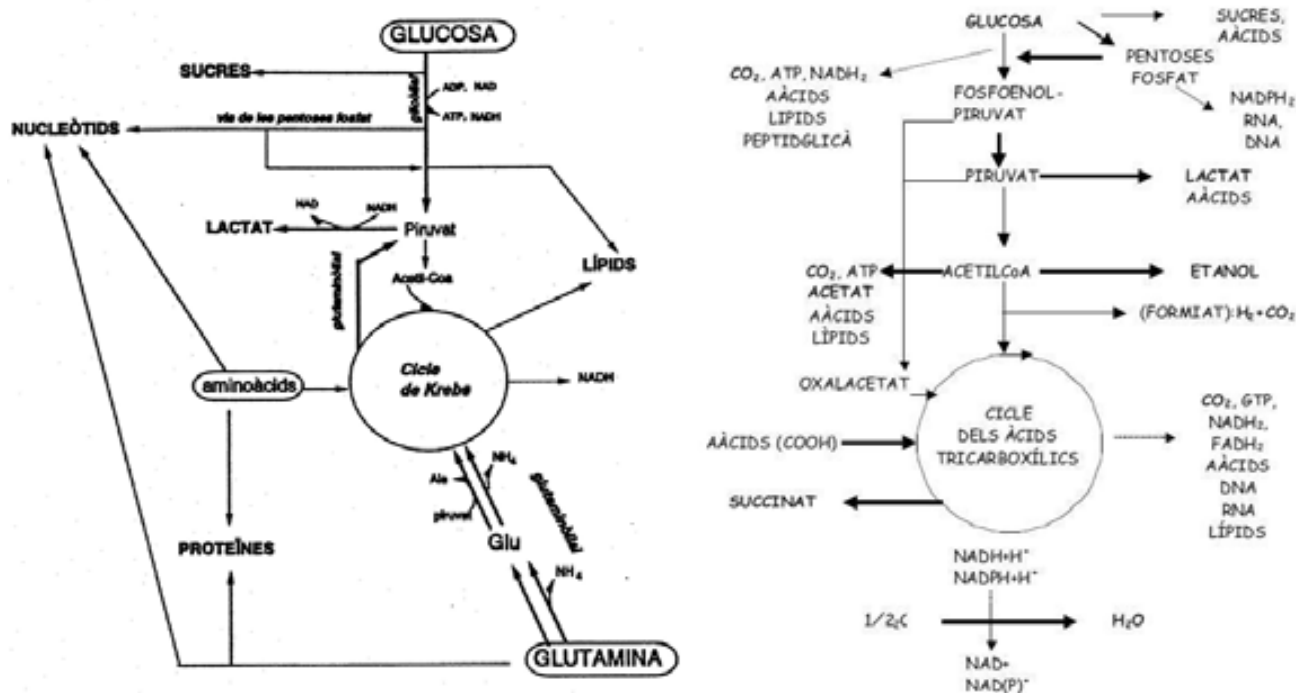


Figura 4.1.3. Simplificacions del catabolisme de hibridoma (esquerra) i *Escherichia coli* (dreta). Fonts: Sanfeliu, 1995 (hibridoma), i Vila, 2001 (*Escherichia coli*).

També relacionat amb el metabolisme i les capacitats de les cèl·lules de sintetitzar major o menor nombre de precursors, és interessant esmentar que per a cultivar microorganismes o línies cel·lulars els medis de cultiu a emprar varien significativament. En el cas d'un nombre elevat de bacteris, les fonts de carboni (principal component cel·lular, que representa un 50% del pes sec) que es poden emprar són molt diverses. Així els medis emprats poden tenir sucres definits (glucosa, fructosa, manosa, etc.), o bé venir de residus d'indústries agrícoles o alimentàries amb una certa composició de sucres o altres fonts de carboni (per exemple, un dels residus emprats és el "corn step liquor"). En el cas del nitrogen, el segon component en importància de la cèl·lula (representa un 12% del pes sec) la majoria de bacteris poden emprar amoni, i nombrosos microorganismes també poden utilitzar nitrat (Madigan i Col., 1997). D'acord amb el que s'acaba de comentar, els medis per a bacteris poden arribar a ser molt senzills, disposant només d'un nombre molt reduït de components (una font de carboni, una font de nitrogen, sals i si les possibles auxotrofies del microorganisme així ho requereixen, algun component addicional). Tot i això, també és habitual emprar medis complexes, amb hidrolitzats rics amb pèptids, sucres i aminoàcids, ja que habitualment permeten millors rendiments dels cultius. En un o altre cas, els medis acostumen a tenir costos molt reduïts. Els medis per a llevats presenten similituds als de

bacteris pel que fa a la seva simplicitat i cost, tot i que és més habitual assegurar que els medis tinguin una major dotació d'aminoàcids i vitamines (per exemple, són habituals en els medis més simples la utilització de *Yeast Nitrogen Base*, i suplementes d'aminoàcids com en el *Hartwell Complete*).

A diferència de la capacitat de la majoria de bacteris i llevats d'emprar medis senzills i de cost reduït, els requeriments dels medis de cultiu de cèl·lules animals són molt més elevats, presentant poca versatilitat en la utilització de fonts de carboni (principalment és glucosa), i requerint, addicionalment, aminoàcids, vitamines, sals, elements traça, i diversos factors de creixement. A la taula 4.1.1 es presenta una comparació simplificada dels medis de cultiu per a bacteris, llevats i cèl·lules animals.

Medi per a bacteris	Medi per a llevats	Medi per a cèl·lules animals
Font de carboni (Glucosa o altres sucres) Font de nitrogen (amoni, nitrats, peptones, triptones i caseïnes) Sals Metalls traça	Font de carboni (Glucosa o altres sucres) Font de nitrogen (amoni i fonts orgàniques com peptones, triptones i caseïnes) Sals Metalls traça	Glucosa Aminoàcids (~15) Vitamines (~10) Sals Metalls traça Altres additius (factors creixement, insulina...)

Taula 4.1.1. Comparació entre les característiques generals dels medis de cultiu de bacteris, llevats i cèl·lules animals.

Tornant a la selecció d'organismes que cal realitzar per fer experiments de validació del disseny inicial del sistema de cultiu i les estratègies de seguiment seleccionades, com s'ha comentat, cal avaluar un cert nombre d'espècies que cobreixin de la forma el més àmplia les possibles diferències. A la taula següent (4.1.2) es presenta un recull d'exemples:

Organisme	Tipus cel·lular	Paret cel·lular (S/N)	Temps de duplicació (h)	Referència
<i>Escherichia coli</i>	Bacteri	S	0,5	Zaritski i Col., 1999
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacteri	S	0,75	Mäder i Col., 2008
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Llevat	S	1,8	Zhang i Col., 1997
<i>Pichia pastoris</i>	Llevat	S	3,4	Jacobs i Col., 2009
<i>Spodoptera frugiperda</i> 9	Cèl·lula d'insecte	N	31,5	Lecina, 2007
Hibridoma	Cèl·lula de mamífer ¹	N	24,5	Nilsang i Col., 2008
Vero	Cèl·lula de mamífer ²	N	≈ 24	Nahapetian i Col., 1986
HEK293	Cèl·lula de mamífer ³	N	≈ 33	Sahni i Col., 2006

¹ línia cel·lular amb creixement en suspensió

² línia cel·lular amb creixement anclatge-dependent

³ línia cel·lular amb creixement anclatge-dependent, adaptada al creixement en suspensió

Taula 4.1.2 Recull de diferents tipus cel·lulars, temps de duplicació, i presència o no de paret cel·lular entre diferents organismes emprats en biotecnologia amb finalitats productives. Nota: les dades no mostren la variabilitat que hi pot haver entre els organismes creixent a diferents condicions, o bé entre diferents soques. Simplement s'han emprat exemples individuals que poden donar una idea de les diferències entre els organismes que es presenten.

Per a cobrir un ventall prou ampli de velocitats de creixement, comportaments metabòlics i sensibilitat a l'estrès mecànic associat a l'agitació, s'ha seleccionat treballar amb una espècie de bacteri, una de llevat, i una línia cel·lular de mamífer.

Entre els bacteris s'ha seleccionat una espècie àmpliament utilitzada per a fins productius: *Escherichia coli* (*E. coli*). Aquesta espècie ha estat un dels models hoste més emprats degut a la gran disponibilitat d'eines de genètica molecular, al gran nombre de soques i mutants, al extens coneixement sobre la seva fisiologia, a la possibilitat de créixer en medis de cultiu barats, i a la relativa facilitat per obtenir cultius d'alta densitat amb un escalat simple. Per a proteïnes heteròlogues que no requereixen modificacions post-traduccionals complexes i que s'expressen de forma soluble, *E. coli* acostuma a ser el primer model emprat, tot i que en els casos de proteïnes que requereixin plegaments s'acostuma a optar per altres models (Baneyx i Mujacic, 2004).

D'entre els llevats, s'ha utilitzat *Pichia pastoris* (*P. pastoris*), que també presenta nombroses aplicacions per a la producció de proteïnes recombinants. A més, al tractar-se d'un organisme eucariota, presenta majors possibilitats de plegament de les proteïnes

produïdes, amb formació de ponts disulfur i glicosilació (Cereghino i Cregg, 2000; Solà i Col. 2004).

I d'entre les cèl·lules de mamífer, s'ha seleccionat una línia d'hibridoma, un dels tipus de cèl·lules emprades per a la producció d'anticossos monoclonals, i en la que hi ha una experiència prèvia de treball al grup de recerca en el que s'ha efectuat aquest treball.

4.1. Estudi de les condicions d'operació i seguiment de la concentració cel·lular per absorbància

La necessitat de realitzar cultius per tal d'estudiar-ne les estratègies de seguiment implica la necessitat d'establir prèviament les condicions d'operació. Pel que fa a valors de temperatura i medis de cultiu, s'han emprat condicions que es poden considerar força estandarditzades per a cada organisme (Taula 4.1.3), tot i que més endavant, en els apartats 4.2 i 4.3 es realitzen experiments amb diferents medis de cultiu per tal d'ampliar el ventall de comportaments estudiats.

Organisme	Temperatura (°C)	Medi de cultiu
<i>E. coli</i>	37	Luria Bertani (LB)
<i>P. pastoris</i>	30	<i>Yeast Peptone Dextrose</i> (YPD)
Hibridoma	37	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i> (DMEM), + <i>Foetal Bovine Serum</i> , + insulina, + β -mercaptoetanol.

Taula 4.1.3. Organismes i condicions de cultiu (temperatura i medi de cultiu) emprades en els estadis inicials de validació de les estratègies de seguiment seleccionades. Per a més detall, consultar el capítol de Materials i Mètodes.

A l'hora de fixar altres paràmetres com ara l'agitació i l'aeració, que són dependents del disseny de l'equip utilitzat s'ha realitzat un nombre reduït de proves.

A continuació, es presenten els resultats dels cultius realitzats amb *E. coli*, *P. pastoris* i l'hibridoma, bàsicament amb la finalitat d'establir uns marges d'operació referents a l'aeració i agitació contemplades en el disseny inicial. D'altra banda, també es pretén realitzar una valoració del seguiment del cultiu mitjançant mesures d'absorbància i

obtenir una primera aproximació a les possibles limitacions del sistema de cultiu, així com de les densitats cel·lulars que es poden assolir.

Els cultius amb *E. coli* i *P. pastoris* responen tots a un mateix procediment experimental. Aquest contempla l'inòcul a aproximadament 0,2 unitats d'absorbància (mesurada a 590 nm en el cas de *E. coli* i a 600 nm en el cas de *P. pastoris*), tant en els prototips de minibioreactors (figura 4.1.1), com en Erlenmeyers de control. En els minibioreactors s'han aplicat diferents cabals d'aeració (per capçal), i també diferents velocitats d'agitació en funció de la vareta imantada emprada. Per avaluar les diferències en el comportament dels cultius, en aquest apartat únicament s'ha realitzat mesures fora de línia de la concentració cel·lular per conèixer les diferències de creixement experimentades.

En els cas dels cultius amb una línia d'hibridoma, donats els menors requeriments d'aeració de les cèl·lules animals, simplement s'ha fixat una agitació de la vareta imantada que permetés mantenir les cèl·lules en suspensió (aproximadament 150 rpm), i una aeració discontinua amb aire-5% CO₂ per tal de mantenir una atmosfera al 5% de CO₂.

Bacteris

E. coli (en medi LB)

A la figura 4.1.4a i 4.1.4b es mostren les corbes de creixement a diferents agitacions i a diferents cabals d'aeració. Tal com es pot veure a la figura 4.1.4a, on es realitzen cultius a 200, 300, 400 i 500 rpm, les corbes de creixement mesurades a partir de dades d'absorbància (590 nm) mostren que la limitació del cultiu respecte un control realitzat en Erlenmeyer es produeix a temps similars en tots els casos, aproximadament a les 2 h. Tot i això, a partir de les 5 h es pot observar una reducció més ràpida de la velocitat de creixement en aquells cultius amb agitacions menors. Per a treballar amb aquest tipus de cultiu s'ha seleccionat una velocitat d'agitació de 400 rpm, ja que tot i que no hi ha moltes diferències entre els diferents valors estudiats, s'escull un valor d'agitació elevat per considerant que aquest pugui afavorir el bescanvi d'oxigen, que s'espera s'incrementi en el cas d'utilitzar aeració. Respecte aquest comentari, cal remarcar que en aquests experiments (figura 4.1.4a) no hi ha hagut cap tipus d'aeració més enllà de l'afavorida per la pròpia agitació. A priori, prèviament a que el seguiment de l'oxigen dissolt ho pugui corroborar, es pot fer la hipòtesi que la limitació dels cultius és deguda a la manca d'oxigen, donades les altes velocitats de creixement i consums d'oxigen d'aquests organismes.

Un cop fixada l'agitació s'han realitzat estudis per tal de determinar l'aeració necessària. A la figura 4.1.4b es mostren corbes de creixement de cultius sense aeració, i amb aeracions per capçal de 0,5 i 1,0 L/min (mesurats a condicions normals). En aquests s'ha pogut observar que l'existència o no de cabals d'aeració per capçal no suposa un canvi en la velocitat de creixement del cultiu i no permet endarrerir l'aparició de limitacions respecte el control. A la vista d'aquests resultats es pot concloure que en aquest cas l'aeració forçada per capçal no és necessària, ja que probablement no permet un augment en la transferència d'oxigen que sigui comparable a l'ordre de la velocitat del consum del cultiu, de manera que no hi ha un augment en la durada de la fase exponencial.

La capacitat de realitzar un cultiu de forma exponencial durant 2-3 h es pot considerar força reduïda, de manera que s'haurà d'intentar augmentar aquest valor superant la limitació suposadament deguda a la manca d'oxigen. Aquesta hipòtesi ha estat comprovada en l'apartat 4.2, on s'estudia de forma específica els aspectes de transferència i mesura de l'oxigen dissolt.

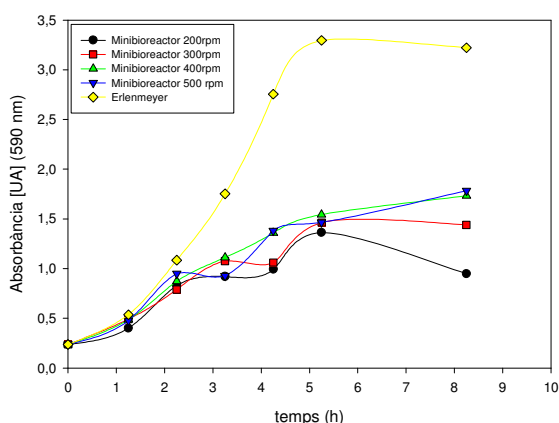


Figura 4.1.4a. Corbes de creixement per a cultius de E. coli en medi LB a diferents agitacions, sense aeració. Com a referència, es presenta el cultiu en un Erlenmeyer sense aeració forçada (amb agitació orbital).

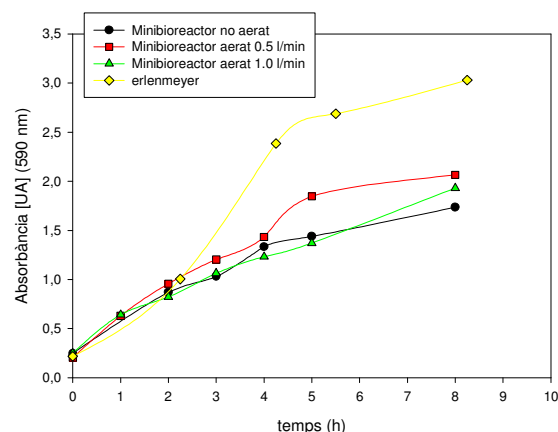


Figura 4.1.4b. Corbes de creixement per a cultius de E. coli en medi LB a diferents aeracions (sense aeració, 0,5 L/min, 1,0 L/min), a una agitació de 400 rpm. Com a referència, es presenta el cultiu en un Erlenmeyer sense aeració forçada (amb agitació orbital).

La valoració que es pot fer en aquest cas del seguiment dels cultius mitjançant mesures d'absorbància és que aquesta mesura pot seguir les diferències bàsiques de creixement, però no dóna informació sobre si els orígens d'aquestes són les condicions ambientals

proporcionades pels reactors de cultiu, com pot ser aquest cas la limitació d'oxigen que s'estudiarà més endavant (apartat 4.2).

Llevats

P. pastoris (en medi YPD)

De forma similar als cultius anteriors, amb aquest model cel·lular s'han realitzat uns primers cultius estudiant l'efecte de l'agitació. A les corbes de creixement que es mostren a la figura 4.1.5a es pot observar com en aquest cas la limitació apareix a les 7-10 h de cultiu, més tard que en el cas anterior. Aquests resultats es poden relacionar amb el fet que la cinètica de creixement d'aquest organisme és més lenta (*E. coli* mostra uns temps de duplicació d'aproximadament 1,5 h, mentre *P. pastoris* està al voltant de 3,3 h), i si la hipòtesi de la limitació d'oxigen plantejada per a *E. coli* fos certa (com es discutirà posteriorment a l'apartat 4.2), aquesta aparició més tardana de la limitació també podria ser deguda als diferents consums específics d'oxigen. Revisant la bibliografia es poden mostrar dades indicatives d'aquest fet, com són la mesura d'un consum de 17,75 mmol O₂ / (g Cèl·l·xh) per a *E. coli* (Vidal, 2006), i de 2,73 mmol O₂ / (g Cèl·l·xh) per a *P. pastoris* (Solà i Col., 2004).

Tot i que en aquest cas no s'observen diferències clares en l'absorbància assolida (figura 4.1.5a), novament s'ha establert una agitació prou elevada, al voltant de 400 rpm, per afavorir el bescanvi d'oxigen. De totes maneres, en l'experiment següent (figura 4.1.5b) on s'han aerat els cultius per capçal, veiem que l'efecte d'aquest tipus d'aeració sobre el creixement és molt reduït. Així doncs, ens tornem a trobar com en el cas anterior, i plantegem novament la hipòtesi que la velocitat de transferència és inferior a la velocitat de consum.

De totes maneres, en aquest cas la capacitat de tenir cultius creixent de forma exponencial durant 7-10 h de cultiu ja permetria treballar a l'equip, ja que la idea és que treballant amb models cel·lulars com bacteris i llevats, es puguin sembrar cultius en els sis minibioreactors a condicions diferents, i en unes poques hores (7-10 h estarien dins d'aquest rang) es puguin obtenir els resultats esperats.

Cal remarcar que l'objectiu del sistema de cultiu a desenvolupar no és assolir concentracions molt elevades de microorganismes, que tard o d'hora acabaran portant a una limitació, en aquest cas per oxigen, sinó tenir una finestra temporal prou significativa de creixement en condicions no limitants, i per tant en fase exponencial, per tal de poder fer experiments de cribat.

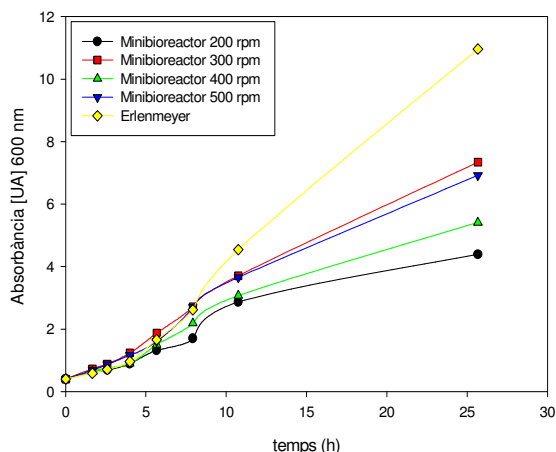


Figura 4.1.5a. Corbes de creixement per a cultius de *P. pastoris* a diferents agitacions, sense aeració. Com a referència, es presenta el cultiu en un Erlenmeyer sense aeració forçada (amb agitació orbital).

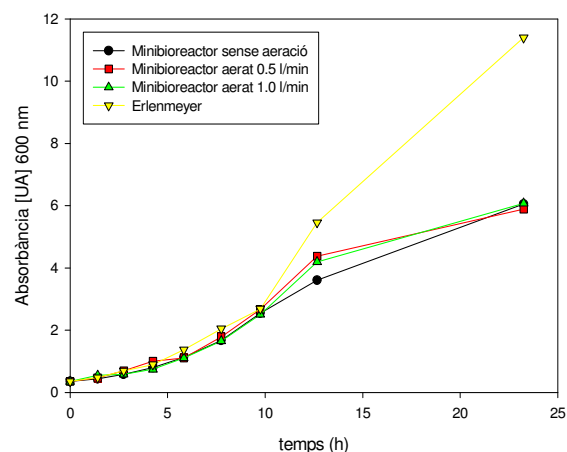


Figura 4.1.5b. Corbes de creixement per a cultius de *P. pastoris* a diferents aeracions (sense aeració, 0,5 L/min, i 1,0 L/min), a una agitació de 400 rpm. Com a referència, es presenta el cultiu en un Erlenmeyer sense aeració forçada (amb agitació orbital).

Novament, la valoració que es pot realitzar del seguiment de l'absorbància és que aquesta mesura segueix les diferències bàsiques de creixement, tot i que aquesta variable no permet explicar si les diferències observades són degudes a que el reactor no proporcioni unes condicions ambientals no limitants.

Cèl·lules animals

Hibridoma (en medi DMEM)

Per a cèl·lules animals, donada la seva dinàmica de creixement i metabolisme, els requeriments d'aeració són molt menors en comparació als bacteris i llevats (prenent les referències emprades en aquest capítol, en el cas de *E. coli* el consum era de 17,75, en el cas de *P. pastoris* de 2,73, i en el cas d'hibridoma de 0,00053, en tots els casos dades en mmol O₂/(g Cèl·l·xh)). Així, per a validar les condicions de treball simplement s'ha establert una única agitació que permeti mantenir les cèl·lules en suspensió (al voltant de 150 rpm). Cal tenir en compte també que velocitats d'agitació massa elevades poden provocar mort cel·lular en aquest sistema. D'altra banda, és necessària una atmosfera amb el 5% de CO₂, la qual s'ha subministrat al cultiu mitjançant polsos d'aire al 5% de CO₂, de 30 segons que es realitzen cada 5 minuts. L'inòcul és d'entre 4 i 5x10⁵ Cèl·l./mL (equivalent a 0,06-0,09 UA a 700 nm). Per al seguiment del cultiu, en aquest cas, a banda de realitzar mesures d'absorbància (a 700 nm), s'han realitzat recomptes de concentració cel·lular al microscopi. Si bé en casos de bacteris i llevats també es

realitzen recomptes de viables al microscopi, per casos amb potencial aplicació industrial és més habitual centrar-se amb mesures d'absorbància, mentre que en cèl·lules animals la mesura més àmpliament utilitzada és el recompte cel·lular.

A la figura 4.1.6 es mostra la corba de creixement en un prototip de bioreactor, durant 48 h (temps habitual de subcultiu), a les condicions d'agitació i aeració comentades, en comparació a la obtinguda en un control realitzat en un flascó de cultiu. En aquesta s'observa com el cultiu realitzat en un minibioreactor a les condicions prèviament esmentades, no mostra un creixement comparable al d'un flascó de control. Després de nombroses hipòtesis i comprovacions s'ha establert que l'equip descrit en el capítol 3, on la homogeneïtzació s'aconsegueix mitjançant la utilització d'una vareta imantada, provoca un estrès massa elevat, ja que la vareta té una àrea de fregament sobre el plàstic de cultiu, on hi poden circular les cèl·lules, veient-se afectades per un efecte de cisalla.

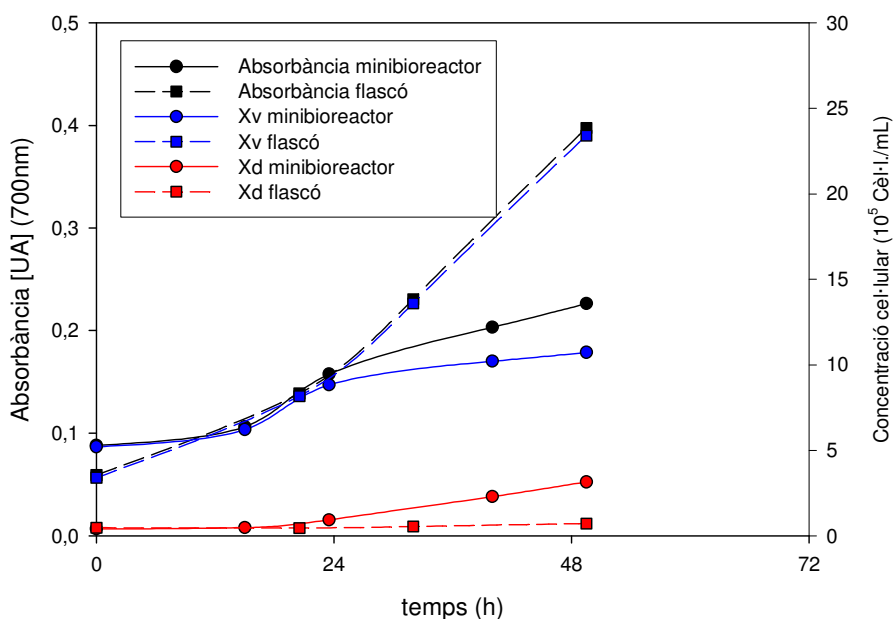


Figura 4.1.6. Corba de creixement d'un cultiu d'hibridoma en minibioreactor. Com a control, corba de creixement obtinguda en un flascó de 25 cm², amb 10 mL de medi, situat dins un incubador al 5% CO₂. Xv correspon a les cèl·lules viables, mentre que Xd correspon a les cèl·lules no viables.

A partir d'aquests resultats s'ha identificat un primer redisseny necessari, el del sistema d'agitació per a cultius amb cèl·lules animals, que per a poder treballar amb cèl·lules d'aquest tipus haurà de produir un menor estrès per cisalla (estudi presentat al capítol 5).

Per tal de poder realitzar un anàlisi de les capacitats i restriccions dels sistemes de seguiment seleccionats, en aquest capítol s'ha emprat un sistema de cultiu agitat sense estrès per cisalla on s'ha acoblat les sondes requerides en cada apartat.

A la figura 4.1.7 es mostra una corba de creixement, tant per un cultiu realitzat en un cultiu en un flascó de control, com en un sistema agitat sense estrès per cisalla, observant-se creixements similars en ambdós casos.

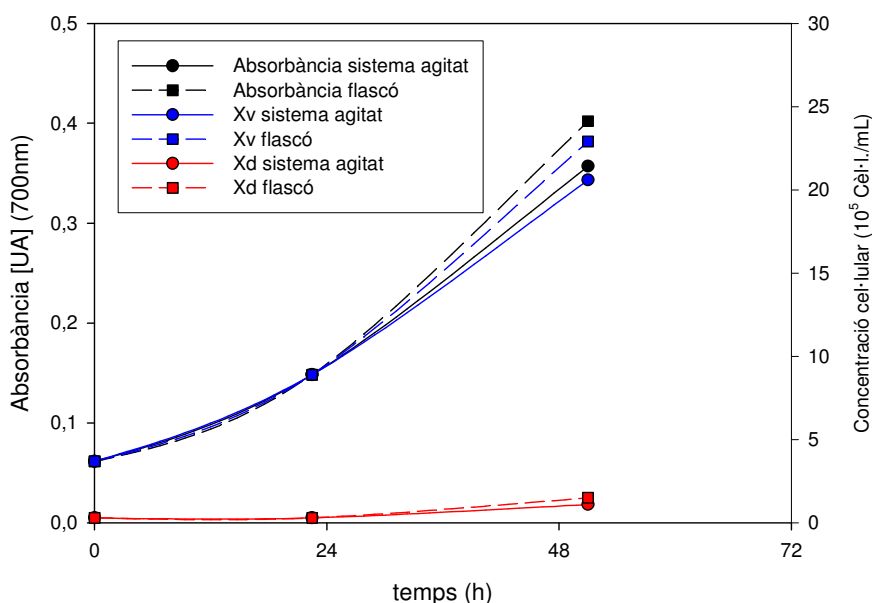


Figura 4.1.7. Corba de creixement d'un cultiu d'hibridoma en un sistema de cultiu agitat no estressant, i en un flascó de control (25 cm², 10 mL medi) situats dins un incubador al 5% CO₂. Xv correspon a les cèl·lules viables, mentre que Xd correspon a les cèl·lules no viables.

Referent a la valoració del seguiment de l'absorbància per a cèl·lules animals, es pot concloure que aquesta mesura permet el seguiment de diferències en el creixement. Aquest cas però, té una particularitat, ja que a diferència dels models de bacteri i llevat estudiats (on quan es segueix la concentració cel·lular només es fa en g/L de cèl·lules totals), el seguiment de la concentració cel·lular s'acostuma a fer recomptant tant les cèl·lules viables com les no viables. A partir dels resultats mostrats a les figures 4.1.6 i 4.1.7 es pot afirmar que mentre la viabilitat del cultiu sigui elevada, l'absorbància segueix acuradament l'evolució de les cèl·lules viables del cultiu. Quan apareixen concentracions significatives de cèl·lules no viables però, l'absorbància es desvia de la concentració de cèl·lules viables, seguint la concentració de cèl·lules i *debris* total (cultiu en minibioreactor figura 4.1.6).

Amb els experiments presentats tant en bacteris, llevats com cèl·lules animals s'ha demostrat que es poden fer creixements, si bé en el cas de cèl·lules animals caldrà dissenyar un sistema d'agitació no estressant, i que l'absorbància permet seguir la seva evolució temporal. No obstant, també s'ha pogut observar potencials limitacions d'aeració en bacteris i llevats, que es comprovaran en els següents apartats.

4.2. Consideracions per al seguiment de la concentració d'oxigen dissolt

Durant l'estudi de les condicions d'operació s'ha observat que tant en els cultius amb bacteris com amb llevats apareixen limitacions en el creixement prèviament a la frenada del creixement experimentada en els cultius control. El coneixement previ dels microorganismes i del seu cultiu en bioreactors indica l'existència d'una possible limitació per oxigen dissolt. En aquest apartat s'estudiarà aquesta hipòtesi, i també s'analitzarà l'interès per a seguir l'oxigen dissolt en cultius en minibioreactor.

Cal tenir en compte que en aquest punt del treball, previ a l'inici de tasques de desenvolupament, no es disposava de sistemes de mesura personalitzats que permetessin seguir l'oxigen en múltiples minibioreactors. Així doncs, no s'ha realitzat un seguiment d'aquesta variable en tots els cultius realitzats, sinó que s'ha realitzat en únicament en tots aquells cultius realitzats a l'apartat 4.1 on s'havia hipotetitzat que hi havia possibles limitacions.

Cultiu de bacteris

E. coli (en medi LB)

Per tal d'identificar si la limitació que s'havia observat en els cultius realitzats anteriorment (figures 4.1.4a i 4.1.4b) era deguda a l'oxigen dissolt, s'ha repetit un experiment de creixement, novament emprant el prototip mostrat a la figura 4.1.1, amb un inòcul d'aproximadament 0,2 unitats d'absorbància (mesurada a 590 nm), una agitació de 400 rpm, i sense aeració forçada. No s'ha emprat aeració ja que a l'apartat 4.1 (figures 4.1.4a i 4.1.4b) s'havia observat que no hi havia diferències en el creixement fos quina fos l'aeració per capçal. Per a seguir el creixement del cultiu s'ha seguit realitzant mesures fora de línia d'absorbància (590 nm) i en aquest cas, per tal de seguir l'oxigen dissolt i identificar-ne possibles limitacions, s'ha emprat una sonda d'oxigen (Ingold 3-532-58, Mettler-Toledo, Greifensee, Suïssa) utilitzant una de les entrades de les quals disposava el prototip de minibioreactor.

A la figura 4.2.1 es mostren els resultats del seguiment d'aquest cultiu, veient-se que tot i que hi ha creixement sense limitació aparent durant les primeres 2 h, la concentració d'oxigen mesurada ha estat pràcticament zero durant tot aquest període.

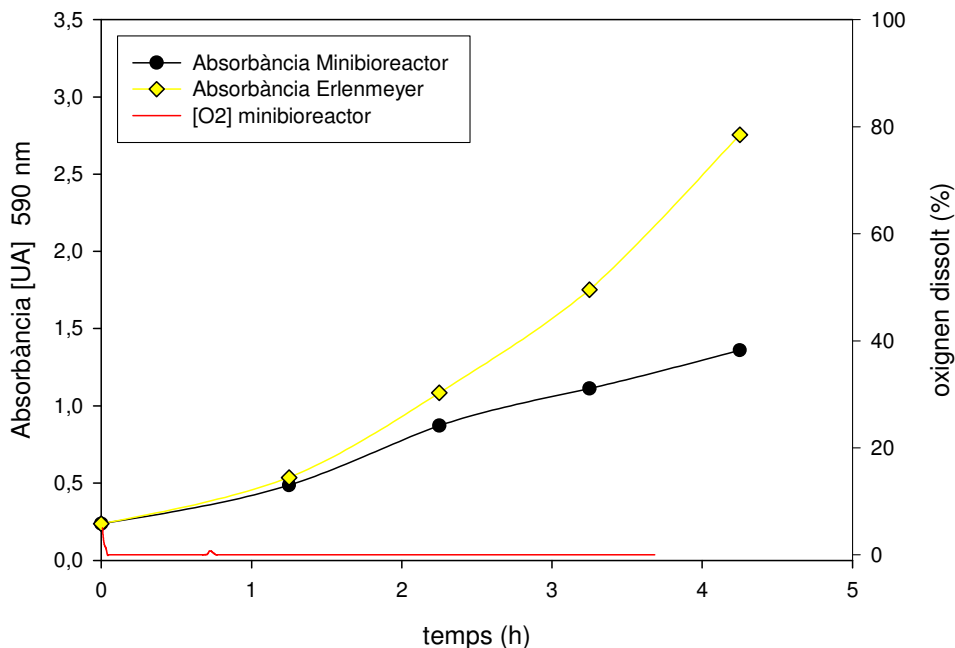


Figura 4.2.1. Seguiment de l'absorbància (590 nm) i de l'oxigen dissolt (%) en un cultiu de *E. coli* en medi LB, agitat a 400 rpm, sense aeració forçada. Com a referència, es presenta el cultiu en un Erlenmeyer sense aeració forçada.

Amb aquesta primera gràfica ja es pot començar a calibrar la necessitat de realitzar un seguiment de la concentració d'oxigen dissolt, ja que es confirma la limitació d'aquest nutrient i per tant, s'identifica la necessitat de conèixer que la concentració està entre uns determinats valors per tal que no hi hagi limitacions en el creixement.

A la vista de la incapacitat de l'estratègia d'aeració seleccionada per a mantenir qualsevol consigna d'oxigen diferent de zero, s'ha avaluat la utilització d'un sistema d'aeració per bombolleig.

Així, s'ha plantejat un experiment on comparar les corbes de creixement del microorganisme a diferents condicions d'aeració, realitzant cultius en els següents sistemes: 1) Erlenmeyer sense aeració forçada, però on el moviment orbital del líquid afavoreix l'entrada d'oxigen al medi, 2) Minibioreactor prototip amb aeració per bombolleig (controlant una consigna del 30% d'oxigen dissolt mitjançant la unitat de control d'un bioreactor Braun Biostat MCD, 3) Minibioreactor prototip sense aeració, i 4) Minibioreactor prototip amb circulació d'un cabal de nitrogen, per assegurar que no

hi ha disponibilitat d'oxigen al cultiu. En aquest experiment, novament s'han emprat inòculs d'aproximadament 0,2 unitats d'absorbància (mesurada a 590 nm), i una agitació emprant varetes imantades a 400 rpm (en el cas dels minibioreactors).

Donada la impossibilitat de realitzar múltiples mesures d'oxigen en paral·lel, ja que encara no s'havia iniciat el desenvolupament del sistema de mesura corresponent, la mesura d'oxigen s'ha realitzat únicament amb el minibioreactor del qual es controlava la concentració d'oxigen dissolt al 30% de saturació. De totes maneres, de forma indirecta si que es coneix la concentració d'oxigen present en els altres minibioreactors: aquell en el que circula nitrogen té una concentració del 0% (s'havia comprovat que el cabal de nitrogen era suficient per mantenir tal concentració), i aquell en el que no hi ha aeració forçada és d'esperar que, donada la velocitat de creixement comparable a l'observada a la figura 4.2.1, la concentració sigui propera al 0% en tot moment.

Els resultats (figura 4.2.2) mostren com el cultiu aerat per bombolleig presenta un creixement similar al que es produeix en un Erlenmeyer, sense limitació d'oxigen, ja que la concentració d'aquest ha estat controlada a una consigna adient (30% oxigen dissolt). En canvi, es pot comprovar que el creixement en el cultiu on no hi ha aeració ha estat més lent, tot i que no tant com el cultiu on s'ha circulat un cabal de nitrogen pel minibioreactor. Això és degut a que tot i que la concentració d'oxigen dissolt sigui pràcticament zero, hi ha una certa transferència d'oxigen que prové de la fase gas i que el cultiu haurà pogut anar consumint. En el cas que es fa circular un corrent de nitrogen i desapareix pràcticament totalment la disponibilitat d'oxigen, els elements d'elevada afinitat a l'oxigen que permeten la seva utilització com a acceptor a condicions microaeròbiques (D'Mello i Col., 1996), deixen d'actuar i el creixement del cultiu es veu aturat.

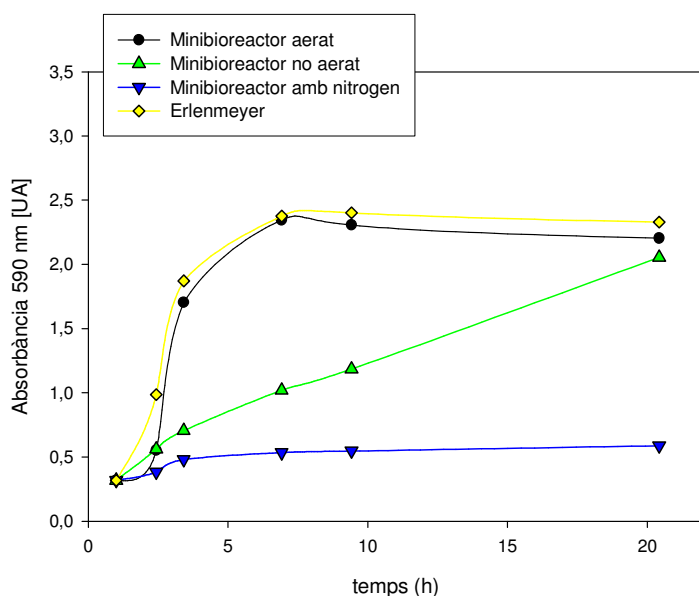


Figura 4.2.2. Corbes de creixement per a un cultiu de E. coli en medi LB en diferents condicions d'aeració. En el cas del minibioreactor aerat, per bombolleig, disposa d'un control de la concentració d'oxigen dissolt al voltant del 30%. En el cas del minibioreactor on circula un cabal de nitrogen per capçal, el cabal ha estat de 0,4 slpm. Com a referència, es presenta el cultiu en un Erlenmeyer sense aeració forçada.

Per a major detall en la comparativa de les velocitats específiques màximes de creixement observades, cal comentar que els temps de duplicació (durant la fase exponencial) han estat d'aproximadament 1 h per als cultiu en Erlenmeyer i en minibioreactor aerat, de 6 h per al cultiu en minibioreactor no aerat (al presentar un creixement lineal, la velocitat ha estat avaluada com una mitjana durant el cultiu), i en el cas del cultiu en minibioreactor amb un cabal de nitrogen, una vegada passades les primeres 3 h de cultiu la velocitat ha tendit pràcticament a zero

E.coli (en medi mínim)

Havent vist quin era el comportament de *E. coli* en un medi ric molt emprat per al seu cultiu (LB), cal considerar també que hi ha un nombre elevat de medis diferents que s'utilitzen per a aquest organisme, i que les dinàmiques de creixement en aquests poden ser prou diferents. Així, també s'ha cregut convenient realitzar cultius emprant un medi més pobre en nutrients, on normalment les velocitats de creixement i consums assolits són menors, per poder discutir novament els comportaments observats. El medi mínim seleccionat ha estat el medi M9 i a diferència del LB, que disposava d'extracte de llevat i peptona, en aquest cas simplement disposa de glucosa com a font de carboni, a més com a font de nitrogen, i diferents sals traça (veure en detall la seva composició a materials i mètodes).

A continuació s'ha repetit l'experiment plantejat en medi M9, amb un Erlenmeyer de control, un minibioreactor aerat per bombolleig (amb una consigna del 30% d'oxigen dissolt), un minibioreactor sense aeració, i un minibioreactor prototip amb circulació d'un cabal de nitrogen. Novament s'han emprat inòculs d'aproximadament 0,2 unitats d'absorbància (mesurada a 590 nm), i una agitació emprant varetes imantades a 400 rpm (en el cas dels minibioreactors).

A la figura 4.2.3 s'observa com en medi M9, per a totes les condicions d'aeració avaluades, la velocitat de creixement és força més reduïda que en el cas de realitzar els cultius en medi ric (pels cultius sense limitació d'oxigen el temps de duplicació es redueix de 1 h a unes 4 h). En aquest cas però, no s'observa una variació significativa de creixement entre els cultius en Erlenmeyer i en minibioreactor, ni entre les diferents condicions d'aeració.

Referent a les concentracions d'oxigen, novament no ha estat possible mesurar-les en tots els minibioreactors, si bé de forma similar al que s'havia comentat al cas anterior es poden estimar quines han estat les concentracions presents en cadascun dels minibioreactors. El cultiu amb l'oxigen controlat té una concentració (mesurada) al

voltant del 30%, el cultiu amb nitrogen una concentració del 0%, i en aquest cas no hi havia referència per al cultiu no aerat, de manera que s'ha situat una sonda addicional en aquest reactor, anotant-se les mesures cada hora, observant-se que les concentracions s'aproximaven a zero a partir de les 5 h.

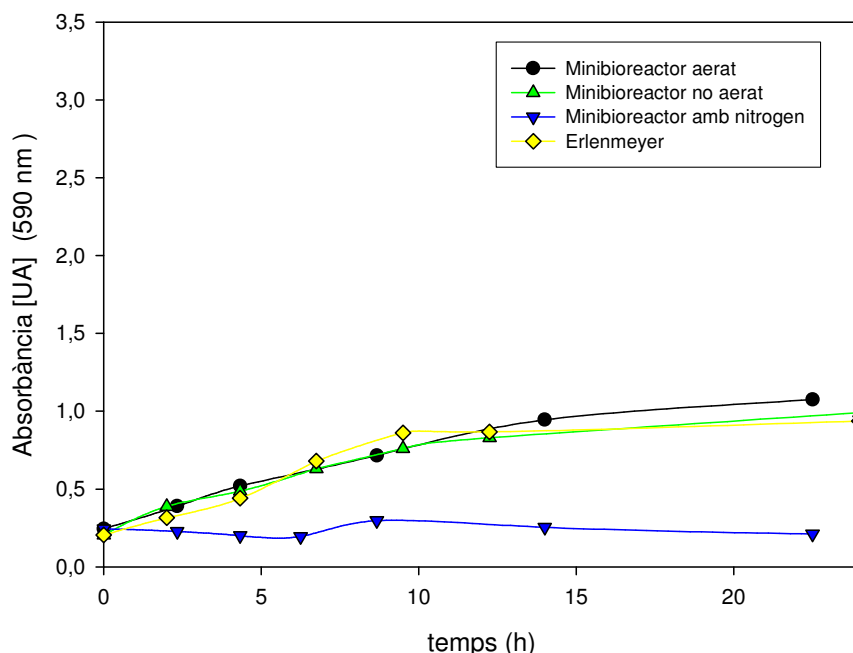


Figura 4.2.3. Corbes de creixement per a un cultiu de *E. coli* en medi mínim (M9) i diferents condicions d'aeració, i a una agitació de 400 rpm. En el cas del minibioreactor aerat, per bombolleig, es realitzava un control de la concentració d'oxigen dissolt al voltant del 30%. En el cas del minibioreactor on es circula un cabal de nitrogen per capçal, el cabal ha estat de 0,4 L/min (mesurat a condicions normals). Com a referència, es presenta el cultiu en un Erlenmeyer sense aeració forçada.

En aquest cas, al haver-hi dinàmiques de creixement menors a les observades en medi ric (LB), no s'observen limitacions de creixement, tot i que en el reactor no aerat la concentració d'oxigen ha estat pròxima a zero en bona part del cultiu. De totes maneres podria haver-hi diferències en el comportament metabòlic, que s'estudiaran a l'apartat 4.4.

Els resultats dels creixements realitzats amb *E. coli* en medi LB semblen indicar que les limitacions de creixement observades anteriorment eren degudes a la manca d'oxigen, de manera que es confirma l'interès de que el disseny del minibioreactor inclogui un sistema de mesura d'oxigen dissolt. D'altra banda, també s'observa que el sistema d'aeració per capçal no serà suficient per mantenir cultius amb dinàmiques de creixement i consum elevades com les dels bacteris. Tot i això, cal tenir en compte que

en medi mínim (M9) l'aeració per capçal és suficient per no provocar limitacions en el creixement. Així doncs, l'aeració per capçal es suficient per realitzar cultius que tinguin dinàmiques de creixement i consum menors sense produir limitacions en el creixement. Tot i això, cal tenir en compte que diferents concentracions d'oxigen en el medi poden portar a diferents comportaments metabòlics (Meyer i Col., 1985; Vila, 2001; Lebanon i Col. 2005) i que per poder-les observar, encara que sigui de forma indirecta, ens caldrà disposar de mesures relacionades, com el pH, com es discutirà a l'apartat 4.3.

Cultiu de llevats

P. pastoris (en medi YPD)

Similarment al que havia esdevingut en els cultius amb *E. coli*, a partir d'un determinat moment s'observen limitacions de creixement, i novament s'explorà si són degudes a limitacions d'oxigen dissolt.

Així, tal com s'havia fet amb *E. coli*, s'ha realitzat un experiment de creixement amb el prototip de minibioreactor (a 400 rpm) i un Erlenmeyer de control. En ambdós casos l'índex emprat ha estat d'aproximadament 0,2 unitats d'absorbància (mesurada a 600 nm), i no s'ha emprat aeració forçada. El seguiment del creixement del cultiu s'ha realitzat mesurant l'absorbància (600 nm) de mostres fora de línia, i per al minibioreactor prototip també s'ha seguit l'oxigen dissolt (Sonda Ingold 3-532-58).

A la figura 4.2.4 es mostren les corbes de creixement i la de l'evolució de l'oxigen dissolt per al minibioreactor prototip. Es pot observar com a partir d'aproximadament les 3 h de cultiu la concentració d'oxigen dissolt s'aproxima a zero. Tot i això, no s'observen diferències significatives en la mesura del creixement dels cultius per absorbància a 600 nm durant aproximadament 8 h. Fins aquest moment la concentració d'oxigen mesurada no havia baixat del 2%, de manera que tot i que limitat, n'hi havia de disponible per al cultiu. A partir de les 8 h els valors de l'oxigen mesurat s'aproximen encara més a zero, i la limitació es fa manifesta, apareixent diferències de creixement entre l'Erlenmeyer de control i el minibioreactor prototip.

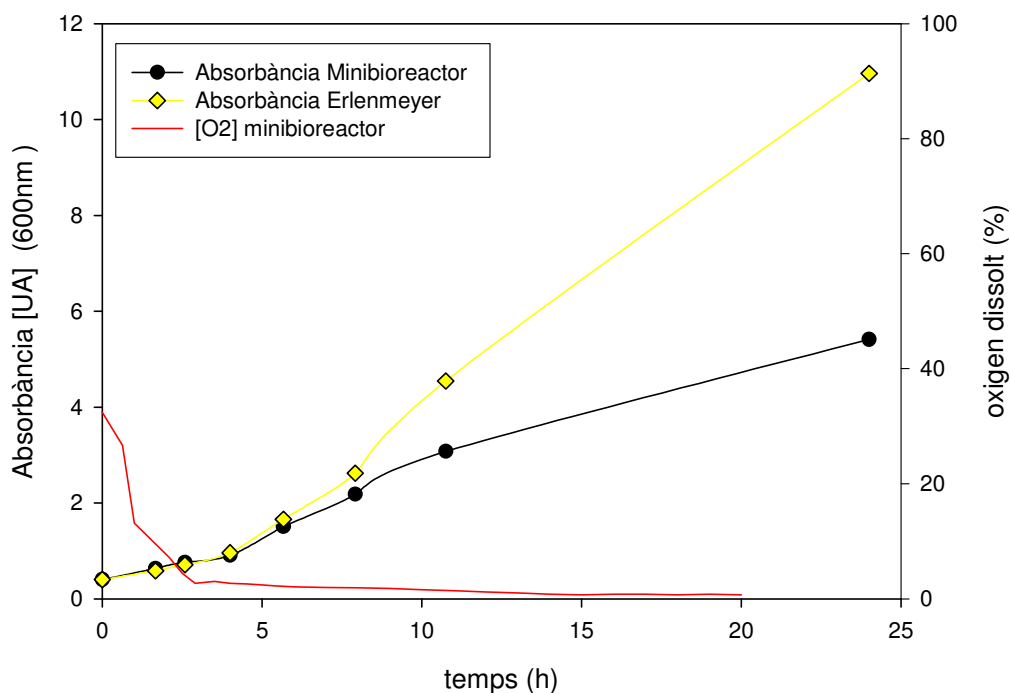


Figura 4.2.4. Seguiment d'oxigen dissolt en un cultiu de *P. pastoris* en medi ric, sense aeració forçada, a 400 rpm d'agitació. Com a referència, es presenta el cultiu en un Erlenmeyer sense aeració forçada.

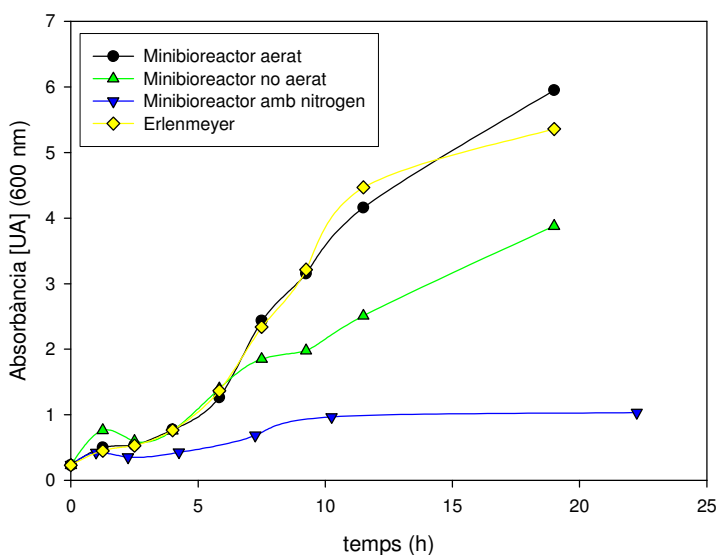
Com s'ha comentat, tot i l'exhauriment de l'oxigen dissolt els cultius realitzats no mostren l'aparició d'una limitació de creixement al mateix instant, sinó que aquesta es presenta unes hores més endavant. Per estudiar més a fons aquest fet, s'ha repetit l'experiment realitzat amb diferents sistemes d'aeració: amb un Erlenmeyer de control, un minibioreactor aerat per bombolleig (controlant una consigna del 30% d'oxigen dissolt), un minibioreactor sense aeració, i un minibioreactor prototip amb circulació d'un cabal de nitrogen. Novament s'han emprat inòculs d'aproximadament 0,2 unitats d'absorbància (mesurada a 600 nm), i una agitació emprant varetes imantades a 400 rpm (en el cas dels minibioreactors).

A les corbes de creixement obtingudes en aquest experiment (figura 4.2.5) s'observa que no hi ha diferència en el creixement entre els cultius realitzats en Erlenmeyer i amb control de l'oxigen dissolt al 30% de saturació. D'altra banda, comparant aquestes dues corbes amb l'obtinguda en el cultiu sense aeració, s'observa que aproximadament a partir de les 7 h de cultiu hi ha una limitació de creixement. Així doncs, tot i que durant el tram inicial del cultiu no aerat la concentració d'oxigen era reduïda (veure figura 4.2.4), l'aportació neta al cultiu mitjançant la transferència per capçal era suficient per mantenir una creixement microaeròbic mantenint la velocitat de creixement (Fredlund i Col, 2004a). Quan la concentració d'oxigen s'ha aproximat més a zero, la velocitat de

creixement es redueix significativament, observant-se una desviació en la corba de creixement respecte una exponencial, mostrant la corba una tendència lineal, típica de creixements amb limitació cinètica o estequiomètrica (Fredlund i Col, 2004b).

Referent a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt, cal recordar que, donada la impossibilitat de realitzar múltiples mesures d'oxigen en paral·lel, la mesura d'oxigen s'ha realitzat únicament amb el minibioreactor del qual es controlava la concentració d'oxigen dissolt al 30% de saturació. De totes maneres, de forma indirecta si que es coneix la concentració d'oxigen present en els altres minibioreactors: aquell en el que circula nitrogen té una concentració del 0% (s'havia comprovat que el cabal de nitrogen era suficient per mantenir tal concentració), i aquell en el que no hi ha aeració forçada és d'esperar que, donada la velocitat de creixement comparable a l'observada a la figura 4.2.4, la concentració sigui propera al 0% a partir d'aproximadament les 3 h de cultiu.

En el cas que es fa circular un corrent de nitrogen i desapareix la disponibilitat d'oxigen, s'observa un cert creixement durant les hores inicials (10 h), a una velocitat específica màxima molt lenta comparada amb els altres cultius, però (el temps de duplicació passa de 2,7 h a 6 h en el cas del cultiu amb un corrent de nitrogen). A partir d'aquest moment el creixement s'atura, i la separació de la corba de creixement respecte els altres cultius encara es fa més notòria.



*Figura 4.2.5. Corbes de creixement per a un cultiu de *P. pastoris* en medi ric (YPD) i diferents condicions d'aeració. En el cas del minibioreactor aerat, per bombolleig, es realitzava un control de la concentració d'oxigen dissolt al voltant del 30%. En el cas del minibioreactor on es circula un cabal de nitrogen per capçal, el cabal ha estat de 0,4 L/min (mesurat a condicions normals). Com a referència, es presenta el cultiu en un Erlenmeyer sense aeració forçada.*

P. pastoris (en medi mínim)

Tal com s'havia comentat per al cas de *E. coli*, amb *P. pastoris* també s'empren un nombre elevat de medis diferents on les dinàmiques de creixement dels cultius poden ser prou diferents. Així, per avaluar les diferències de comportament que hi hauria en un altre medi més pobre en nutrients, s'han realitzat cultius emprant un medi que contenia com a base *Yeast Nitrogen Base* (YNB) i glucosa (veure el detall de la composició a materials i mètodes).

Així, s'ha repetit l'experiment plantejat amb medi YPD, amb un Erlenmeyer de control, un minibioreactor aerat per bombolleig (controlant una consigna del 30% d'oxigen dissolt), un minibioreactor sense aeració, i un minibioreactor prototip amb circulació d'un cabal de nitrogen. Novament s'han emprat inòculs d'aproximadament 0,2 unitats d'absorbància (mesurada a 600 nm), i una agitació emprant varetes imantades a 400 rpm (en el cas dels minibioreactors).

Pel que fa a la mesura de les concentracions d'oxigen, si bé no ha estat mesurada en tots els minibioreactors, com en els casos anteriors, es poden estimar quines han estat les concentracions presents en cadascun dels minibioreactors. El cultiu amb l'oxigen controlat té una concentració (mesurada) al voltant del 30%, el cultiu amb nitrogen una concentració del 0%, i en aquest cas no hi havia referència per al cultiu no aerat, de manera que s'ha situat una sonda addicional en aquest reactor, anotant-se les mesures cada hora, observant-se que les concentracions s'aproximaven a zero a partir de les 10 h.

Els resultats (veure figura 4.2.6) mostren una reducció notable de la velocitat de creixement en medi mínim en comparació amb les observades en medi YPD. Al haver-hi dinàmiques de creixement més lentes, tornem a observar (de la mateixa manera que amb *E. coli*) que la capacitat d'aportar oxigen per capçal no comporta diferències en el creixement. Novament, però, no es pot conèixer si les condicions d'aeració (idèntiques a les emprades en els casos anteriors) diferents provoquen comportaments metabòlics diferents que les mesures d'absorbància fora de línia no ens permeten determinar. En l'apartat 4.4. analitzarem si hi ha variacions en el metabolisme, que en el cas que es produïssin confirmarien la necessitat de seguir més acuradament les concentracions d'oxigen dissolt.

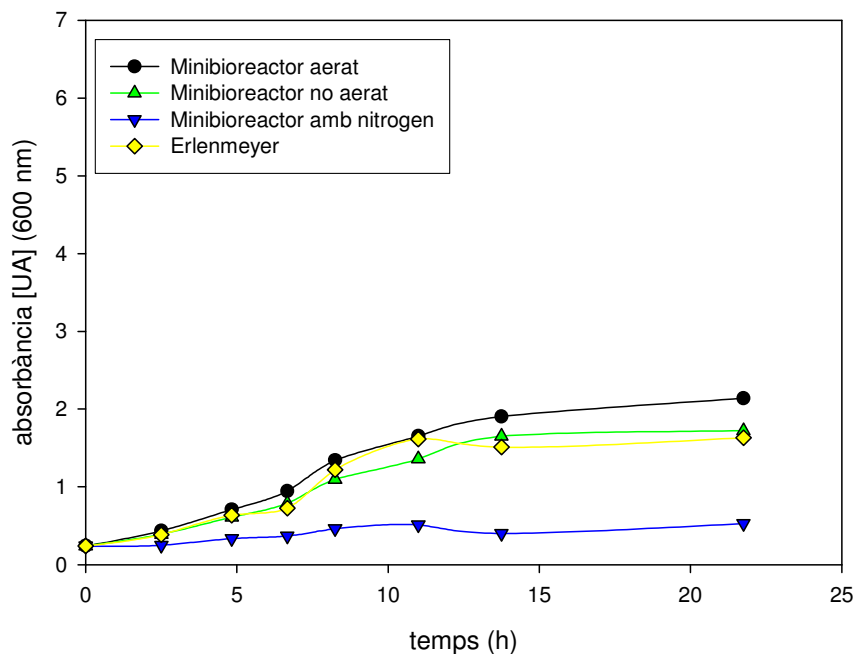


Figura 4.2.6. Corbes de creixement per a un cultiu de *P. pastoris* en medi mínim (YNB+glucosa) i diferents condicions d'aeració. En el cas del minibioreactor aerat per bombolleig, es realitzava un control de la concentració d'oxigen dissolt al voltant del 30%. En el cas del minibioreactor on es circula un cabal de nitrogen per capçal, el cabal ha estat de 0,4 L/min (mesurat a condicions normals). Com a referència, es presenta el cultiu en un Erlenmeyer sense aeració forçada.

Els resultats dels cultius realitzats amb *P. pastoris* indiquen que en un medi ric (YPD) el sistema d'aeració del minibioreactor prototip (capçal) permet prou aeració com per no tenir limitacions de creixement durant les primeres 7-8 h, que es pot considerar que és un rang prou ampli de temps com per realitzar experiments. En cas que es desitgi superar aquest límit temporal serà necessari que el sistema de cultiu en desenvolupament disposi d'un sistema d'aeració amb major capacitat de transferència d'oxigen. D'altra banda, tot i que emprant medis més pobres (en aquest cas YNB+glucosa), l'aeració per capçal sigui suficient com per no provocar limitacions en el creixement, concentracions d'oxigen pròximes a zero poden portar a comportaments metabòlics diferents (Fredlund i Col, 2004a, 2004b), tal com s'havia comentat en el cas de *E. coli* (la discussió referent a aquesta hipòtesi es realitzarà a l'apartat apartat 4.3).

Cultiu de cèl·lules animals

Hibridomes (en medi DMEM)

De forma similar al que s'ha fet pels casos amb *E. coli* i *P. pastoris*, s'ha realitzat una monitorització de la concentració d'oxigen en un cultiu, per tal d'identificar possibles limitacions.

Les condicions experimentals en aquest cas han contemplat l'aeració mitjançant polsos discontinus d'aire al 5% de CO₂, de 30 s cada 5 min, ja que era necessari mantenir una atmosfera al 5% de CO₂ per tal d'equilibrar el pH (el sistema per a tamponar-lo es basa en els equilibris entre les formes CO₂, H₂CO₃, HCO₃⁻, i CO₃²⁻). Com a equips de cultiu s'han emprat un flascó on no s'ha aplicat agitació ni aeració (aquesta s'aconsegueix per un filtre de venteig que hi ha a la tapa del flascó, que es situa dins un incubador al 5% de CO₂), i un sistema de cultiu agitat sense estrès per cisalla, on s'ha introduït una sonda d'oxigen dissolt. Els inòculs han estat aproximadament de 2x10⁵ Cèl·l./mL.

A la figura 4.2.7 es mostren les corbes de creixement obtingudes amb el sistema agitat i el flascó de control, observant-se elevades similituds entre ambdues. Pel cas del cultiu agitat, també es mostra el seguiment de la concentració d'oxigen dissolt, que no ha baixat en cap moment del 50%. En aquest cas no es mostra la concentració de cèl·lules no viables ja que la viabilitat s'ha mantingut per sobre del 95% durant tot el cultiu.

Així doncs, es pot constatar que el consum d'oxigen d'aquesta línia cel·lular és molt més reduït que els observats en els casos de bacteris i llevats, ja que la concentració es manté en tot moment en valors superiors al 50%. I tal com mostren experiments realitzats prèviament amb la mateixa línia cel·lular (Sanfeliu, 1995), no és fins per sota del 10% on s'observen limitacions al creixement. En el cas d'altres hibridomes murins (Ozturk i Palsson, 1991), és entre un 20 i un 80% d'oxigen dissolt on no hi ha variacions significatives en el creixement, tot i que si variacions en els consums específics dels principals nutrients (glucosa, glutamina), que augmenten progressivament amb la concentració d'oxigen dissolt, fins a assolir unes diferències màximes (entre el 20 i el 100% d'oxigen dissolt) d'un 23% en el cas de la glucosa, i un 42% en el de la glutamina. I també varia el rendiment glucosa/làctic, que es redueix un 10% entre el 20 i 100% d'oxigen dissolt (Ozturk i Palsson, 1991).

Una altra observació a destacar en la figura és que, aproximadament a les 57 h de cultiu s'observa una inversió en la tendència d'evolució de la concentració d'oxigen dissolt, que passa d'anar-se reduint progressivament a tornar a augmentar. Anàlisis fora de línia han permès demostrar que en aquest instant s'assolia una limitació de glutamina en el

medi de cultiu, de manera que el metabolisme cel·lular (i també el consum d'oxigen) es veia frenat. A diferència de la mesura de creixement a partir de dades d'absorbància, que no detecta la presència de limitacions fins hores més endavant, l'oxigen dissolt si que permet detectar-les en temps real.

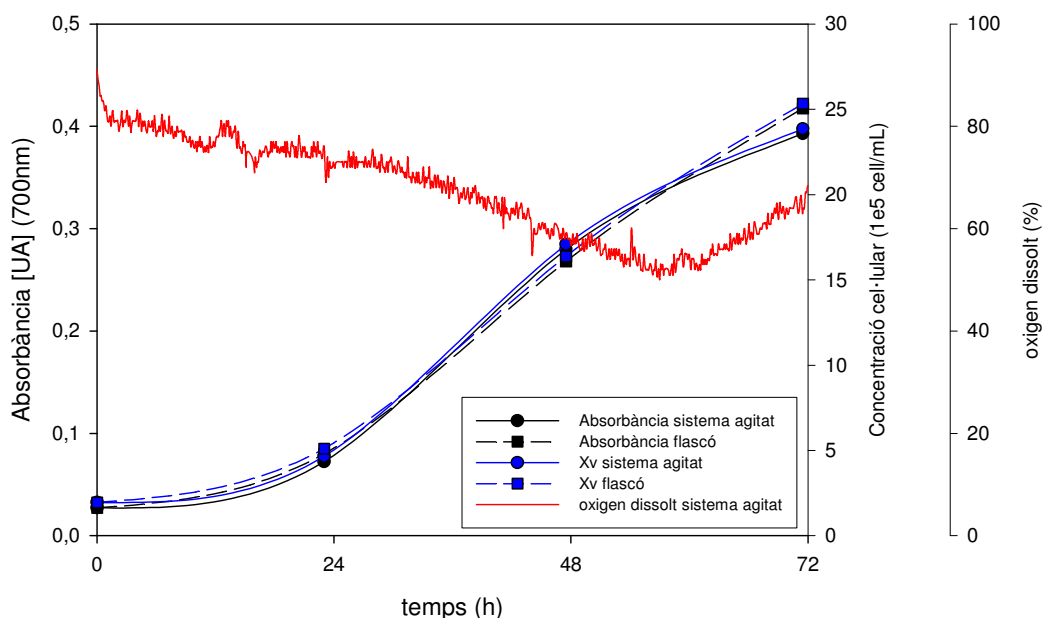


Figura 4.2.7. Corbes de creixement per a una línia cel·lular d'hibridoma, creixent en medi DMEM amb suplement (veure taula 4.1.4), en un sistema de cultiu agitat, així com en un flascó de control. El creixement ha estat seguit mitjançant el recompte fora de línia de cèl·lules viables (Xv), de l'absorbància a 700 nm, i en el cas del cultiu en el sistema agitat, també s'ha realitzat un seguiment de la concentració d'oxigen dissolt.

Concloent els experiments inicials realitzats amb cèl·lules animals, és pot afirmar que el sistema d'aeració per capçal és suficient per mantenir el valor de l'oxigen dissolt en concentracions no limitants. De totes maneres és interessant conèixer la concentració d'oxigen dissolt per tal d'assegurar la no presència de limitacions. Finalment, es pot afirmar que la mesura d'oxigen també es presenta com un bon indicador de l'aparició de limitacions en el medi o altres esdeveniments que puguin provocar una frenada del metabolisme del cultiu.

4.3. Consideracions per al seguiment del consum d'oxigen

Si bé les variables que s'ha definit incorporar al sistema de cultiu a desenvolupar són la temperatura, concentració cel·lular, pH, i oxigen dissolt, a partir d'aquesta darrera mesura hi ha mètodes per seguir el consum d'oxigen, que sense necessitat de cap sonda addicional permeten obtenir informació addicional sobre el metabolisme cel·lular. Potencialment aquest indicador permet seguir l'evolució del cultiu, essent proporcional a la velocitat de creixement (sempre i quan el rendiment cèl·lula/substrat per a l'oxigen es mantingui) (veure relació a l'equació 4.1), i detectant a temps quasi-real l'aparició de limitacions o de problemes en el cultiu que provoquin una frenada del metabolisme (el qualificatiu *quasi*- es refereix a que aquesta mesura normalment no es realitza en línia sinó cada cert nombre d'hores).

$$\text{Consum d'oxigen} = q_{O_2} \cdot X = (1/Y_{X/O}) \cdot \mu \quad \text{Eq. 4.1}$$

A la figura 4.2.8 es presenta un exemple de les potencialitats de seguiment del consum d'oxigen (a partir d'aquí *Oxygen Uptake Rate*, OUR), on es pot veure una etapa inicial amb condicions de creixement balancejat i exponencial, on el seguiment del consum d'oxigen és proporcional al creixement del cultiu, i on una vegada es produeix una determinada pertorbació (en el cas presentat es donava un exhauriment d'un dels nutrients, en concret la glutamina), el consum d'oxigen cau dràsticament, i tot i que amb una dinàmica més lenta, els recomptes cel·lulars també ho mostren. D'acord amb aquesta observació, l'avantatge de la mesura d'OUR és que pot detectar canvis en la dinàmica del cultiu d'una forma molt ràpida i directament lligada amb canvis metabòlics del cultiu, sense necessitat d'esperar a veure les seves conseqüències sobre la mesura de la concentració cel·lular.

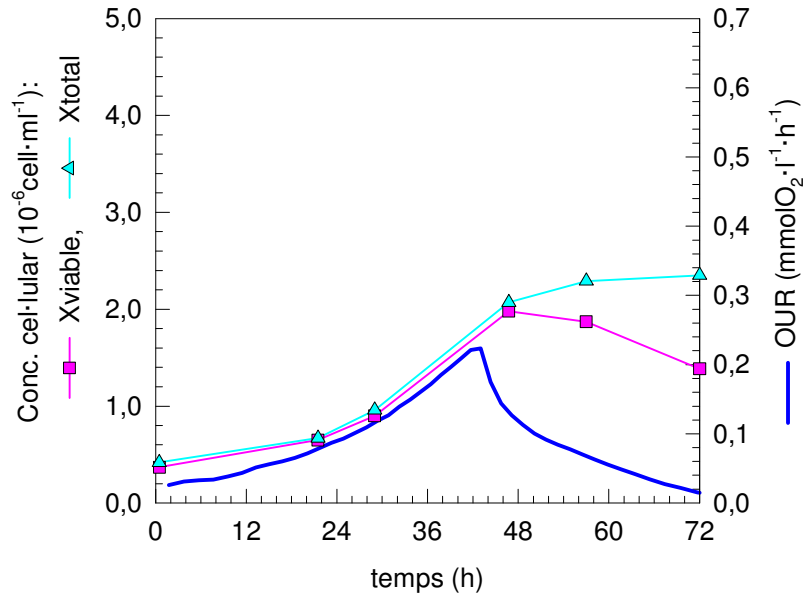


Figura 4.2.8. Figura exemplificativa del seguiment del consum d'oxigen comparativament amb el seguiment de la concentració de cèl·lules viables i totals respecte el temps. Font: Gámez, 2000.

En aquest apartat es realitza un estudi preliminar de la possibilitat de realitzar el seguiment del consum d'oxigen amb els diferents models cel·lulars que s'han escollit com a referència. L'objectiu bàsic és determinar, de forma prèvia, en quins d'ells aquestes mesures són possibles i quina és la seva finestra d'aplicació.

El model que es planteja per a la realització dels càlculs de la OUR es basa en el mètode dinàmic (veure explicació al capítol de Materials i mètodes). Resumint aquest mètode, en els instants en què es desitja fer la mesura, s'atura l'aeració del cultiu i es passa un corrent de nitrogen, de manera que la desaparició de l'oxigen dissolt es deu en part a la desorció per part del corrent de nitrogen, i en part al consum del cultiu. Parlant en termes referits al balanç de matèria per a l'oxigen dissolt, durant el pas del corrent de nitrogen aquest mostra un terme d'acumulació (corba de caiguda de la concentració de l'oxigen, $d[O_2]/dt$) degut al consum per part de les cèl·lules ($q_{O_2} \cdot X$) i a la desorció en el corrent de nitrogen ($K_L a ([O_2^*] - [O_2])$). A continuació es presenta breument el desenvolupament d'aquest balanç (Eq. 4.2-4.3) i se'n descriuen amb detall els termes:

$$A = (E-S) + G \quad \text{Eq. 4.2}$$

Desenvolupant termes, i tenint en compte que no hi ha entrada d'oxigen:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = K_L a ([O_2^*] - [O_2]) + q_{O_2} \cdot X \quad \text{Eq. 4.3}$$

on,

$K_L a$ és el coeficient de transferència de l'oxigen dissolt [temps⁻¹]

$[O_2^*]$ és la concentració d'oxigen en equilibri amb l'atmosfera del capçal del minibioreactor, que al estar saturat de nitrogen durant la realització de la mesura, és zero [massa/volum].

$[O_2]$ és la concentració d'oxigen en el medi del minibioreactor [massa/volum]

q_{O_2} és el consum específic d'oxigen [massa/(massa·temps)]

X és la concentració cel·lular present en el minibioreactor [massa/volum]

Per tal d'avaluar la viabilitat de realitzar mesures de OUR s'han realitzat simulacions emprant l'equació anterior (Eq. 4.3), prenent com a referència valors bibliogràfics de consums específics (q_{O_2}) i de concentració cel·lular (X) que podrien existir durant els cultius dels diferents organismes que s'han escollit com a models (*E. coli*, *P. pastoris* i híbridoma).

Prèviament a la realització de les simulacions, ha calgut determinar el coeficient de transferència ($K_L a$) del minibioreactor prototip per disposar de prou informació com per poder aplicar el model de simulació. Concretament, s'ha realitzat un experiment amb el minibioreactor prototip del qual es disposa (figura 4.1.2), emprant d'una banda una vareta imantada a 400 rpm (condicions agitació emprades per a *E. coli* i *P. pastoris*), i d'altra banda el sistema d'agitació no estressant emprat per a cèl·lules animals. En cada cas, les mesures s'han realitzat partint del 100% de saturació d'oxigen dissolt en el líquid (20 mL d'aigua destil·lada, suposant una relació Altura/Àrea superficial de 0,29 cm/cm²) i fent circular un cabal de nitrogen per capçal de 0,4 L/min (mesurat a condicions normals) per tal de desorbir l'oxigen present en el líquid, i calcular el coeficient de transferència (per a més detall, veure el capítol de materials i mètodes).

En el cas de l'agitació amb vareta imantada, el coeficient de transferència mesurat ha estat de $K_L a = 6,0 \text{ h}^{-1}$, mentre que el valor obtingut amb el sistema d'agitació no estressant (per a cèl·lules animals) ha estat d'aproximadament $K_L a = 3,0 \text{ h}^{-1}$.

A partir d'aquests valors ja es disposa de prou informació com per realitzar simulacions en el cas de cada hipotètic cultiu, a partir de concentracions cel·lulars de treball i consums específics d'oxigen obtinguts de la bibliografia. Bàsicament el que es desitja avaluar són les dinàmiques de caiguda de la concentració d'oxigen dissolt en hipotètiques mesures de OUR, per tal de veure si aquestes seran prou més lentes que la

constant de temps de les sondes d'oxigen com per permetre una mesura d'OUR de manera fiable o no.

Avaluació de la possibilitat de realitzar un seguiment de OUR en cultius d'E. coli

Per a aquest tipus de cultiu, la validesa de la realització de mesures de OUR està subjecte a la utilització de sistemes d'aeració per bombolleig, ja que s'ha vist que amb aeració per capçal, la transferència d'oxigen no era suficient. Cal tenir en compte que, amb els sistemes d'aeració per capçal, les concentracions mesurades per als cultius de *E. coli* realitzats han estat en tot moment pròximes a zero i per a realitzar mesures de OUR amb el mètode dinàmic s'ha de partir de concentracions elevades, i a partir d'aquí realitzar caigudes mitjançant el pas de nitrogen.

En aquest cas, la simulació realitzada ha contemplat un consum específic bibliogràfic, en el cas de *E. coli*, amb un valor de 17,75 mmol O₂ / (g Cèl·l·xh) (Vidal, 2006) i ha simulat caigudes d'oxigen del 60 al 10% de saturació d'aire. Les concentracions cel·lulars per a les quals s'avalua la OUR es situen entre 0,082 g/L (corresponent a una absorbància a 590 nm de 0,2 UA), i 1,06 g/L (corresponent a una absorbància a 590 nm de 2,5 UA), que són les concentracions assolides en els cultius anteriors en medi ric i amb un control de la concentració d'oxigen a un 30% de la concentració de saturació.

A la figura 4.2.9 s'observen les corbes de caiguda de la concentració en la realització d'hipotètiques OUR. Tal com es pot veure a la figura, tot i que es disposi d'un sistema d'aeració per a mantenir el % d'oxigen dissolt, a les concentracions cel·lulars esperades per a un cultiu de *E. coli*, les velocitats de consum seran tan elevades que les caigudes d'oxigen dissolt seran tant ràpides (a partir d'una concentració cel·lular de 0,32 g/L amb un temps menor a 50 s) com perquè en una bona part del cultiu s'aproximin a l'ordre de magnitud del temps de resposta de la sonda d'oxigen, valor que per a una sonda polarogràfica comercial es situa habitualment a τ (63,2%) = 15-30 s. En aquesta zona, si es desitja realitzar mesures puntuals d'OUR, aquestes acumularan un error important, ja que s'estarà mesurant un temps de caiguda proper al temps de resposta de la sonda.

Una primera estratègia per minimitzar l'error acumulat contemplaria la inclusió del temps de resposta de la sonda en els balanços emprats per al càlcul de la OUR. D'altra banda, una estratègia alternativa contemplaria la realització d'un nombre molt elevat de caigudes entre concentracions d'oxigen properes, emprant les fluctuacions pròpies dels controladors de la concentració d'oxigen dissolt, per al càlcul de la OUR (Vanrolleghem i Lee, 2003). De totes maneres, cal tenir en compte que tot i que es pugui reduir l'error, el fet que el temps de caiguda de l'oxigen i el temps de resposta de la sonda siguin del mateix ordre implicarà en qualsevol cas un major error potencial.

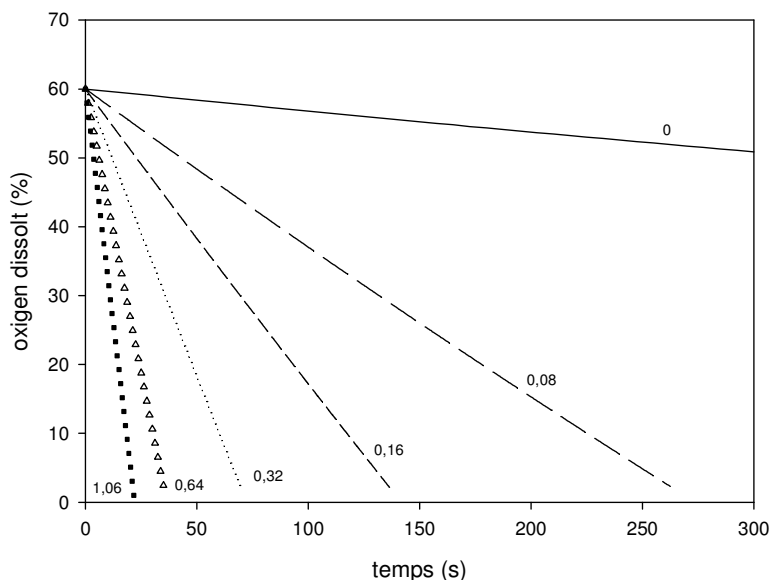


Figura 4.2.9. Evolució de la concentració d'oxigen dissolt durant la realització de mesures de OUR, a concentracions de 0 g/L, 0,08 g/L, 0,16 g/L, 0,32 g/L, 0,64 g/L i 1,06 g/L.

Avaluació de la possibilitat de realitzar un seguiment de OUR en cultius de *P. pastoris*

Tal com passava en el cas anterior, per a aquest tipus de cultiu la validesa de la realització de mesures de OUR està subjecta a la utilització de sistemes d'aeració per bombolleig, ja que s'ha vist que amb sistemes per capçal, la transferència d'oxigen no era suficient, i per a poder realitzar mesures de OUR caldrà disposar de concentracions d'oxigen siguin prou elevades com per realitzar caigudes d'oxigen en un rang prou ampli.

En aquest cas s'ha realitzat les simulacions amb concentracions de cèl·lules entre 0,05 g/L (corresponent a una absorbància a 600 nm de 0,2 UA) i 1,38 g/L (absorbància a 600 nm de 6,0 UA), que són les concentracions assolides en els cultius anteriors en medi ric i amb un control d'aeració al 30% d'oxigen dissolt. El consum específic bibliogràfic emprat en aquest cas és de 2,73 mmol O₂ / (g Cèl·l.xh) (Solà i Col., 2004).

A la figura 4.2.10 es mostren les corbes de caiguda de la concentració en la realització d'hipotètiques OUR. En aquest cas es tracta d'un microorganisme amb un consum d'oxigen menor, de manera que durant la major part del cultiu el temps necessari per a realitzar les caigudes serà prou superior al temps de resposta de la sonda d'oxigen ($\tau = 15-30$ s) com perquè l'error sigui potencialment reduït (fins a concentracions cel·lulars de 0,23 g/L el temps per a realitzar caigudes d'oxigen entre el 60 i 10% és superior a uns 500 s). De totes maneres, quan s'arriba a les concentracions màximes que s'espera que assoleixi el cultiu (0,92 g/L i 1,38 g/L de cèl·lules), els temps de caiguda es situen

al voltant de 100 s, més propers al temps de resposta de la sonda, afavorint un major error en les mesures.

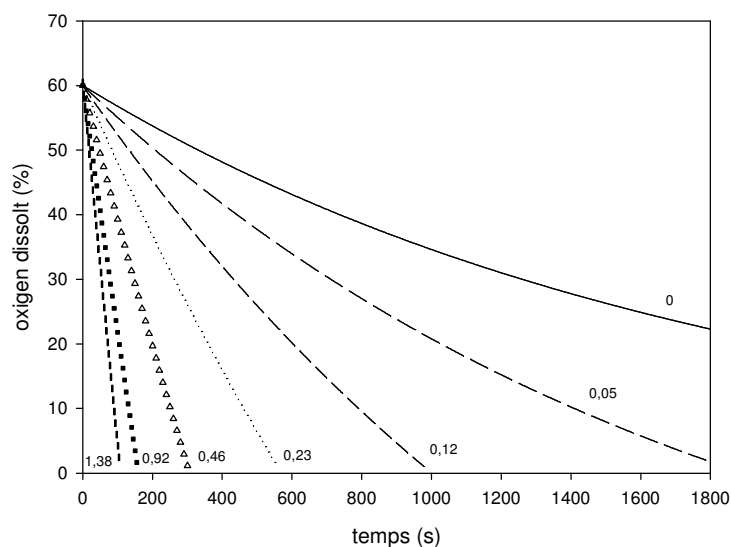


Figura 4.2.10. Evolució de la concentració d'oxigen dissolt durant la realització de mesures de OUR, a concentracions de 0 g/L, 0,05 g/L, 0,12 g/L, 0,23 g/L, 0,46 g/L, 0,92 g/L i 1,38 g/L.

Avaluació de la possibilitat de realitzar un seguiment de OUR en cultius d'hibridoma

A diferència dels casos anteriors, en aquest la dinàmica de consum del cultiu és molt més lenta, de manera que la OUR podria ser aplicada directament a partir d'un sistema d'aeració per capçal.

En aquest cas s'ha realitzat simulacions amb concentracions de cèl·lules entre 2×10^5 Cèl·l./mL i 25×10^5 Cèl·l./mL (aproximadament el rang de concentracions obtingut en el cultiu mostrat a la figura 4.1.8), i s'ha emprat un consum específic obtingut de la bibliografia de $192,0 \text{ nmol O}_2 / (10^6 \text{ Cèl·l.} \times \text{h})$ (Gámez, 2000).

A la figura 4.2.11 es mostren les corbes de caiguda de l'oxigen dissolt obtingudes de les simulacions, on una caiguda com les que es poden utilitzar habitualment per al càlcul de OUR amb hibridomes (Gámez, 2000), amb una variació de concentracions entre el 60 i 30% de saturació d'oxigen dissolt, oscil·larà potencialment entre els 6 i els 40 min. Així doncs, en aquest cas, al estar prou lluny dels temps de resposta habituals, la realització de mesures de OUR amb minibioreactors amb coeficients de transferència com els determinats és viable i no s'espera una elevada acumulació d'errors deguts a la dinàmica de la sonda.

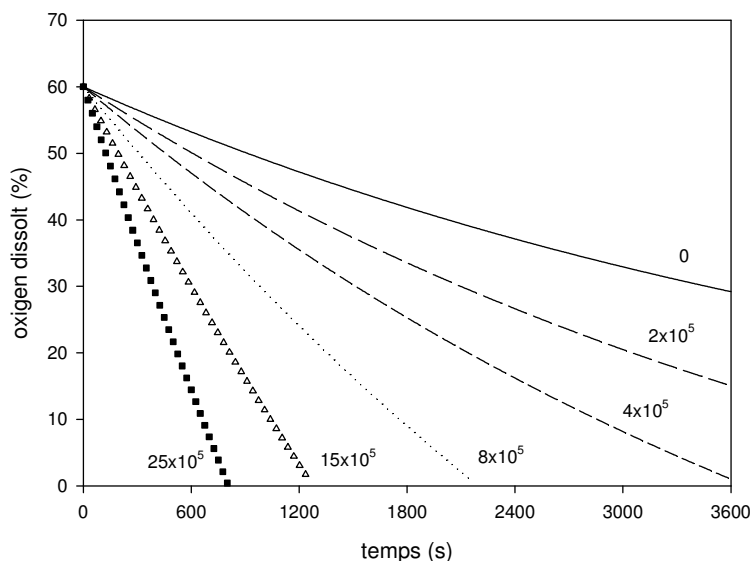


Figura 4.2.11. Evolució de la concentració d'oxigen dissolt durant la realització de mesures de OUR, a concentracions de 0 , 2×10^5 Cèl·l./mL, 4×10^5 Cèl·l./mL, 8×10^5 Cèl·l./mL, 15×10^5 Cèl·l./mL, 25×10^5 Cèl·l./mL.

Com a conclusions globals de l'avaluació de la possibilitat de realitzar el seguiment del cultiu mitjançant mesures de OUR, es pot comentar que per a bacteris i llevats s'espera que el temps necessari per a la realització de les corbes de caiguda d'oxigen dissolt (procediment bàsic de la mesura) sigui proper al temps de resposta de la sonda, com a mínim en determinats trams del cultiu, de manera que potencialment l'error en la mesura de OUR pot ser elevat, si més no emprant el mètode dinàmic que es planteja. D'altra banda, per a cèl·lules animals, al tenir una dinàmica de consum molt menor, el temps necessari per a realitzar les caigudes és considerablement major al temps de resposta de les sondes d'oxigen dissolt, de manera que s'espera la realització de la mesura és viable i no s'espera que s'acumuli error degut a interferències de la pròpia dinàmica de la sonda.

4.4. Consideracions per al seguiment de pH

Com s'ha esmentat a l'inici del capítol, les mesures que es planteja utilitzar per al seguiment dels cultius en els experiments de cribat són l'absorbància, que permet el seguiment del creixement cel·lular, la concentració d'oxigen dissolt, que permet avaluar si aquest ha limitat el cultiu, i finalment el pH. El pH és un altre paràmetre d'elevada importància en els bioprocessos, ja que els òptims de creixement/producció de cada organisme es troben en determinats rangs i per a un correcte desenvolupament de

bioprocessos cal conèixer si els valors de pH dels cultius realitzats s'allunyen dels rangs desitjats o no.

A banda d'aquesta necessitat de conèixer el pH, en aquest apartat s'avaluarà aquesta variable com a indicador metabòlic. Posant com exemple les mesures d'oxigen obtingudes en l'apartat anterior, on en determinats casos mostraven limitacions que no es traduïen en corbes de creixement diferents, el pH s'estima que també pot ser una mesura que porti informació complementària. Això s'espera que sigui així ja que en tots els models cel·lulars estudiats el seu metabolisme produeix variacions de pH. El cas que hi hagi consum de glucosa o altres sucres, el catabolisme d'aquest substrats generarà lactat, acetat, o bé altres àcids carboxílics (depenent de l'organisme), generant una acidificació del medi de cultiu. En el cas de consumir amoni, aminoàcids o bé pèptids, la tendència serà la inversa: aquestes reaccions metabòliques tendiran a fer augmentar el pH. Així doncs, el seguiment de pH pot aportar informació sobre quina és l'activitat metabòlica principal que s'està esdevenint en un determinat cultiu, així com sobre els canvis metabòlics que es poden produir en un determinat cultiu si hi ha un exhauriment d'un determinat substrat. Addicionalment cal tenir en compte que en casos on el catabolisme de sucres porti a la producció d'àcids, aquesta pot ser deguda, en part, a la saturació dels mecanismes aerobis de catabolisme de les fonts de carboni, però també es pot veure potenciada enfront limitacions d'oxigen dissolt. Així, en aquells casos de l'apartat anterior on hi havia limitació d'oxigen i no es veia traduïda en diferències de creixement (mesurat per absorbància), es podrien donar diferents comportaments metabòlics, i es planteja que el seguiment de pH pugui ser una eina per tal de identificar-les.

Cultiu de bacteris

E. coli (en medi LB)

L'experiment realitzat amb aquest microorganisme ha estat anàleg al realitzat a l'apartat anterior on s'han emprat diferents condicions d'aeració i per tal de comparar les corbes de creixement, i en aquest cas, també els seguiments de pH. Les condicions emprades són les següents: 1) Erlenmeyer sense aeració forçada, però on el moviment orbital del líquid afavoreix l'entrada d'oxigen al medi, 2) Minibioreactor prototip amb aeració per bombolleig (controlant una consigna del 30% d'oxigen dissolt), 3) Minibioreactor prototip sense aeració, i 4) Minibioreactor prototip amb circulació d'un cabal de nitrogen, per assegurar que no hi ha disponibilitat d'oxigen al cultiu. En aquest experiment, novament s'han emprat inòculs d'aproximadament 0,2 unitats d'absorbància (mesurada a 590 nm), i una agitació emprant varetes imantades a 400 rpm

(en el cas dels minibioreactors). El pH ha estat mesurat únicament als minibioreactors mitjançant una sonda comercial (Hamilton Policlave 200).

A la figura 4.4.1 es mostren les corbes de creixement obtingudes a partir de l'absorbància (a 590 nm), així com les evolucions del pH mesurades. Prèviament a l'anàlisi del pH, es poden esmentar les diferències observades en el creixement (ja discutides a l'apartat 4.2): amb aeració per bombolleig el creixement és molt similar a l'observat en un Erlenmeyer, quan no hi ha aeració s'observa una certa limitació, i quan es fa circular un cabal de nitrogen per capçal, el creixement és molt reduït.

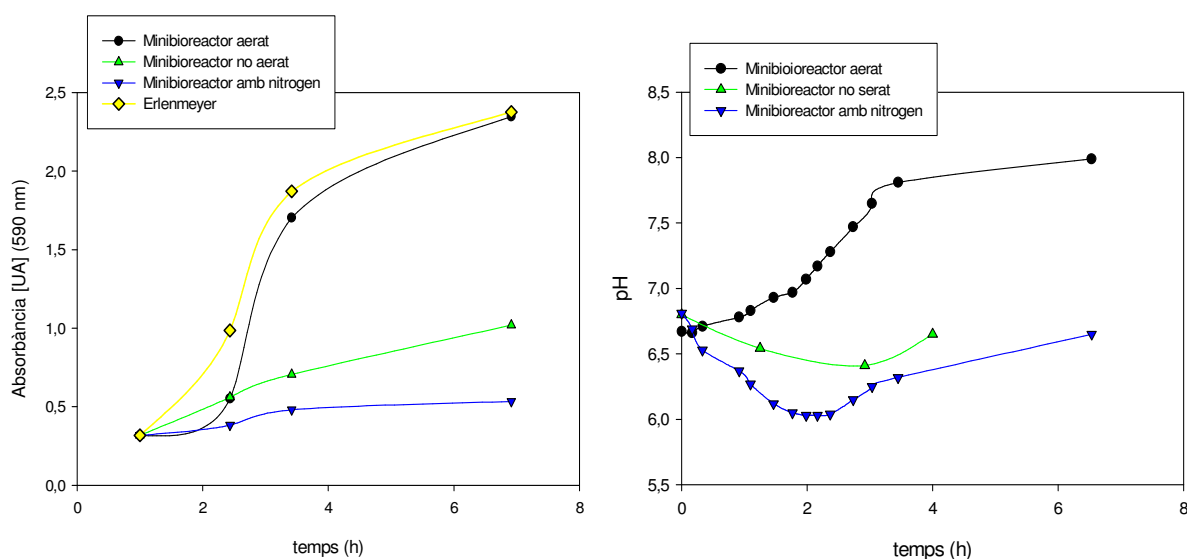


Figura 4.4.1. Seguiment de l'evolució del pH en cultius de *E.coli* en medi ric (LB), a diferents condicions d'aeració.

Pel que fa a l'evolució del pH, en els cultius aerats per bombolleig (a una concentració d'oxigen dissolt al voltant d'un 30%), l'evolució del pH mostra una basificació progressiva, d'acord amb el descrit prèviament a la bibliografia (Kensy i Col., 2005) deguda al consum de determinades espècies presents en la peptona i extracte de llevat del medi. Entre els components d'aquests trobem pèptids, aminoàcids lliures i sucres (Zhang i Col., 2002). En el cas que hi hagi un metabolisme principalment respiratori, succeirà que els sucres consumits produiran principalment CO_2 i H_2O , o bé que la proporció d'àcids hipotèticament produïts a partir d'aquests tenen una capacitat d'acidificació molt menor que la de basificació de pèptids i aminoàcids, que al ser consumits produiran un increment en el pH. Una vegada assolit un *plateau* de creixement, el pH s'estabilitza.

En el cas d'un cultiu sense cap aeració addicional a la que pot rebre per capçal, la tendència en la variació observada és d'una acidificació inicial, seguida d'una basificació posterior. Aquesta tendència fa pensar que tot i que hi hagi una certa presència d'oxigen dissolt, el metabolisme és més anaerobi que respiratori, la qual cosa implicaria una major producció d'àcids a partir dels sucres presents en el medi, amb la subseqüent acidificació del cultiu. Es coneix que l'extracte de llevat té un contingut entre un 2 i un 17% de trehalosa (Zhang i Col, 2002), un sucre dimèric que pot ser consumit donant peu a la producció d'àcids. La discussió sobre quins són exactament els àcids produïts i quines les vies metabòliques actives no és l'objectiu d'aquest treball ni dels minibioreactors desenvolupats, però sí que és interessant tenir indicadors que obrin les portes a aquest tipus de discussions perquè siguin treballades amb més profunditat, en cas que sigui d'interès. Tal com es veu a la figura, passat l'estadi inicial on hi ha una acidificació del cultiu (fins a les 2-3 h), depenent de l'anaerobiosi del sistema, la tendència de variació del pH s'inverteix. A partir d'aquest punt, una possible disminució en la concentració de sucres duria a un canvi metabòlic, per al qual es realitzen diverses hipòtesis, que es poden donar de forma combinada. Una possibilitat seria que es passessin a consumir els àcids produïts, que per a ser demostrada caldria realitzar anàlisis per a determinar l'evolució de la concentració d'aquests compostos, tot i que ja ha estat postulada per autors com Kumari i Col. (2000), que han estudiat el consum de l'àcid acètic produït en les etapes inicials del cultiu. I la segona possibilitat seria l'activació del consum d'aminoàcids quan altres fonts de carboni s'exhaureixen, i quan el pH disminueix, ja que en aquest punt s'activen descarboxilases d'aminoàcids (Stancik i Col., 2002). Cal esmentar que tot i la tendència inicial de disminució de pH mostri la producció d'àcids a partir de sucres, sense la realització d'anàlisis acurats no es pot descartar que es doni tant aquest consum com el de pèptids i aminoàcids lliures que, o bé es dona en un grau menor, o bé té una menor capacitat de variació del pH en comparació al consum anaerobi de sucres. Cal remarcar que l'objectiu d'aquests experiments no és desvetllar les raons per les quals hi ha diferents evolucions del pH, però sí posar de manifest la necessitat de seguir el pH ja que pot mostrar diferències en el comportament metabòlic que, posades de relleu, i en el cas que siguin d'interès per als usuaris dels equips que es desenvoluparan, puguin ser estudiades amb més detall.

Finalment, en el cas que es fa circular un corrent de nitrogen per tal de simular una situació en que no hi hagi disponibilitat d'oxigen, la tendència és similar al cas anterior, tot i que amb una acidificació inicial més marcada, que pot ser deguda a dos fets: un, que en aquest cas el metabolisme és plenament anaerobi, i el segon, pot tenir una relació amb la utilització inicial dels pèptids i aminoàcids lliures que es suposava pel cas anterior, que en aquesta ocasió, si existeix, seria menor.

La conclusió principal que es pot extreure a partir de les diferents observacions realitzades és que, completant les dades que mostrava el seguiment del creixement (absorbància), el seguiment de pH mostra les diferències entre els cultius aerats (sense limitació d'oxigen), que bàsicament presenten una basificació del medi de cultiu, i els cultius amb limitació d'oxigen, que inicialment presenten una acidificació, major, com major sigui la limitació d'oxigen, fins que, probablement al assolir-se una limitació en els sucres disponibles, es produeix un canvi metabòlic i la tendència passa a ser de basificació.

E.coli (en medi mínim)

De la mateixa manera que s'ha realitzat en l'apartat anterior, en aquest també es repeteixen els experiments en medi LB acabats de discutir, en un medi més pobre en nutrients (M9), per tal d'avaluar possibles diferències de comportament. Així, amb les mateixes condicions descrites per al medi LB, novament s'ha realitzat un seguiment del pH en cultius amb aeració per bombolleig (al 30% d'oxigen dissolt), sense aeració, i amb circulació d'un cabal de N₂ per capçal.

A la figura 4.4.2 es mostra el seguiment del creixement mitjançant mesures d'absorbància (590 nm) fora de línia, així com l'evolució del pH. A la figura 4.4.3 es mostra l'evolució de la concentració de glucosa. En aquest cas, al tractar-se de cultius en un medi definit amb una única font de carboni, es pot seguir aquest sucre per identificar l'instant en què s'exhaureix, i refinar les possibles hipòtesis sobre el metabolisme cel·lular.

A la figura 4.4.2 s'observa que en aquest medi el creixement és notablement més lent que en LB, tal com s'havia observat a l'apartat 4.2. Probablement aquesta cinètica de creixement més lenta permeti que la velocitat de creixement observada sigui la mateixa en Erlenmeyer, en els minibioreactors amb aeració per bombolleig o per capçal. No obstant, tot i que aparentment no hi hagi limitació, el seguiment del pH permet observar diferències significatives en el metabolisme. Tot i que de forma general, en tots els casos s'observa una acidificació progressiva mentre hi ha glucosa disponible (tal com mostra la bibliografia respecte el creixement de *E. coli* en medis definits, Zanzotto i Col., 2004), mentre en el cultiu aerat hi ha una fase inicial d'acidificació lenta, en el cultiu sense aeració la l'acidificació inicial és significativament major, molt semblant a la del cultiu on s'ha procurat mantenir una major grau d'anaerobiosi mitjançant la circulació d'un cabal de N₂.

Referent als àcids produïts, tot i que no s'han realitzat els anàlisis per a determinar-los, nombrosos autors han estudiat la producció d'àcids orgànics per part de *E. coli*, tant en condicions anaeròbies (Solé i Col., 2000), com també en aeròbies (Kumari i Col., 2000), ja que per col·lapses en el metabolisme de la glucosa, en aquest cas també hi ha formació d'àcids (Vila, 2001). Segons aquestes referències bibliogràfiques, en *E. coli* els àcids produïts majoritàriament són acetat, lactat, succinat, i formiat.

L'observació de la figura 4.4.2 també permet combinar que l'aportació d'oxigen per capçal és vital per a que el cultiu no només pugui mantenir les seves funcions vitals i també pugui créixer, ja que en el cas que es passa un corrent de nitrogen per capçal, no hi ha hagut creixement del cultiu. Mentre en el cultiu aerat amb nitrogen hi ha una disminució progressiva del pH, que frena cap a les 9 h, en els cultius que tenen una major disponibilitat d'oxigen dissolt això no és així. En aquests casos, una vegada la glucosa s'exhaureix (veure figura 4.4.3), entre les 10-15 h, hi ha un augment molt lleuger del pH, probablement degut al consum dels àcids produïts, tal com han observat altres autors (Kumari i Col., 2000).

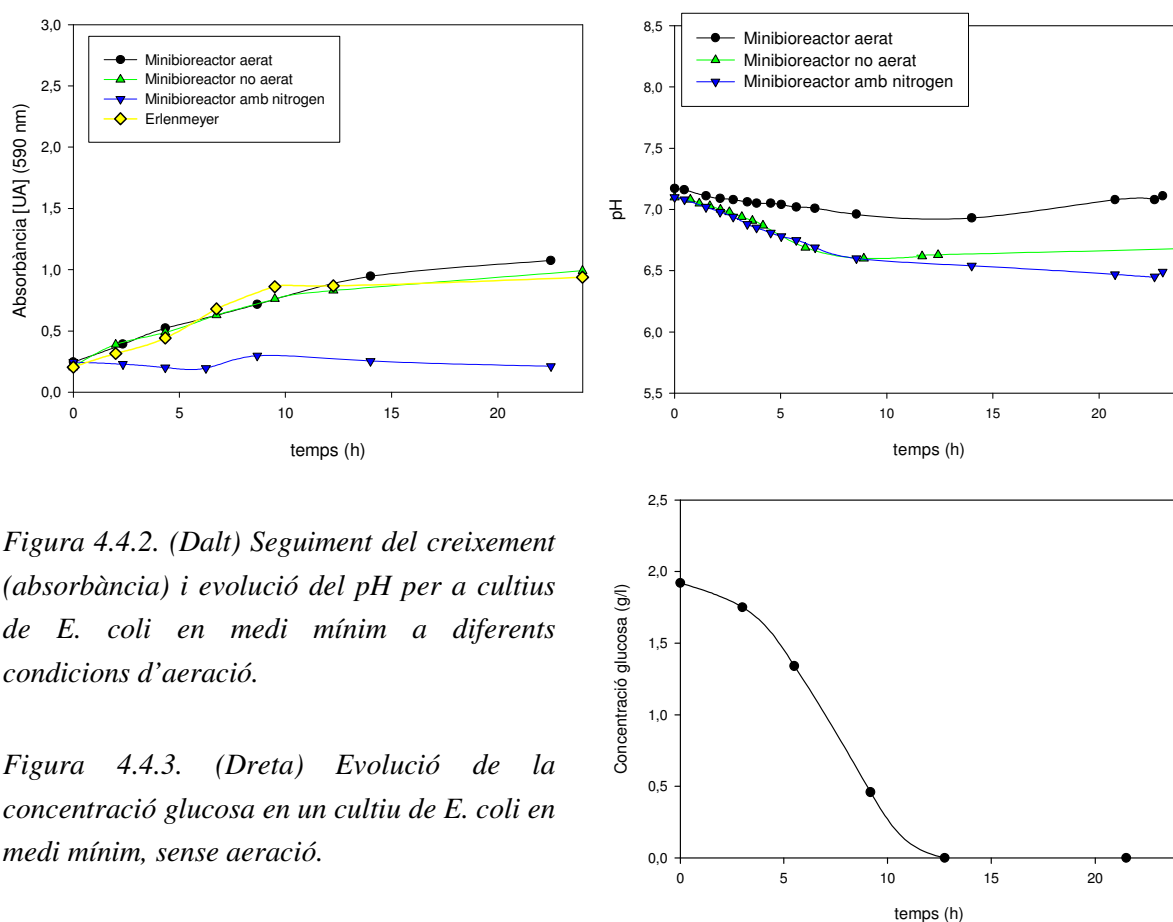


Figura 4.4.2. (Dalt) Seguiment del creixement (absorbància) i evolució del pH per a cultius de *E. coli* en medi mínim a diferents condicions d'aeració.

Figura 4.4.3. (Dreta) Evolució de la concentració glucosa en un cultiu de *E. coli* en medi mínim, sense aeració.

La conclusió principal que es pot extreure a partir de les observacions anteriors és que, tot i que en determinats casos el seguiment del creixement (per absorbància) no mostri diferències significatives, el seguiment del pH pot mostrar diferències metabòliques destacables.

Cultiu de llevats

P. pastoris (en medi YPD)

De la mateixa manera que s'ha realitzat en l'apartat anterior, s'ha repetit novament l'experiment de creixement a diferents condicions d'aeració: aeració per bombolleig (controlant un 30% oxigen dissolt), sense aeració, i amb circulació d'un cabal de N₂ per capçal. S'han emprat inòculs d'aproximadament 0,2 unitats d'absorbància (mesurada a 600 nm), i una agitació emprant varetes imantades a 400 rpm (en el cas dels minibioreactors). El pH ha estat mesurat únicament als minibioreactors mitjançant una sonda comercial (Hamilton Policlave 200).

A la figura 4.4.4 es mostren els resultats obtinguts on, pel que fa al creixement, novament s'observa que en el minibioreactor no aerat apareix una limitació aproximadament a les 7 h respecte als cultius no limitats (minibioreactor 30% oxigen dissolt i Erlenmeyer). D'altra banda, el cultiu amb circulació d'un corrent de nitrogen per capçal mostra un creixement notablement més reduït que ens els casos anterior, que s'atura a les 10 h de cultiu.

Referent al seguiment de pH, en els cultius realitzats s'observen diferències en la variació de pH, ja que mentre els cultius amb una certa aportació d'oxigen mostren una acidificació inicial seguida d'una basificació posterior, en els cultius anaerobis l'acidificació és progressiva.

En el cas dels cultius amb una certa aportació d'oxigen es pot observar, com de forma similar al que passava en cultius de *E. coli* en medi M9, hi ha una tendència inicial d'acidificació, probablement deguda al consum de glucosa, que és probable que porti a una certa acumulació d'àcids. Coincidint amb l'exhauriment de la glucosa, aproximadament a les 9 h de cultiu (veure figura 4.4.5), hi ha un canvi metabòlic que sense la realització d'un major nombre d'anàlisis obre les portes a diferents interpretacions. Durant la primera fase de cultiu és probable que hi hagi una acumulació d'etanol i acetat, tal com passa en un nombre elevat de llevats, on part del piruvat passa a acetaldehid per acció de la piruvat descarboxilasa, i posteriorment a etanol i acetat (Flores i Col., 2000; Möller, 2001; Solà, 2004). A partir de l'instant on la glucosa

s'exhaureix ($t = 9$ h), aquests metabòlits poden passar a utilitzar-se com a font de carboni i energia, entrant ambdós a les vies metabòliques a nivell d'acetat, que en absència de glucosa, poden entrar al cycle dels àcids tricarboxílics a nivell de AcetilCoA, o bé entrar al cycle del glioxilat (Flores i Col., 2000). Tot i que la utilització de l'etanol produït en els estadis inicials del cultiu no explicaria l'increment de pH que s'observa a partir del punt en què s'exhaureix la glucosa, si que ho faria el consum de l'acetat. De totes maneres, a manca d'anàlisis que puguin portar a conclusions fonamentades amb dades, també es creu convenient considerar les altres alternatives possibles per explicar l'augment del pH experimentat. Un altre factor és el consum dels pèptids i aminoàcids aportats per l'extracte de llevat, que és un dels components principals del medi i tal com s'havia comentat en el cas de *E. coli*, al ser consumits produeixen un augment de pH.

En el cas de que es forci una major anaerobiosi mitjançant la circulació d'un corrent de nitrogen, tal com s'observa a la figura 4.4.4, no hi ha cap canvi en la tendència de variació de pH sinó que l'acidificació del cultiu és progressiva, fins que tant el creixement com l'acidificació s'aturen. Si bé en els casos anteriors una vegada exhaurida la glucosa, es considerava la possibilitat de que l'etanol/àcids produïts, o els pèptids i aminoàcids es podien consumir i el creixement del cultiu seguir, en aquest cas això no és així.

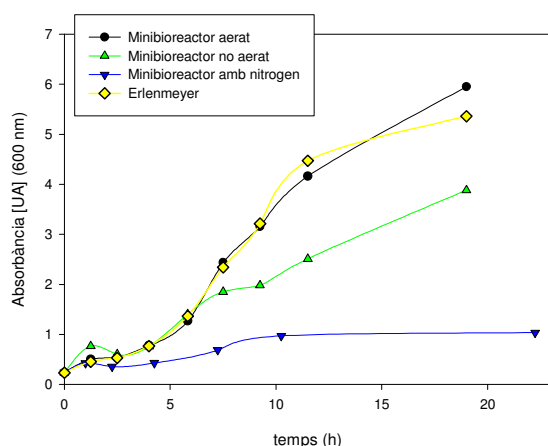


Figura 4.4.4. (Dalt) Seguiment del creixement (absorbància) i evolució del pH en cultius de *P. pastoris* en medi ric (YPD), a diferents condicions d'aeració.

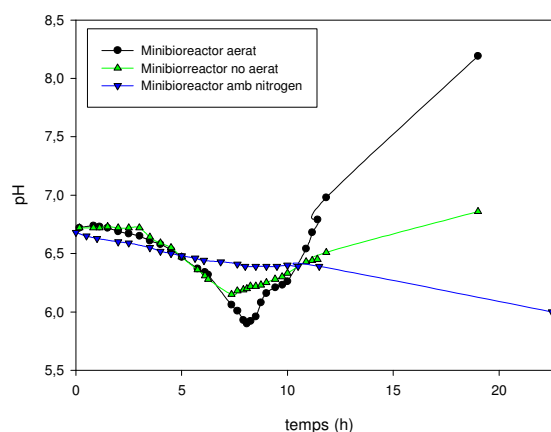
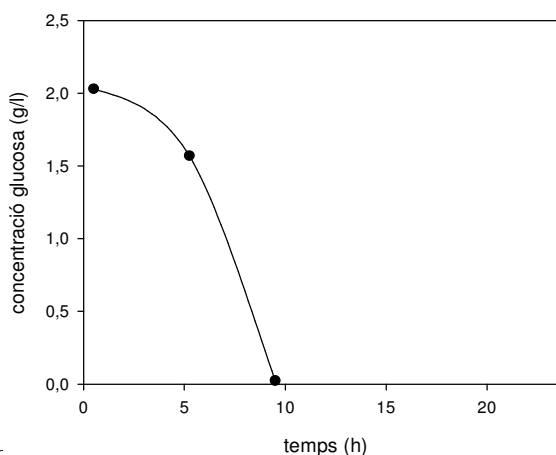


Figura 4.4.5. (Dreta) Seguiment de la concentració de glucosa en un cultiu no aerat de *P. pastoris* en medi ric.



Les conclusions principals que es poden extreure d'aquest experiment són el fet que el seguiment de l'evolució del pH permet identificar comportaments metabòlics diferents en funció de les limitacions d'oxigen existents al cultiu, i també el fet que permeti identificar canvis metabòlics degut a l'exhauriment de nutrients.

P. pastoris (medi mínim)

Tal com s'havia realitzat en l'apartat anterior (4.2), en aquest també s'han realitzat cultius amb un altre medi que proporcionés una cinètica de creixement més lenta, per tal de complir un espectre més ampli dels medis emprats amb aquest organisme. En aquest cas el medi emprat contenia com a base *Yeast Nitrogen Base* (YNB) i glucosa (veure els detalls de la composició a materials i mètodes). L'experiment realitzat ha estat una repetició del realitzat amb medi YPD, amb un Erlenmeyer de control, un minibioreactor aerat per bombolleig (controlant una consigna del 30% d'oxigen dissolt), un minibioreactor sense aeració, i un minibioreactor prototip amb circulació d'un cabal de nitrogen. Novament s'han emprat inòculs d'aproximadament 0,2 unitats d'absorbància (mesurada a 600 nm), i una agitació emprant varetes imantades a 400 rpm (en el cas dels minibioreactors).

A la figura 4.4.6 es mostren els resultats obtinguts per al seguiment del creixement. En aquest cas de cultiu en medi mínim, pràcticament no s'observen diferències de creixement hi hagi aeració per bombolleig, o no hi hagi aeració. D'altra banda, en el cultiu on s'ha circulat un corrent de nitrogen el creixement ha estat molt més reduït.

A la figura 4.4.6, que també mostra les evolucions del pH, es pot observar com en tots els cultius s'observa una acidificació progressiva, deguda probablement al consum de glucosa per produir àcids, i també al consum d'amoni, present en la forma bàsica en el medi de cultiu. D'entre aquests dos factors, novament s'ha fet anàlisi de la concentració de glucosa en solució, i coincidint amb l'exhauriment d'aquest substrat, entre les 9 i 10 h de cultiu (veure figura 4.4.7), hi ha un alentiment notable en la variació del pH. Comparant les variacions observades en els diferents experiments, en els cultius amb i sense aeració l'acidificació és similar, essent molt important la seva magnitud (s'arriba fins a valors de pH \approx 3). Tot i ser similar, hi ha hagut una major acidificació en el cultiu amb aeració per bombolleig, que indica que s'ha produït una major metabolització de nutrients. En el cas del cultiu anaerobi forçat mitjançant el pas d'un corrent de nitrogen també hi ha una disminució progressiva de pH, però d'una magnitud molt més reduïda, fet que concorda amb el menor creixement probablement la menor metabolització de nutrients observada.

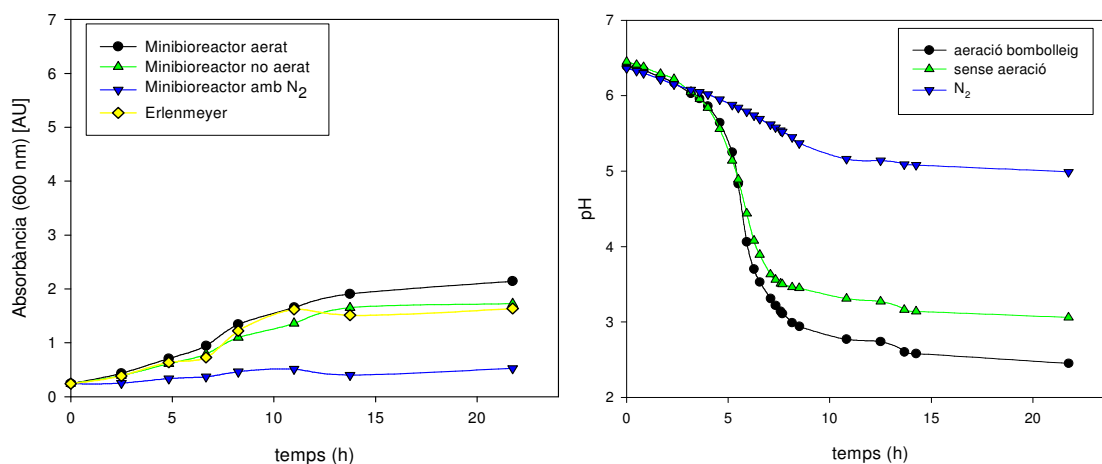


Figura 4.4.6. Seguiment del creixement (absorbància) i evolució del pH en cultius de *P. pastoris* en medi mínim (YNB), a diferents condicions d'aeració.

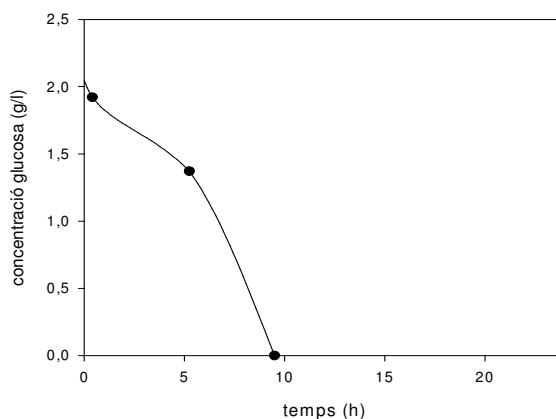


Figura 4.4.7. Seguiment de la concentració de glucosa en un cultiu no aerat de *P. pastoris* en medi mínim

Cal remarcar la magnitud de la disminució de pH, que en el cas del cultiu aerat per bombolleig assoleix valors inferiors a $\text{pH} = 3,0$. Aquest fet és degut a la reduïda capacitat de tampó del medi mínim (veure figura 4.4.8), que porta el pH a valors lluny de l'òptim de creixement del microorganisme (Cino, 1999). Aquest fet ens porta a una nova valoració sobre la necessitat de disposar d'una mesura de pH, ja que no solament dóna informació sobre el metabolisme que s'està produint en el cultiu quan el pH evoluciona lliurement, sinó que també resulta interessant de cara a un potencial control del pH per tal d'estar en valors de creixement o producció òptims.

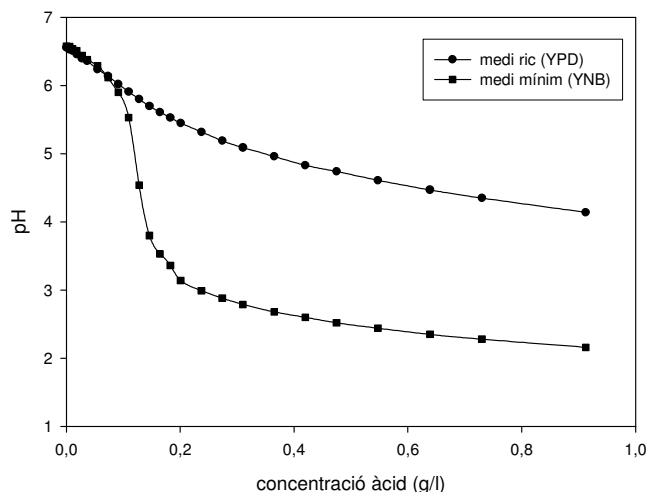


Figura 4.4.8. Diferències en la capacitat tampó entre el medi mínim (YNB) i medi ric (YPD) emprats per als cultius de *P. pastoris*. A l'eix d'abcises es mostra la concentració d'àcid clorhídric, que és l'element que s'ha addicionat per produir l'acidificació del medi.

Les conclusions principals de l'experiment anterior són el fet que calgui tenir en consideració la capacitat de tamponament del pH del medi de cultiu, en cas que es vulgui comparar diferències en l'evolució del pH produïdes en diferents medis, i també el fet que novament es permeti identificar la relació entre el consum i exhauriment d'un determinat nutrient i la variació de pH.

Cèl·lules animals

Hibridoma (en medi DMEM)

De forma similar al que s'ha fet pels casos de treball amb *E. coli* i *P. pastoris*, s'ha realitzat una monitorització del pH, emprant un sistema agitat no estressant amb una sonda de pH (Hamilton Policlave 200). S'ha realitzat una aeració mitjançant polsos discontinus d'aire al 5% de CO₂, de 30 s cada 5 min, ja que era necessari mantenir una atmosfera al 5% de CO₂. Com a equip de cultiu control s'ha emprat un flascó on no s'ha aplicat agitació ni aeració (aquesta s'aconsegueix per un filtre de venteig que hi ha a la tapa del flascó, que es situa dins un incubador al 5% de CO₂). Els inòculs han estat aproximadament de 2×10^5 Cèl·l./mL.

A la figura 4.4.9 es mostren les dades de creixement, superposades amb el seguiment de pH. Si bé per a cèl·lules animals es considera que el rang de pH on pot haver-hi creixement és reduït, i en el cas d'aquesta línia, en bioreactor es controla de forma molt precisa al voltant de pH = 7,02, al seguir el pH d'un cultiu sense control de pH a unes

condicions estàndard (37°C i 5% CO₂), s'ha pogut observar que les variacions de pH eren considerables. Així, el pH inicial es troba al voltant de pH = 7,8, que és el valor al que porten l'equilibri entre 3,7 g/L de bicarbonat sòdic i un 5% de % CO₂ a l'atmosfera. A mesura que hi ha creixement es produeix una acidificació progressiva, que cap a les 57 h assoleix un valor de pH mínim al voltant de 7,0. A la fase final del cultiu, la disminució del pH es veu frenada i comença a haver-hi un lleuger augment d'aquest paràmetre, la qual cosa indica un possible canvi metabòlic.

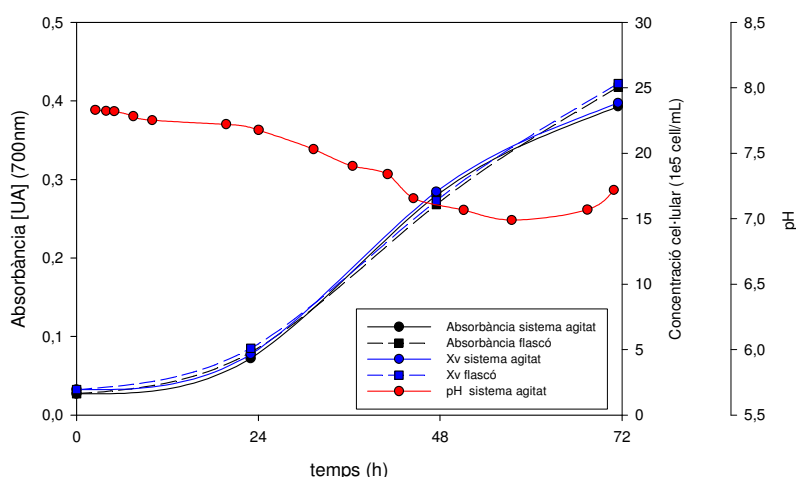


Figura 4.4.9. Comprovació de la variació del pH en un cultiu de Hibridoma (KB-26.5) creixent durant tres dies en un incubador a un 5% de CO₂ en un sistema de cultiu agitat, així com en un flascó de control.

Tancant aquest apartat, del que s'ha observat amb els experiments amb els diferents models cel·lulars es poden destacar algunes observacions pel que fa al seguiment del pH. Efectivament aquest indica diferències metabòliques entre cultius. En els casos estudiats, s'han comparat cultius a diferents condicions d'aerobiosi, i l'evolució del pH ha mostrat diferències indicant els substrats i vies metabòliques emprades principalment. D'altra banda, el pH es postula com un indicador interessant per detectar l'aparició de limitacions en el medi de cultiu (com s'observava a les figures 4.4.4-4.4.5 i 4.4.6-4.4.7). Finalment, tal i com s'ha comentat prèviament, també és d'especial interès disposar d'un seguiment del pH per tal de conèixer si el pH ha estat en tot moments dins de rangs òptims de creixement/producció dels cultius, i per saber si aquesta variable pot explicar diferències de creixement/productivitat experimentades respecte altres sistemes de cultiu. Per tant, aquests experiments corroboren l'interès de disposar d'aquesta mesura en els minibioreactors, i que en els marges d'operació en els que es treballarà, les variacions de pH obtingudes permetran recollir dades significatives per a poder

analitzar el comportament metabòlic dels diferents tipus de cèl·lules a condicions diferents.

4.5. Discussió

A continuació es discuteixen de forma global les conclusions dels apartats anteriors, on s'han realitzat experiments per comprovar la viabilitat i necessitat de realitzar un seguiment de pH, concentració cel·lular (absorbància), oxigen dissolt i OUR. En termes generals es pot comentar que totes aquestes mesures han demostrat tenir un interès elevat, tot i que en alguns casos la validesa es veu limitada a determinats models cel·lulars.

Encara que no estigui directament relacionat amb les estratègies de seguiment es pot comentar que una discussió que sorgeix de l'experimentació realitzada és la capacitat del sistema de cultiu per a realitzar creixements de diferents organismes. El creixement de bacteris i llevats en medis rics (els permeten tenir dinàmiques de creixement elevades) es veu limitat per la concentració d'oxigen dissolt, ja que el sistema d'aeració per capçal no és suficient per satisfer els requeriments d'aquests cultius. En el cas que aquests dos models cel·lulars es cultivin en medis mínims que alenteixen les seves cinètiques, per a *E. coli* el seguiment de pH com a indicador del metabolisme mostra que les limitacions es mantenen, mentre que per a *P. pastoris* el paper limitant de l'oxigen pràcticament desapareix, ja que deixen d'observar-se diferències en les densitats cel·lulars assolides, i les evolucions del pH mostren diferències molt lleugeres en el metabolisme. En el cas dels híbrids el sistema d'aeració proposat és suficient, però apareix un problema de estrès cel·lular degut a la cisalla de l'agitació. En aquest cas doncs, caldrà desenvolupar un sistema que minimitzi aquests efectes (veure capítol 5).

En tots els cultius realitzats, les dades de base emprades per a la posterior discussió dels experiments han estat les mesures de concentració cel·lular (per absorbància), que combinades amb el coneixement de l'ambient físico-químic on s'han realitzat els cultius (temperatura, pH, oxigen dissolt, composició del medi) ens permeten explicar els comportaments dels organismes estudiats. Així doncs, el coneixement de la concentració cel·lular (per absorbància), esdevé pràcticament una base de disseny ja que és la mesura més directa del creixement dels cultius, i més universalment emprada pels potencials usuaris de la tecnologia a desenvolupar. De totes maneres, els resultats obtinguts mostren que aquesta mesura no és suficient per conèixer si existeixen limitacions en els cultius que puguin explicar diferències metabòliques i, addicionalment també s'ha observat que mentre el cultiu creix exponencialment l'absorbància és una bona mesura del creixement, però cal tenir en compte que això no

és així i augmenta el percentatge de cèl·lules no viables, l'absorbància segueix cèl·lules totals i no permet distingir entre viables i no viables (veure figura 4.1.6). Així doncs, esdevenen d'elevada rellevància altres indicadors que puguin completar la mesura de concentració cel·lular, mostrant les limitacions existents i les diferències en els comportaments metabòlics. A continuació, es passa a discutir la validesa dels indicadors addicionals emprats (pH, oxigen dissolt i OUR).

Referent a la necessitat de realitzar el seguiment de l'oxigen dissolt, es pot concloure que hi ha la necessitat de realitzar-ne un seguiment per tal de detectar possibles limitacions. Això és necessari sobretot en el cas de bacteris i llevats, ja que si el que es desitja es tenir equips per a cribat cel·lular on el comportament dels organismes ha de ser comparable al que es trobaria en bioreactors de major volum, l'oxigen dissolt esdevindrà una variable a mesurar i caldrà tenir dades per assegurar que no sigui limitant. En el cas de cèl·lules animals, les variacions del comportament del cultius seran relativament reduïdes en un rang ampli de concentracions d'oxigen, i es mostren com un bon paràmetre per a identificar limitacions en el medi de cultiu, ja que s'ha pogut comprovar que quan s'exhaureix la glutamina i el metabolisme s'alenteix, hi ha un canvi en la tendència de l'evolució de l'oxigen dissolt.

Referint-nos a les mesures de OUR, amb les simulacions realitzades es pot observar com en cultius de bacteris, amb dinàmiques de consum elevades, l'error serà elevat ja que en una bona part del cultiu és molt probable que el temps de resposta de les sondes sigui de l'ordre del consum dels microorganismes. Per reduir aquest error caldrà que les sondes donin una resposta el més ràpida possible, i també realitzar un nombre el més elevat possible de repeticions de les mesures per tal de poder filtrar-ne l'error. En el cas de cultius de microorganismes com *P. pastoris*, amb dinàmiques de consum menors, aquestes s'allunyen del temps de resposta de les sondes en la major part del cultiu, de manera que l'error serà potencialment menor. Finalment, en el cas de les cèl·lules animals, les velocitats de consum són encara més reduïdes i s'espera que l'error encara sigui menor.

En relació al seguiment de pH, aquest es mostra com un bon indicador metabòlic, ja que depenent de l'aerobiosi del cultiu s'observen diferents tendències en la variació del pH. Addicionalment, en el cas que les condicions d'aeració estiguin controlades, el pH donarà la possibilitat de seguir el creixement del cultiu, sempre i quan les formulacions del medi siguin les adequades i no hi hagi exhauriments de nutrients que impliquin canvis metabòlics. En el cas que apareguin limitacions en els medis de cultiu, el pH també s'ha mostrat la seva funcionalitat com a indicador, ja que la seva evolució varia una vegada s'exhaureixen un determinat component del medi de cultiu. També cal tenir en compte que és d'especial interès disposar d'un seguiment del pH per tal de conèixer si el pH ha estat en tot moments dins de rangs òptims de creixement/producció dels cultius, i per saber si aquesta variable pot explicar diferències de creixement/

productivitat experimentades respecte altres sistemes de cultiu. I finalment, disposar d'un sistema de seguiment de pH també pot resultar interessant en casos on es desitgi controlar el pH, ja que disposant de un sistema de mesura, s'hi pot acoblar un controlador i actuadors per tal de mantenir el pH en els valors desitjats.

5. DESENVOLUPAMENT DELS SISTEMES DE MESURA

En aquest capítol es presenta el desenvolupament dels sistemes de mesura, que són la base que aportarà al sistema de minibioreactors desenvolupat els seus principals trets funcionals. Juntament amb aquests, en l'últim dels apartats del capítol, es presenten també altres desenvolupaments addicionals que ha calgut realitzar com els dels sistemes d'agitació i humidificació.

De la etapa on es situa aquest capítol (figura 1.13) cal destacar l'elevat grau d'interrelació entre 1) el desenvolupament tecnològic, 2) el prototipatge i 3) els tests d'aplicació, ja que partint de les definicions funcionals es seleccionen els sistemes de mesura a desenvolupar, que a mesura que generen resultats positius permeten avançar amb el desenvolupament de prototips, que novament cal posar a prova i al obtenir resultats positius permeten comprovar l'adequació a les definicions funcionals, i construir nous prototips que permetin aconseguir finalment els sistemes de minibioreactors que compleixin els requeriments i característiques definides al capítol 3.

Per tal de fer aquesta transició de les proves de concepte al desenvolupament, cal forçosament seleccionar un objectiu concret per a l'equip. Donats els diferents enfocaments de disseny que tindrien els equips a desenvolupar depenent de si la seva aplicació han de ser bacteris, llevats o cèl·lules animals, s'ha seleccionat un d'aquests models per a realitzar el disseny acurat i la construcció dels equips.

El model cel·lular seleccionat per a dirigir el desenvolupament a realitzar ha estat el de cèl·lules animals, degut a l'interès creixent d'aquest tipus de cultius (és el model emprat per al 60-70% de molècules d'aplicació terapèutica produïdes biotecnològicament), i als elevats requeriments de funcionalitat que aquest model demana. Aquest fet, lligat amb la reduïda presència d'equips comercials en aquest àmbit, donen un gran interès al desenvolupament d'equips adequats a aquest tipus de cultius.

D'acord amb la definició de l'equip realitzada en el capítol 3 i amb els resultats de la validació de les estratègies de seguiment, els sistemes de mesura que es desenvoluparan seran els següents:

- Concentració cel·lular. Per a poder conèixer en línia i en temps real l'evolució del creixement en els cultius que s'estiguin realitzant.
- pH. Per a detectar que els cultius treballen en el rang de pH adequat. Addicionalment, l'evolució d'aquesta variable és molt interessant com a informació addicional de l'evolució dels cultius, i en particular permet obtenir informació de l'activitat metabòlica de les cèl·lules.

- Oxigen dissolt. Amb la finalitat principal de detectar possibles limitacions que puguin portar a diferències metabòliques en els cultius. Aquesta mesura és també molt necessària per seguir i interpretar l'evolució dels cultius, comprovar que no hi ha limitacions i seguir l'activitat cel·lular
- Consum d'oxigen (OUR). A partir de les mesures d'oxigen, per tal d'aportar informació addicional sobre l'activitat metabòlica dels cultius.

Tot i que al capítol 4 ja s'ha realitzat una discussió de les capacitats de seguiment que les mesures anteriors permeten, a continuació se'n torna a presentar un breu resum. Sintetitzant els trets principals d'un cultiu, a unes determinades condicions físico-químiques, són el creixement, consum de substrats i la generació de productes. A la figura 5.1.1 es mostren, a mode d'exemple, corbes de creixement, consum i producció per un determinat cultiu de cèl·lules animals, on es pot veure que mentre hi ha creixement, la concentració cel·lular augmenta, i hi ha un determinat consum de substrats (a la gràfica es presenta l'evolució del substrat limitant, la glutamina), així com la generació de subproductes del metabolisme (a la gràfica es presenta el lactat). Quan el substrat limitant s'exhaureix, el creixement s'atura i el metabolisme de generació de subproductes també.

Amb els sistemes de mesura que es planteja desenvolupar es coneixerà l'estat de les principals condicions físico-químiques (pH, oxigen dissolt), es realitzarà un seguiment del creixement dels cultius, i de forma indirecta es seguirà el metabolisme, tant de consum de substrats com de generació de subproductes. En concret, per a l'aplicació seleccionada, el cultiu de cèl·lules animals, la mesura de pH permetrà seguir el consum de substrats, ja que mentre aquests siguin catabolitzats, en el cas de disseny (cèl·lules animals) es produiran àcids i el pH s'acidificarà, mentre que quan s'arribi a una limitació del cultiu per esgotament de la font de carboni o alguna altra raó, es pot veure de forma immediata com l'evolució de la corba de pH variarà substancialment i deixarà d'acidificar-se. De forma similar, l'oxigen dissolt i les mesures de OUR també permetran un seguiment de l'evolució del metabolisme dels cultius. En relació al seguiment de la generació de biomolècules d'interès industrial produïdes pel cultiu, si bé aquesta generació té una relació amb els indicadors metabòlics esmentats (l'activitat mostrada per pH i OUR en línies cel·lulars constitutives serà correlacionable amb producció) cal tenir en compte que no hi haurà mesura directa sobre les biomolècules d'interès de cada cultiu, ja que el ventall d'aquestes és molt ampli, i no es pot desenvolupar una única mesura per a seguir-les.

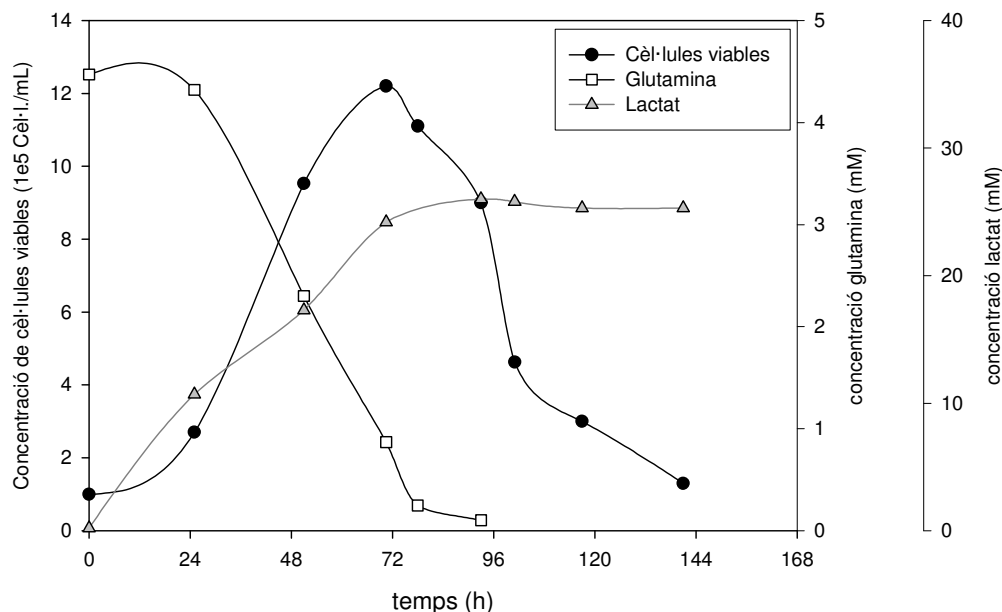


Figura 5.1.1. Exemple d'un cultiu de cèl·lules animals en suspensió (hibridomes). Com a seguiment del creixement cel·lular es presenta la concentració de cèl·lules viables, com a seguiment del substrat limitant es presenta la concentració glutamina, i com a seguiment dels subproductes cel·lulars es presenta la concentració de lactat. Font: Sanfeliu (1995)

5.1. Desenvolupament d'un sistema de mesura òptic de la concentració cel·lular i el pH

Per a la mesura directa de la concentració cel·lular, tot i que les alternatives presents són força nombroses (Sarró, 2005), cal tenir en compte que en els cultius de cèl·lules animals habitualment es treballa amb concentracions cel·lulars molt baixes, de manera que la sensibilitat juga un paper molt important en les mesures de la concentració cel·lular. A aquest requeriment cal sumar-li que es desitja un sistema que no requereixi una tecnologia molt complexa sinó que aquesta pugui ser relativament econòmica i fàcil d'implementar.

Aquests requeriments fan que la majoria dels mètodes disponibles comportin problemàtiques prou significatives per descartar-les com a possible solució per al seguiment de la concentració cel·lular en bioreactors de cèl·lules animals. Així, les metodologies més robustes i, per tant, les que són actualment més utilitzades per a la mesura de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules animals en suspensió, són les que contenen sensors òptics que es basen en l'absorbància, la dispersió de la llum, i la fluorimetria. Aquests sensors òptics tenen múltiples avantatges, ja que són sensors de resposta ràpida, tenen bona sensibilitat, són simples i de fàcil manteniment. Entre els

mètodes òptics, els més emprats són els de mesura de l'absorbància i els de dispersió de la llum, i al mercat hi són presents un bon nombre de sensors comercials amb una bona sensibilitat a zones de baixa concentració (Olsson i Nielsen, 1997).

D'entre aquestes dues alternatives (absorbància i dispersió de la llum), s'ha seleccionat el de mesura directa d'absorbància, donada la seva simplicitat de disseny, que permet una fàcil adaptació dels elements de mesura als minibioreactors i també degut a la capacitat per emprar aquest mateix sistema de mesura per obtenir informació de diferents zones de l'espectre. Cal tenir en compte, però, que un dels desavantatges del mètode de mesura de l'absorbància és que no permet la distinció entre cèl·lules viables i mortes, sinó que fa el seguiment de la concentració de cèl·lules totals. D'aquesta manera, per tenir una major informació del cultiu, i tal com s'havia conclòs en el capítol anterior, també s'haurà de disposar d'indicadors d'activitat cel·lular.

Addicionalment cal tenir en compte que en el cas de cèl·lules adherents, donada la opacitat i manca d'homogeneïtat en la distribució de les cèl·lules, la mesura d'absorbància no permetrà el seguiment de la concentració cel·lular.

Per a la mesura de pH la selecció de la tecnologia de mesura presenta com a alternatives les sondes redox convencionals, els sistemes òptics de mesura directa o bé els sistemes òptics de fluorescència que utilitzen colorants/fluoròfors. Donades les dimensions d'un minibioreactor de treball, no és possible incorporar una sonda per a cadascuna de les funcionalitats desitjades (pH, oxigen dissolt, absorbància), de manera que per poder mantenir totes aquestes prestacions de mesura s'ha optat per donar a la sonda òptica que s'haurà de desenvolupar per a mesurar la concentració cel·lular, múltiples funcions, de manera que es pugui emprar també per a realitzar mesures de pH.

5.1.1. Desenvolupament d'un sistema de seguiment òptic basat en tecnologia existent

Per al desenvolupament inicial del sistema òptic s'ha emprat un espectrofotòmetre comercial (UV/VIS Spectrometer system, Steag Microparts, Dortmund, Alemanya), i un muntatge que integrava un prototip de minibioreactor. A la figura 5.1.2 es presenta una representació esquemàtica dels elements que contempla, mentre que al capítol de Materials i Mètodes (figura 8.2.6) es presenta amb més detall.

Amb aquest muntatge es realitzarà una caracterització del sistema de mesura de cèl·lules i pH. Una vegada fet això, el pas següent contempla el disseny d'un sistema de

mesura personalitzat que es pugui incorporar als sistemes d'un minibioreactor o de múltiples minibioreactors.

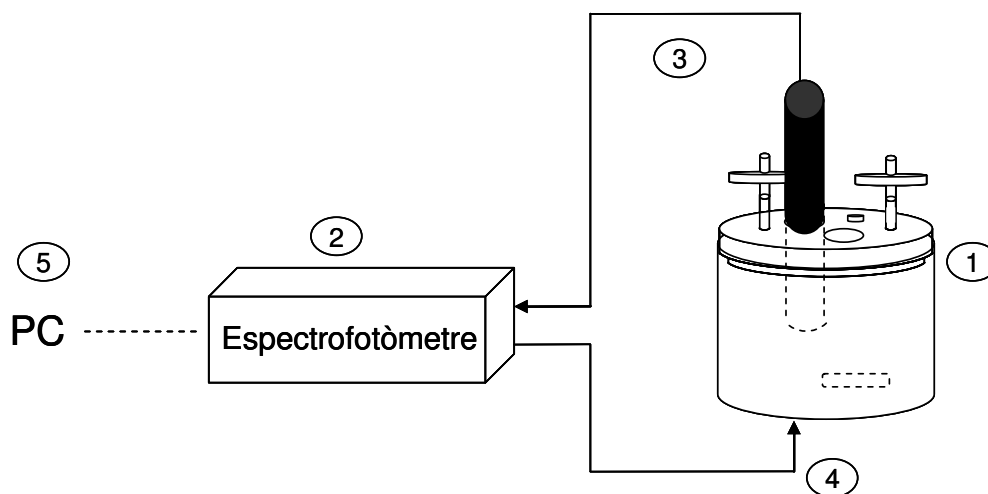


Figura 5.1.2. Esquema amb els elements del muntatge per al desenvolupament del sistema de mesura òptica, que incorpora els següents elements: 1) un prototip de minibioreactor mecanitzat en metacrilat, 2) un espectrofotòmetre comercial de Steag Microparts amb 3) una fibra òptica que rep la llum que ha travessat el contingut del minibioreactor, i 4) una fibra òptica que condueix la llum des de la font, situada a l'espectrofotòmetre, fins al minibioreactor. Les dades d'absorbància mesurades són transferides a 5) un ordinador de sobretaula.

5.1.1.1. Seguiment òptic de la concentració cel·lular

El primer pas per a iniciar el desenvolupament d'un sistema òptic de seguiment de la concentració cel·lular ha estat identificar la zona de l'espectre on es poden realitzar les mesures amb un mínim d'interferències i màxima sensibilitat.

L'experiment plantejat amb aquesta finalitat ha constatat d'una mesura d'absorbància d'una suspensió cel·lular d'hibridomes en un espectre ampli (de 350 a 800 nm). El sistema emprat ha estat el presentat a la figura 5.1.2, el blanc s'ha realitzat amb PBS (veure composició a materials i mètodes), i la concentració cel·lular ha estat de 15×10^5 Cèl·l./mL (situada més o menys a la mitjana de concentració cel·lular habitual en cultius en flascó, que té un rang entre $2-25 \times 10^5$ Cèl·l./mL). El medi en què s'ha ressuspès les cèl·lules prèviament a la seva mesura és també PBS.

A la figura 5.1.3 s'observa que en PBS l'espectre mesurat no presenta interferències a destacar, de manera que les cèl·lules poden ser mesurades en qualsevol zona del visible.

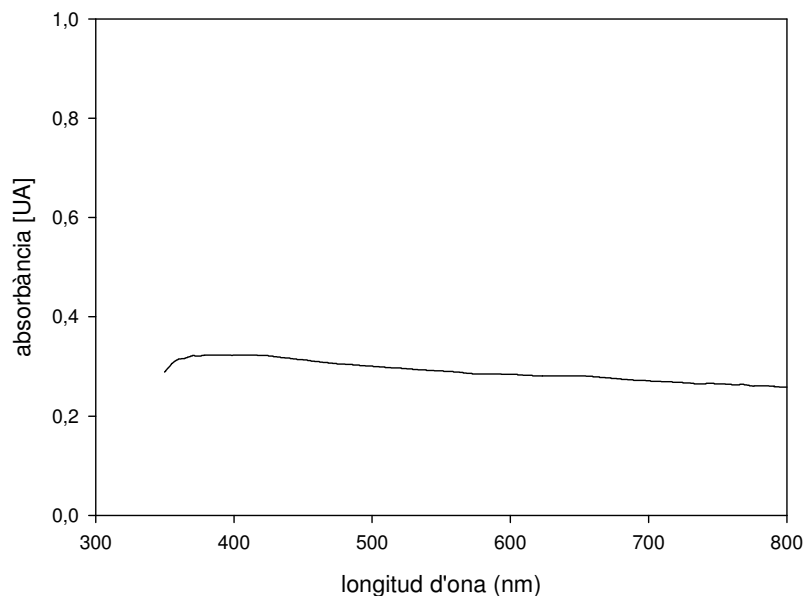


Figura 5.1.3. Espectre per a una suspensió d'hibridomes en PBS, a una concentració de 15×10^5 Cèl·l./mL.

A continuació s'han estudiat les possibles interferències amb altres components dels medis de cultiu de cèl·lules animals. A l'experiment següent s'ha mesurat l'espectre d'un dels medis més populars per al cultiu de cèl·lules animals (DMEM), que conté 15 mg/L de roig de fenol, un indicador de pH que precisament s'intentarà emprar més endavant per tal de fer un seguiment d'aquesta variable. Havent fet el blanc novament amb PBS, en aquest experiment, s'ha mesurat l'absorbància des dels 350 fins als 800 nm.

A la figura 5.1.4 es poden observar els pics d'absorció de les formes àcida (430 nm) i bàsica (560 nm) del roig de fenol a diferents valors del pH, superposats amb l'espectre de la suspensió cel·lular en PBS que s'havia presentat a la figura 5.1.3. Donada l'ampla base dels pics d'absorció de les formes àcida i bàsica, la zona on existeix una interferència per a mesurar la concentració cel·lular es situa aproximadament entre els 350 i 620 nm. Donada la impossibilitat de fer mesures per sota de 350 nm (entrant en longituds d'ona UV), ja que hi ha una absorció important de la llum per part del material plàstic del propi minibioreactor, s'ha seleccionat com a zona de mesura aquella amb longituds d'ona per sobre de 620 nm. Preferentment, es realitzaran les mesures a 700 nm, que encara està a la zona del visible, i lluny de les interferències amb el roig de fenol.

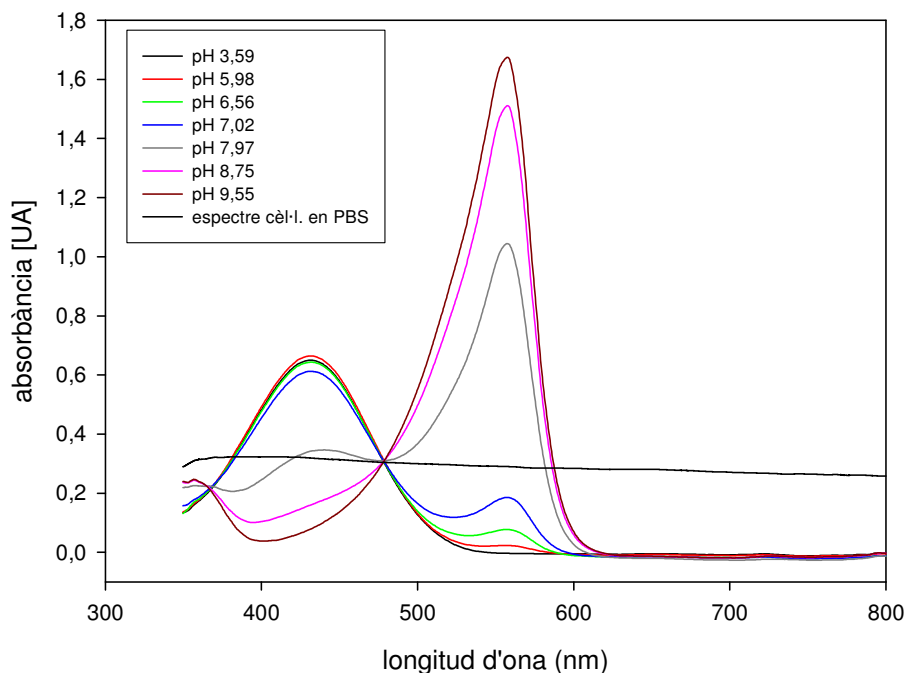


Figura 5.1.4. Determinació de les interferències en la mesura òptica de concentració cel·lular degudes al pH, en medi DMEM amb 15 mg/L de roig de fenol. A la gràfica s'observen els espectres mesurats per al medi (sense cèl·lules), així com l'espectre d'una suspensió cel·lular d'hibridomes (15×10^5 Cèl·l./mL) en PBS.

D'altra banda, per a comprovar altres possibles interferències entre concentració cel·lular i pH, també s'ha cregut necessari assegurar que les variacions de pH que poden existir en un cultiu no afectin la mesura de la concentració cel·lular degut a canvis de morfologia.

En l'experiment següent s'ha emprat una suspensió cel·lular d'hibridomes (7×10^5 Cèl·l./mL) en PBS, i se n'ha mesurat l'absorbància a 700 nm, variant el pH en un rang inclús més ampli del que ens trobarem habitualment en cultiu ($5,9 < \text{pH} < 7,8$).

A la figura 5.1.5 es mostren les mesures d'absorbància resultants, podent-se observar que no hi ha influència del pH en la mesura, ja que aquesta no varia significativament en tot el rang estudiat. Així doncs, no caldrà aplicar correccions a la mesura de concentració cel·lular en funció del pH existent.

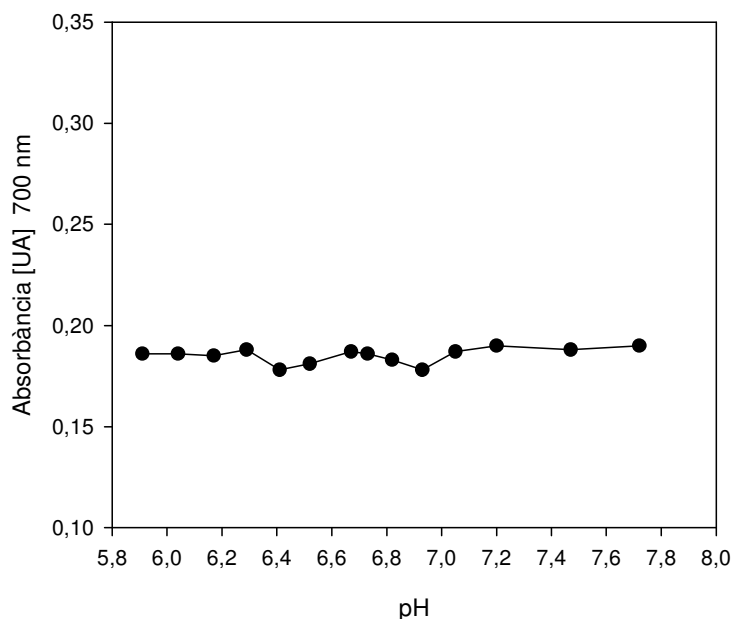


Figura 5.1.5. Seguiment de l'absorbància a 700 nm d'una suspensió cel·lular d'hibridomes a una concentració de 7×10^5 Cèl·l./mL en PBS a diferents pH.

Seguidament, s'ha realitzat un calibratge per tal de poder correlacionar la concentració cel·lular en les unitats emprades habitualment en el cas de cèl·lules animals (10^5 Cèl·l./mL), amb l'absorbància mesurada a 700 nm i comparar el calibratge obtingut amb el realitzat amb un espectrofotòmetre de referència (NOVASPEC, equip comercialitzat per Pharmacia, Uppsala, Suècia, ara part de GE Healthcare). En el calibratge, s'ha realitzat mesures d'absorbància amb una suspensió cel·lular d'hibridomes en PBS, amb concentracions aproximadament entre 2 i 25×10^5 Cèl·l./mL.

A la figura 5.1.6 es mostren els resultats del calibratge, representant a l'eix de les abcises la concentració cel·lular, que no ha estat mesurada per recomptes al microscopi degut a l'error que aquests acumularien, sinó que a partir de la concentració inicial recomptada i les dilucions efectuades, s'ha calculat la concentració existent dins el minibioreactor (aquests són els valors representats a l'eix de les abcises). Així, si hi ha algun error en la dilució, la desviació s'observarà en els dos sistemes, el prototip i l'espectrofotòmetre de referència, com a la gràfica passa pel valor de 12×10^5 Cèl·l./mL, que presenta una lleugera desviació.

A la gràfica s'observa que tant les dades obtingudes amb el muntatge prototip (figura 5.1.2) com amb l'espectrofotòmetre de referència mostren linealitats similars, amb valors de $r^2 = 0,991$ i $0,995$ respectivament. Tot i la similitud, a densitats cel·lulars baixes, per sota de 5×10^5 Cèl·l./mL, el muntatge prototip mostra una sensibilitat menor, i la dispersió respecte la recta de calibratge augmenta. Donat que les concentracions

habituals de cultiu es situen entre entre 2 i 20×10^5 Cèl·l./mL, caldrà realitzar millores per a seguir més acuradament el rang de concentracions baix.

Finalment, l'observació més destacable de la gràfica és la diferència de pendents observada entre els dos sistemes de mesura. Tant aquest fenomen com la baixa sensibilitat a concentracions cel·lulars reduïdes s'hauran de tenir en compte en el disseny i desenvolupament del sistema de mesura específic per als dels equips de cultiu.

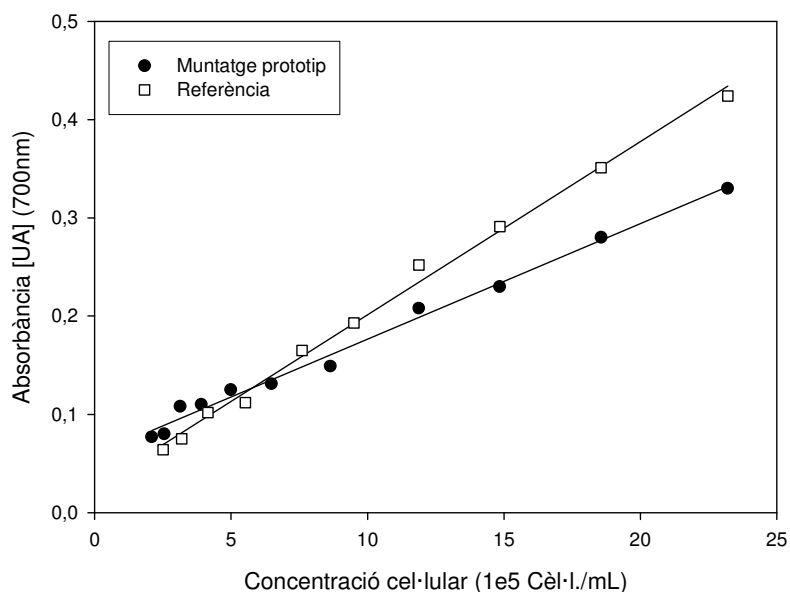


Figura 5.1.6. Calibratge per a correlacionar la concentració cel·lular (mesurada en unitats 10^5 Cèl·l./mL) amb l'absorbància a 700 nm, amb el muntatge prototip presentat a la figura 5.1.2 i amb un espectrofotòmetre de referència (NOVASPEC).

Cal no obviar la influència que tindrà la viabilitat dels potencials cultius sobre la mesura, però aquest efecte no serà estudiat fins que s'emprin els sistemes de cultiu en desenvolupament per a realitzar cultius (capítol 6).

5.1.1.2. Seguiment òptic del pH

Per al seguiment del pH dels cultius s'ha escollit un indicador, el roig de fenol, que s'utilitza àmpliament en el cultiu de cèl·lules animals, i que permet identificar de forma visual canvis importants en el pH i, per tant, prendre decisions sobre el cultiu (aturada, ressembla, addició de medi, etc.). Sense que hi hagi necessitat d'afegir cap component addicional al medi ni d'emprar una sonda específica per al pH, s'intentarà seguir aquest

paràmetre a partir del sistema de seguiment d'absorbància emprat per a la mesura de la concentració cel·lular.

L'indicador a emprar, el roig de fenol, presenta una forma àcida, amb un màxim d'absorció a 430 nm, i una forma bàsica, que té un màxim d'absorció a 560 nm. A la figura 5.1.7 es presenta l'estructura d'ambdues formes.

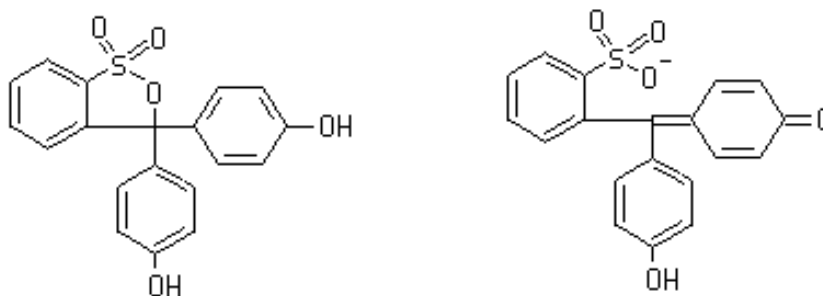


Figura 5.1.7. Estructura molecular del roig de fenol. A l'esquerra, forma àcida de la molècula. A la dreta, forma bàsica.

Per tal de caracteritzar aquest indicador, emprant el muntatge presentat a la figura 5.1.2 i a la figura 8.2.6 del capítol de Materials i Mètodes, s'ha realitzat un calibratge per tal de correlacionar l'absorbància de les formes àcida i bàsica amb el pH. En l'experiment s'ha emprat una solució de roig de fenol (15 mg/L) en medi DMEM, i s'han mesurat els espectres d'absorbància entre 400 i 600 nm a mesura que es variava progressivament el pH. Els resultats (figura 5.1.8) mostren com mentre al basificar-se el pH cada cop hi ha una major absorció a uns 560 nm, corresponent a l'absorció de la forma bàsica del colorant, al acidificar-se la solució, augmenta l'absorbància corresponent a la forma àcida, que presenta un màxim d'absorció a 430 nm. Al realitzar una regressió que relacioni l'absorbància mesurada en funció del pH (figura 5.1.8 dreta), s'observa que no és lineal, sinó que segueix una tendència sigmoïdal, de forma coherent amb la variació en les concentracions de les formes àcida i bàsica teòrica per a indicadors de pH. Aquesta tendència es pot representar de forma acurada mitjançant la següent equació:

$$\text{absorbància (pic)} = y_0 + \frac{a}{1 + \exp(-(x - x_0)/b)} \quad \text{Eq. 5.1.1}$$

L'equació anterior és vàlida per correlacionar el pH amb l'absorbància a la longitud d'ona màxima d'absorció (expressada a l'equació com absorbància (pic)), tant pel pic que defineix la forma àcida com pel que defineix la forma bàsica.

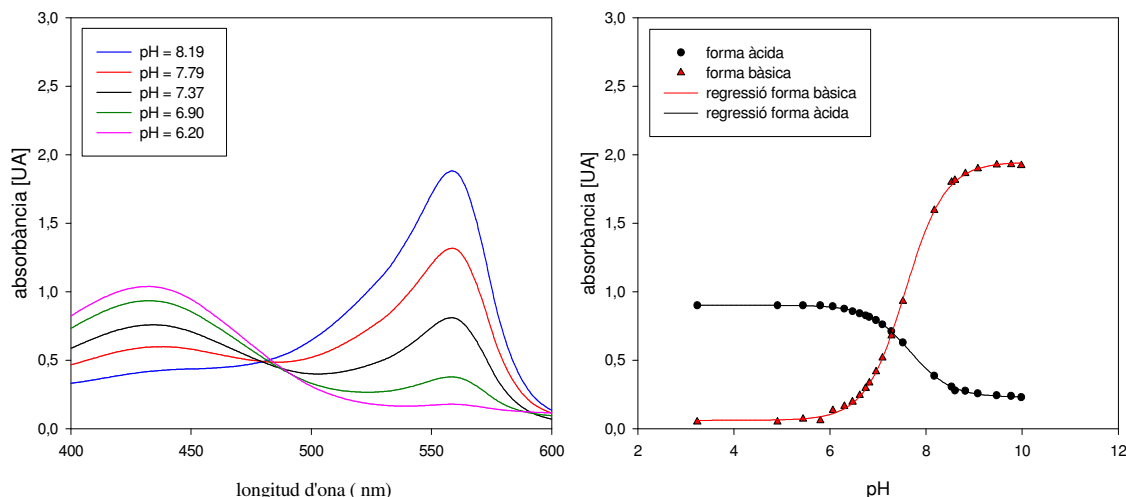


Figura 5.1.8. Variació de l'absorbància d'una solució 15 mg/L de roig de fenol en medi DMEM, en funció del pH (absorció màxima forma àcida ≈ 430 nm; absorció màxima forma bàsica ≈ 560 nm). A l'esquerra, espectres de cadascuna de les mesures entre 400 i 600 nm. A la dreta, calibratges de l'absorbància en funció del pH. Paràmetres calibratge (equació 5.1.1) forma àcida: $a = 0,6726$, $b = -0,4272$, $x_0 = 7,6620$, $y_0 = 0,2286$, $r = 0,9998$; forma bàsica: $a = 1,8851$, $b = 0,4148$, $x_0 = 7,5665$, $y_0 = 0,0608$, $r = 0,9999$.

Tot i que de forma general es considera que el roig de fenol és indicatiu del pH en un rang aproximat entre $\text{pH} = 6,8$ i $\text{pH} = 8,0$ (especificacions del proveïdor Sigma Aldrich), de la figura anterior es pot concloure que el rang de mesura és potencialment més ampli. Tot i que el rang en el qual no augmenta la desviació respecte la regressió és tot el que s'ha avaluat, aproximadament entre $4 < \text{pH} < 10$, per a establir un rang de treball també cal tenir en compte que la variació de pH provingui de variacions significatives d'absorbància com a conseqüència del metabolisme cel·lular. Així, cal combinar el tram on la desviació de les dades experimentals és reduït (tot el tram mesurat) amb el tram on el valor de la variació de l'absorbància dividit per la variació de pH pren valors significatius.

A la figura 5.1.9 es mostra la relació entre la variació d'absorbància i la variació de pH, observant-se que la forma àcida presenta variacions d'absorbància considerablement més reduïdes, de manera que una mesura basada en aquesta forma tindrà potencialment més error. D'altra banda, en les mesures de la forma bàsica es pot observar que per sota de $\text{pH} = 6$ i per sobre $\text{pH} = 9,5$ no hi ha variació significativa d'absorbància, ja que les

dades presentades a l'eix de les ordenades assoleixen valors per sota de 0,05 unitats, que corresponen a variacions absolutes d'absorbància menors de 0,02 UA. De totes maneres, per a establir amb més precisió aquest rang, en aquest moment de l'estudi no es creu convenient fixar un valor de variació absorbància/variació pH com a criteri de disseny i aquesta acció es posposa per a estudis i validacions posteriors.

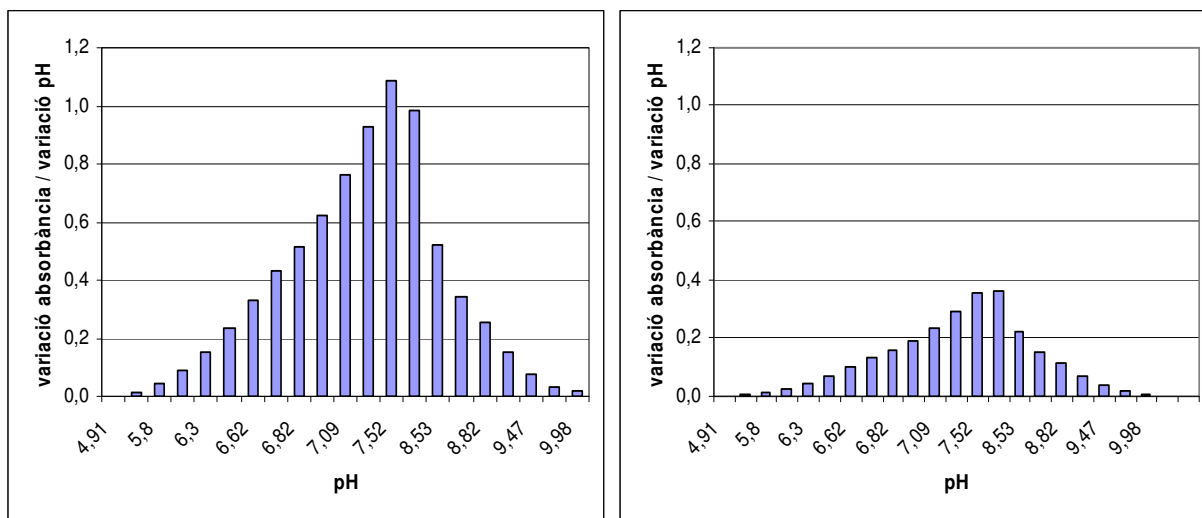


Figura 5.1.9. Representació de la variació d'absorbància per variació d'unitat de pH en funció del pH mesurat. A l'esquerra, a 560 nm (forma bàsica). A la dreta, a 430 nm (forma àcida)..

Un element per aprofundir sobre quina és la validesa dels anteriors calibratges és l'estudi de la interferència potencial que pot provocar en ells la presència de cèl·lules. Cal tenir en compte que els calibratges anteriors s'han realitzat en un medi sense cèl·lules, de manera que a continuació s'ha repetit el darrer experiment, amb una solució 15 mg/L de roig de fenol en DMEM, afegint una densitat cel·lular aproximadament de 15×10^5 Cèl·l./mL.

A la gràfica 5.1.10 es mostren els resultats, podent-se observar que pràcticament no hi ha variació pel que fa a l'absorbància de la forma àcida. Així doncs, en el cas en què es treballi amb suspensions cel·lulars només serà possible seguir l'evolució del pH en base a la variació de la forma bàsica. Un altre aspecte a destacar de la gràfica, i que marcarà el model de càlcul del pH és la presència d'una línia base que depèn de la quantitat de cèl·lules. Per a mesurar únicament l'absorbància deguda a l'indicador de pH caldrà comprovar la precisió de restar-li l'absorbància deguda a les cèl·lules, que per no estar interferida pel pH haurà de mesurar-se a longituds d'ona més elevades i transformar-se a la dada que correspondria a l'efecte de les cèl·lules a 560 nm, corregint de forma acurada la mesura de pH.

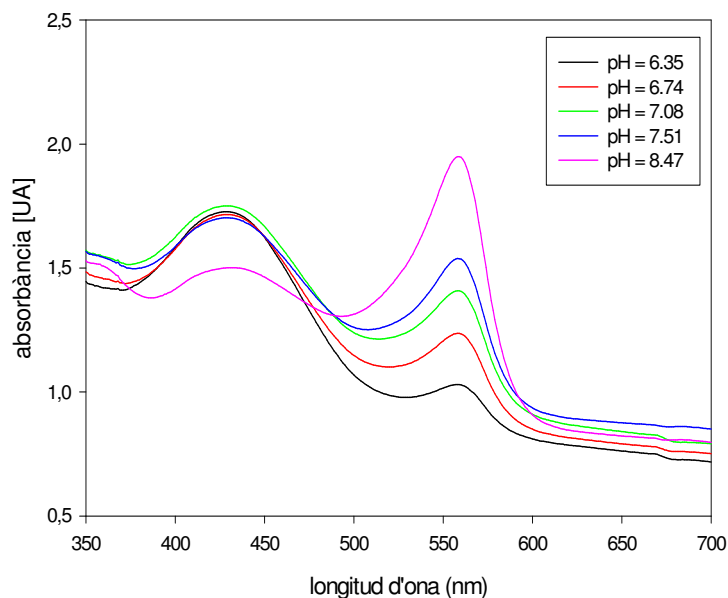


Figura 5.1.10. Variació de l'absorbància d'una solució 15 mg/L en roig de fenol (medi DMEM, densitat cel·lular 15×10^5 Cèl·l./mL) en funció del pH (absorció màxima forma àcida ≈ 430 nm; absorció màxima forma bàsica ≈ 560 nm).

Aquesta definició i validació d'un model de càlcul es posposa per a etapes posteriors, ja que una vegada identificada la possibilitat d'obtenir dades de base per a mesurar pH i concentració cel·lular, s'ha procedit a abordar la fabricació d'un sistema de cultiu prototip d'un únic minibioreactor, integrant tecnologies personalitzades (desenvolupament realitzat al Grup d'Instrumentació Electrònica i Biomèdica del Departament d'Enginyeria Electrònica, UPC), sobre les quals s'ha treballat amb el refinat i validació dels mètodes de mesura de pH i concentració cel·lular.

5.1.2. Adaptació del sistema òptic desenvolupat a un equip d'un únic minibioreactor

Un cop dissenyat i construït parcialment un sistema de cultiu d'un únic minibioreactor que incorpora sistemes propis d'agitació, control de temperatura, i mesura òptica d'absorbància, s'ha realitzat unes primeres proves de calibratge de cèl·lules i pH, per comprovar quina influència tenien sobre les mesures els canvis proposats en el sistema de mesura òptica d'absorbància.

En aquest sistema d'un únic minibioreactor es deixa d'emprar un espectrofotòmetre convencional i s'inicia el desenvolupament d'un de personalitzat amb una font de llum situada directament a la base del minibioreactor i una fibra òptica a la part superior que

conduirà la llum transmesa fins a la caixa on es situa l'electrònica de l'equip, on s'integra una xarxa de difracció i un detector fotomètric que permet la realització de mesures espectrofotomètriques.

Les proves prèvies a la construcció del sistema òptic adaptat al sistema d'un únic minibioreactor (realitzades als laboratoris del Grup d'Instrumentació Electrònica i Biomèdica, del Departament d'Enginyeria Electrònica, Universitat Politècnica de Catalunya) han contemplat la utilització d'un muntatge amb una font de llum situada directament sota el minibioreactor, i per a la detecció s'ha mantingut la utilització de l'espectrofotòmetre comercial emprat fins aquests moments (UV/VIS Spectrometer system, Steag Microparts, Dortmund, Alemanya). A la figura 5.1.11 es mostra un esquema simplificat d'aquest muntatge, que s'expandeix amb més detall al Capítol de Materials i Mètodes, figura 8.2.7.

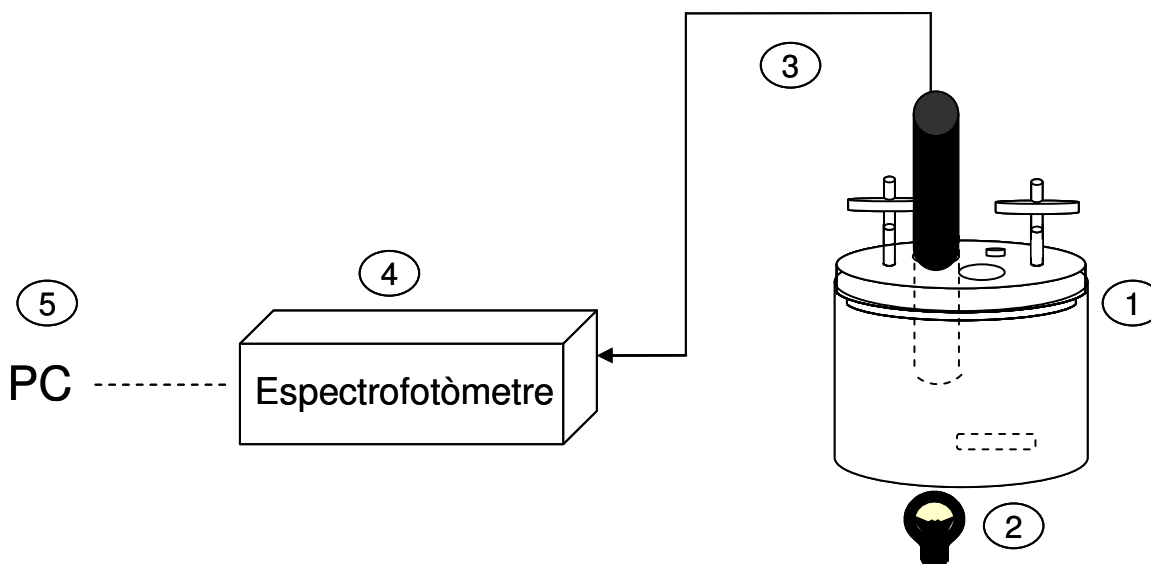


Figura 5.1.11. Esquema simplificat del muntatge emprat per avaluar els efectes de canvi del set-up òptic. Components: 1) Minibioreactor, 2) font de llum (Luxeon LXHL-BW03 warm-white LED) situada a la base del minibioreactor, 3) Fibra òptica de recepció, 4) espectrofotòmetre comercial de Steag Microparts, i 5) PC per a l'adquisició de dades.

Amb el muntatge presentat, s'han realitzat mesures de pH i concentració cel·lular, repetint els experiments realitzats amb el muntatge previ. En el calibratge d'absorbància, s'ha emprat una suspensió cel·lular d'hibridomes en PBS, amb concentracions aproximadament entre 2 i 25×10^5 Cèl·l./mL, i s'ha mesurat l'absorbància a 650 nm. Cal comentar que la longitud d'ona per a la mesura de la concentració cel·lular, que fins aquests moments havia estat de 700 nm s'ha modificat a

650 nm ja que la font de llum emprada tenia un espectre amb poca intensitat lumínica per sobre d'aquesta longitud d'ona. Com a referència s'ha mesurat també l'absorbància emprant un espectrofotòmetre convencional (NOVASPEC). Per al calibratge de pH s'ha emprat una solució de roig de fenol (15 mg/L) en medi DMEM, i amb el muntatge de la figura 5.1.11 (i figura 8.2.7 de Materials i Mètodes) s'han mesurat els espectres d'absorbància entre 400 i 600 nm.

A la figura 5.1.12 es mostren els resultats obtinguts, observant-se bàsicament els dos efectes següents:

- D'una banda, la mesura d'absorbància amb el prototip no és comparable a la d'un espectrofotòmetre convencional. Tal com s'observa a la figura, s'han hagut d'emprar dos eixos diferents per a representar l'absorbància, donats els valors reduïts mesurats amb el muntatge experimental (s'assoleix com a màxim un valor d'absorbància de 0,06 UA, mentre que per a la mateixa concentració cel·lular, amb l'espectrofotòmetre de referència es mesura una absorbància d'aproximadament 0,3 UA).
- D'altra banda, tot i que l'indicador de pH era eficientment detectable en la seva forma bàsica, emprant el sistema prototip, pràcticament no es podien detectar les cèl·lules animals en el seu rang habitual de concentracions en cultiu.

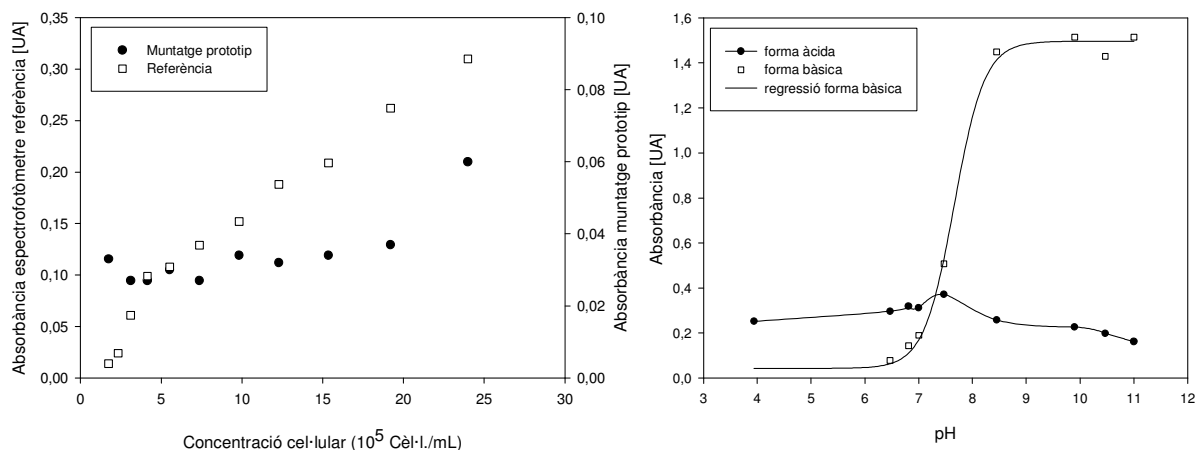


Figura 5.1.12. Esquerra, calibratge de l'absorbància (650 nm) a diferents concentracions cel·lulars realitzat amb el muntatge prototip (presentat a la figura 5.1.11), així com amb un espectrofotòmetre de referència (NOVASPEC). Dreta, calibratge de l'absorbància de les formes àcida (430 nm) i bàsica (560 nm) de l'indicador de pH amb el muntatge experimental. Paràmetres calibratge forma bàsica: $a=1,4527$, $b=0,2816$, $x_0=7,6621$, $y_0=0,0431$.

Per tal de millorar la sensibilitat de l'aparell, la primera aproximació fou integrar més punts de mesura al voltant de la longitud d'ona per a les cèl·lules animals (650 nm), per tal d'augmentar nombre de mesures per a obtenir el valor d'absorbància a aquesta longitud d'ona, i d'aquesta manera reduir l'error. En concret, s'han integrat dades en un entorn de +/-20 nm. Fet aquest canvi, que consisteix únicament en modificacions a nivell de programari, s'han repetit els experiments de calibratge d'una suspensió cel·lular d'hibridomes en PBS, amb concentracions aproximadament entre 2 i 20×10^5 Cèl·l./mL, mesurant l'absorbància a 650 nm (+/- 20 nm).

A la figura 5.1.13 s'observa que la sensibilitat de la mesura augmenta significativament respecte a l'observat a la figura 5.1.12. En aquest cas es comença a poder detectar la variació de l'absorbància a mesura que canvia la concentració de cèl·lules, però amb una sensibilitat força lluny de l'esperada (es detectaren concentracions majors de $8-10 \times 10^5$ Cèl·l./mL), i amb valors absoluts d'absorbància mesurada molt reduïts en comparació amb els de l'espectrofotòmetre de referència (NOVASPEC).

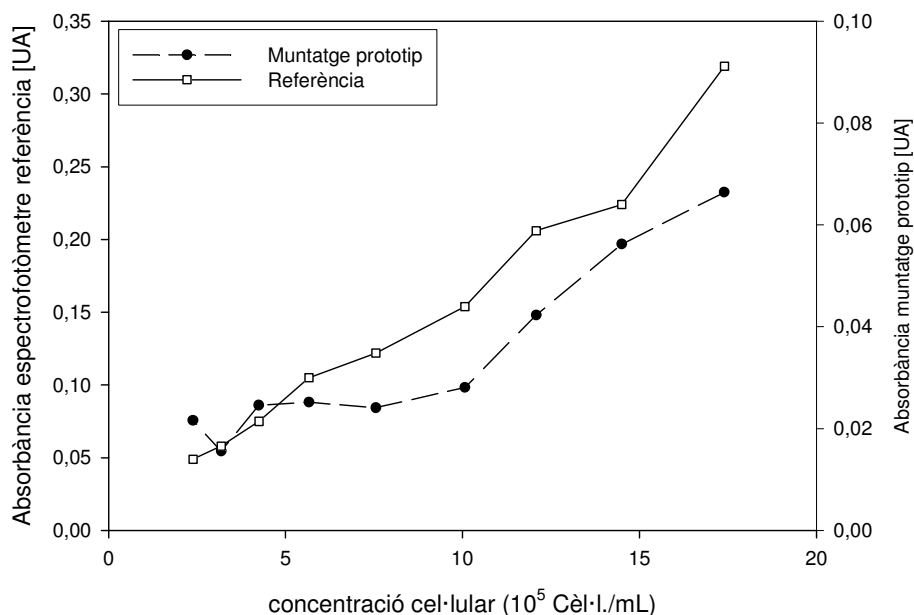


Figura 5.1.13. Calibratge de l'absorbància a diferents concentracions cel·lulars realitzat amb el muntatge prototip (presentat a la figura 5.1.11) a 650 +/- 20 nm, així com amb un espectrofotòmetre de referència (NOVASPEC) a 650 nm.

Analitzant el muntatge òptic emprat i comparant-lo amb els dels espectrofotòmetres convencionals es va arribar a la conclusió que tant l'efecte de manca de precisió com el de no comparabilitat amb altres espectrofotòmetres era degut a que les mesures no es realitzaven sobre un feix de llum plano-paral·lel, sinó que aquest tenia un gran angle d'obertura, tant des de la zona d'il·luminació (font de llum emprada) com en la zona de

recepció (fibra òptica) (veure representació esquemàtica de la transmissió de la llum a la figura 5.1.14). Això provoca que, d'una banda, no es compleixi la llei de Lambert-Beer i d'altra banda, que hi hagi una influència de les dispersions de la llum o *scattering* important en la mesura, ja que la fibra òptica de mesura captarà dispersions de la llum produïdes en cèl·lules fora del feix ideal de llum.

El fenomen de *scattering* o de dispersions (s'utilitzaran indistintament ambdós termes), es pot descriure de la següent forma: quan un feix de llum incideix sobre un sistema biològic de cèl·lules o altres estructures, part de la llum s'absorbeix, part es dispersa i la resta es transmet. Tant la llum transmesa com la dispersada s'empren com a sistemes per obtenir informació de les cèl·lules. Si bé el sistema més habitual per al seguiment dels cultius parteix de la mesura de la llum transmesa (absorbància), la llum dispersada ofereix també la possibilitat de mesurar la concentració cel·lular, i també permet obtenir informació sobre les propietats morfològiques de les cèl·lules i grans estructures subcel·lulars: mida, forma, estat d'agregació, entre d'altres (Latimer, 1982; Mourant i Col., 1998; Xu i Col., 2008).

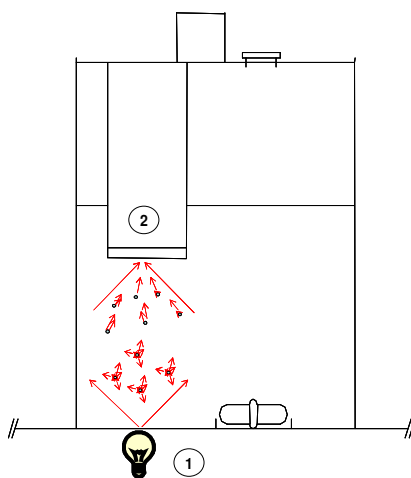


Figura 5.1.14. Esquema d'un minibioreactor i de la transmissió de la llum en el seu interior. Aquesta parteix de 1) la font emissora, situada a l'inferior del minibioreactor, i travessant les interfícies plàstiques del reactor i la suspensió present en aquest, es recull en 2) la fibra òptica de recepció situada al port òptic de la tapa del minibioreactor, perfectament alineada amb la font de llum. Al tenir angles d'obertura elevats, es capten dispersions de la llum de partícules d'una zona massa àmplia per tal que es pugui complir la llei de Lambert-Beer.

La teoria més emprada per a descriure les bases del *scattering* és la de Lorenz-Mie. Tot i que bibliogràficament es troba referenciada com a teoria, de fet no és tal sinó una solució analítica a les equacions que descriuen la dispersió de radiació electromagnètica

per part de partícules esfèriques. Un aspecte important per explicar com es dona l'*scattering* és la mida de la partícula. Quan les partícules són petites ($x < 1/3$, essent $x = 2\pi a/\lambda$, on a és el radi de l'esfera i λ la longitud d'ona), hi ha una solució analítica vàlida per partícules petites, i es parla de *scattering* molecular, mentre que per $x > 3$, hi ha una solució analítica vàlida per partícules grans, entre les quals es troben cèl·lules i grans estructures subcel·lulars. En el cas de partícules grans, amb índexs de refracció relativament baixos (com ara suspensions cel·lulars en aigua), els mecanismes de *scattering* que es donen principalment són una combinació de difracció i interferència.

A nivell comercial, existeixen diferents equips per a la mesura de la concentració cel·lular basats en la dispersió de la llum (sondes de *backscattering*), entre els quals es poden destacar les sondes Aquasant AF 44 S/R (Aquasant-Messtechnik AG, Bubendorf, Switzerland), i Ingold FSC 402 (Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Switzerland). En teoria, però, per a cultius amb concentracions cel·lulars relativament baixes, com és el cas de les cèl·lules animals, les sondes de mesura d'absorbància poden detectar amb major precisió concentracions cel·lulars baixes (Wu i Col, 1995). Així doncs, a nivell comercial també es troben sistemes de mesura basats en la mesura d'absorbància, que cobriran de forma preferent el rang baix de concentracions cel·lulars, com els que es troben en els equips de Cellstation (Fluorometrix, Baltimore, USA), o bé en els equips en desenvolupament presentats per Maharbiz i Col. (2003), o bé Kostov i Col. (2001).

5.1.2.1. Millora de la sensibilitat de les mesures d'absorbància

Per a poder iniciar els treballs de millora de la sensibilitat en les mesures han estat necessaris uns primers experiments que permetessin la comprovació de la hipòtesi realitzada. Cal comentar que, tant en aquest experiment com en els altres realitzats en aquest apartat a partir d'aquest punt, es van emprar microesferes (liposomes) de $2 \mu\text{m}$ enlloc de cèl·lules, degut a la major facilitat de treball amb material no biològic, que permetia assegurar una major homogeneïtat de la mostra en termes de diàmetre, forma i d'estat de les esferes. Per a una major comprensió de les dades que es presenten a continuació, manca afegir que l'absorbància equivalent a un inòcul d'hibridomes a 2×10^5 Cèl·l./mL es pot considerar que és aproximadament de 0,050 UA (mesurada amb l'espectrofotòmetre de referència NOVASPEC).

Comprovació de l'existència de *scattering*

Per poder confirmar que la hipòtesi de l'existència d'un fenomen de dispersions era la que provocava les desviacions de la mesura del sistema prototip enfront a espectrofotòmetres de referència, s'ha realitzat un muntatge per tal de comprovar-ho. El

sistema experimental (veure esquema a la figura 5.1.15) ha mantingut els elements de mesura emprats fins aquest moment, però amb els accessoris necessaris per tal de tenir un feix de llum plano-paral·lel i de diàmetre reduït i així evitar les possibles dispersions de llum que es suposa que existeixen. Per tal d'aconseguir aquest tipus de feix, es va realitzar un muntatge emprant una font de llum situada a una distància elevada (per sota) del minibioreactor, i enfocant el feix de llum sobre el port òptic s'aconseguí que entre la paret de la base del minibioreactor i la del port òptic de mesura, el feix fos plano-paral·lel i tingués un diàmetre reduït.

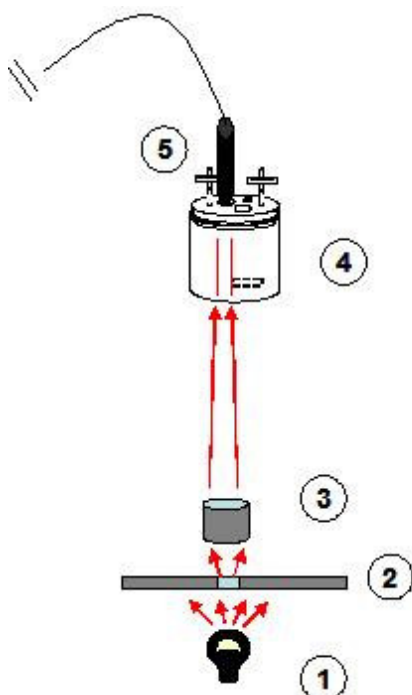


Figura 5.1.15. Esquema del muntatge construït per tal de comprovar la hipòtesi que no tenir un feix plano-paral·lel és la causa de les problemàtiques de mesura òptica. Aquest consta de: 1) una font de llum (Luxeon LXHL-BW03 warm-white LED), 2) una làmina perforada (amb un forat de 0,5 mm de diàmetre i 1 mm de profunditat), 3) una lent per a col·limar la llum (NSG SLW 300-S11-078) situada sobre la làmina perforada (Edmund Optics, NT56), 3) un minibioreactor plàstic situat a una determinada distància de la lent, i 4) una fibra òptica de recepció que transmet la llum a l'espectrofotòmetre Steag Microparts UV/VIS Spectrometer system.

Amb aquest muntatge, s'ha realitzat un experiment partint d'una suspensió de liposomes amb una absorbància a 650 nm (mesurada amb l'espectrofotòmetre de referència) comparable a la de les concentracions de cèl·lules màximes mesurades (aproximadament 25×10^5 Cèl·l./mL), i s'han anat realitzant dilucions successives, prenent mesures d'absorbància amb el muntatge (a 650 ± 20 nm) i amb l'espectrofotòmetre de referència (a 650 nm).

A la figura 5.1.16 es mostren les mesures d'absorbància emprant ambdós sistemes en funció de la dilució aplicada a la suspensió inicial. En aquesta gràfica es pot observar com, tot i que hi ha un cert soroll en la mesura obtinguda amb el muntatge de la figura 5.1.15, per primera vegada els valors absoluts de les absorbàncies mesurades tenen magnituds comparables. Així doncs, si realitzant les mesures amb un muntatge que

permet disposar d'un feix plano-paral·lel s'observa un comportament més similar entre ambdós sistemes, es considera validada la hipòtesi que anteriorment existia un problema de dispersió de la llum (*scattering*), per la qual caldrà abordar una solució. De totes maneres encara hi ha una diferència en els pendents observats en el calibratge de cada sistema (existeix una variació del 32% respecte l'espectrofotòmetre de referència), probablement degut a que l'angle d'acceptació de la fibra de recepció és relativament elevat i pot captar certes dispersions.

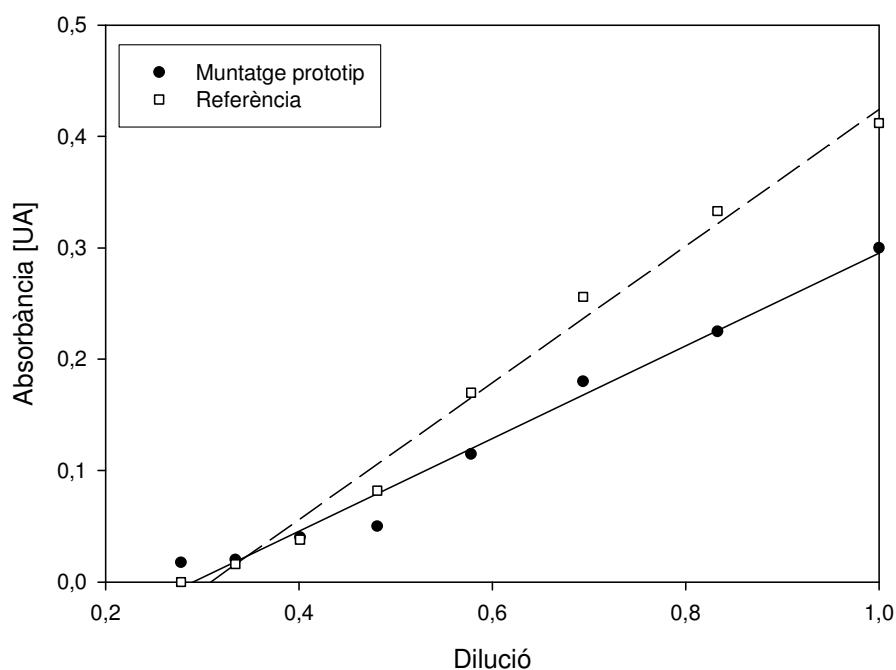


Figura 5.1.16. Calibratges amb el muntatge òptic de la figura 5.1.15, emprant liposomes de 2 μm com a model, a 650 nm amb l'espectrofotòmetre de referència (NOVASPEC) i a 650 \pm 20 nm amb l'espectrofotòmetre Steag Microparts UV/VIS Spectrometer system. L'absorbància mesurada en cada sistema es presenta en funció de la diluïó aplicada a la suspensió inicial.

Realització de millores en el sistema de mesura d'absorbància

Havent comprovat que l'existència d'un fenomen de dispersions en la mesura era el que estava provocant que les dades obtingudes no fossin comparables a espectrofotòmetres de referència, i feien que la relació senyal/soroll es reduís i, per tant, es perdés sensibilitat en el sistema, s'han explorat diferents alternatives per a permetre la millora de sensibilitat del sistema.

Al diagrama de flux presentat a la figura 5.1.17 es presenta la planificació experimental que es planteja per tal d'assolir aquesta millora. Resumint-ne el contingut, aquest s'ha

fonamentat en reduir els angles d'obertura de la font de llum i de la fibra òptica de recepció. En paral·lel s'ha realitzat els experiments on únicament s'ha reduït l'angle d'obertura de la fibra òptica, i els experiments on s'ha reduït tant aquest angle com el de la font de llum, contemplant aquesta darrera alternativa la utilització de lents, així com de forats amb una relació llargada/diàmetre elevada.

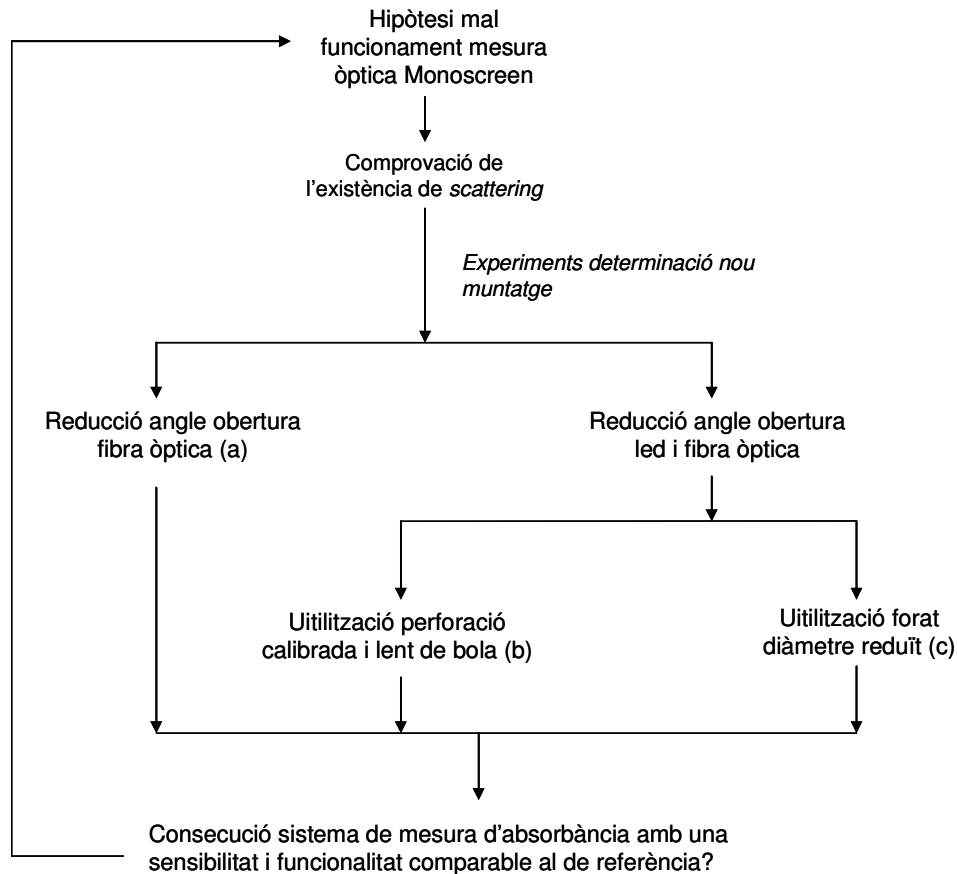


Figura 5.1.17. Diagrama de flux amb els experiments per a la millora de la sensibilitat del sistema de mesura d'absorbància dels minibioreactors. (a) Reducció de l'angle d'obertura de la fibra òptica de recepció; (b) Reducció de l'angle d'obertura de la font de llum i de la fibra òptica de recepció. Muntatge òptic amb una làmina amb un forat calibrat i una lent de bola; (c) Reducció l'angle d'obertura de la font de llum i de la fibra òptica de recepció. Muntatge òptic emprant un forat amb una relació llargada/diàmetre elevada.

A continuació es presenten els resultats dels experiments contemplats en el diagrama anterior, referenciats al diagrama com a (a), (b), i (c):

- (a) Reducció de l'angle obertura de la fibra òptica de recepció. Els muntatges emprats fins aquest punt que tenien com a base el sistema d'un únic

minibioreactor (figura 5.1.11 i 8.2.7 al capítol de Materials i Mètodes) i també el muntatge emprat per a la comprovació de l'existència d'un fenomen de dispersions (figura 5.1.15) seguien tenint un angle d'obertura (60°) elevat en la fibra òptica de recepció. En aquest experiment s'ha substituït la fibra òptica de recepció per una amb una obertura numèrica inferior (passant de 60° a 22°), i novament amb una suspensió de liposomes amb una absorbància a 650 nm (mesurada amb l'espectrofotòmetre de referència) comparable a les concentracions de cèl·lules màximes mesurades (aproximadament 25×10^5 Cèl·l./mL), s'han anat realitzant dilucions successives, comparant les mesures d'absorbància obtingudes amb el muntatge (650 ± 20 nm) amb les obtingudes amb l'espectrofotòmetre de referència (650 nm).

Els resultats (figura 5.1.18) mostren com l'ordre de magnitud de les mesures obtingudes amb ambdós espectrofotòmetres és similar, tot i que existeix un cert *off-set* entre els resultats d'ambdós sistemes. La desviació del pendent de calibratge per al muntatge experimental és d'un 14% respecte el pendent obtingut amb l'espectrofotòmetre de referència. Aquesta desviació és més reduïda que l'observada a la figura 5.1.18, de manera que aquests resultats mostren que la influència de l'angle d'acceptació de la fibra és elevada.

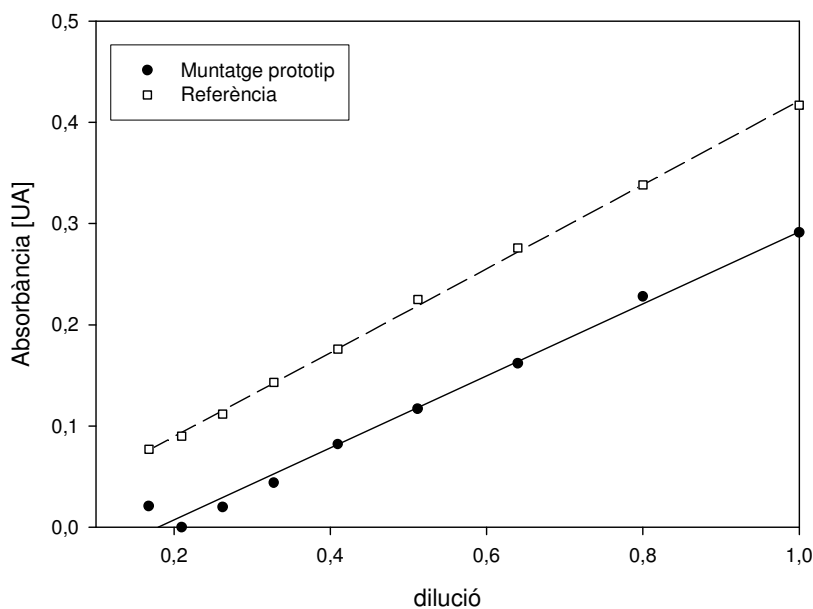


Figura 5.1.18. Absorbància mesurada, emprant liposomes de $2 \mu\text{m}$, amb el muntatge experimental de la figura 5.1.18 a 650 ± 20 nm i amb un sistema de referència (NOVASPEC) a 650 nm, en funció de la dilució aplicada a una suspensió inicial de liposomes.

Tot i les millores obtingudes, les absorbències mesurades amb el sistema d'un únic minibioreactor segueixen mostrant un *off-set* respecte les de referència, de manera que caldrà seguir fent més passos per a millorar el sistema.

- (b) Reducció de l'angle d'obertura de la font de llum i la fibra òptica de recepció:
Muntatge òptic amb una làmina amb un forat calibrat, una lent de bola i una finestra de zafir.

Per a la realització d'aquest experiment, s'ha emprat el mateix muntatge presentat a la figura 5.1.18, però en aquest cas la font de llum no estava situada sobre el sistema d'un únic minibioreactor, sinó que la font de llum estava integrada en una platina situada sota el minibioreactor, on hi havia la font de llum, seguida d'una làmina amb un forat calibrat de 100 μm (Edmund Optics, NT56), una lent de bola (Edmund Optics, NT45) que recollia la llum i una finestra de zafir (Edmund Optics, NT43), que separava la lent del minibioreactor. A continuació (figura 5.1.19) es mostra una representació simplificada del detall de la zona del muntatge substituïda respecte l'emprat anteriorment.

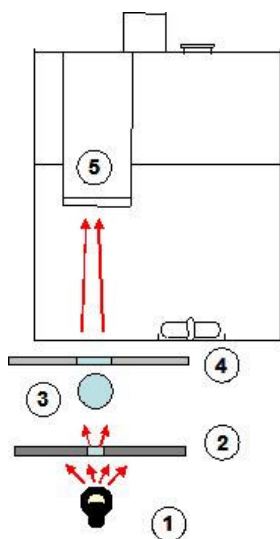


Figura 5.1.19. Detall del muntatge emprat en aquesta etapa experimental. Els components senyalats són: 1) font de llum (Luxeon LXHL-BW03 warm-white LED), 2) làmina amb una perforació calibrada de 100 μm (Edmund Optics, NT56), 3) lent de bola (Edmund Optics, NT45) on només entra la llum que entra en un determinat angle, 4) finestra de zafir (Edmund Optics, NT43) que separa la lent del fons plàstic del minibioreactor, i 5) port del minibioreactor on es situa la fibra òptica de recepció.

Per a la realització dels calibratges novament s'ha emprat la fibra òptica de recepció amb una obertura numèrica de 22° i una suspensió de liposomes amb una absorbència comparable a les concentracions de cèl·lules màximes mesurades (aproximadament 25×10^5 Cèl·l./mL). A partir d'aquesta suspensió,

s'han anat realitzant dilucions successives, i prenent mesures d'absorbància amb el muntatge experimental (a 650 +/- 20 nm) i amb mesures d'absorbància que s'han realitzat a 650 nm en el cas de l'espectrofotòmetre de referència.

En aquest cas, durant la realització de mesures s'ha pogut observar que aquest és un muntatge òptic on es descarta una porció important de la llum per després transmetre-la com un feix paral·lel. Això ha provocat que s'hagués de treballar amb temps d'integració deu vegades més elevats en comparació amb els altres experiments, i tot i això el nombre absolut de comptes (unitat amb la que l'espectrofotòmetre expressa la mesura d'intensitat lumínica) era molt reduït (aproximadament 1.000 comptes, quan el normal es situa de 30.000 a 50.000 comptes), podent portar aquest fet a un potencial error en la mesura, degut a que la desviació respecte les especificacions del fabricant del detector espectrofotomètric (Steag Microparts GmbH, Dortmund, Alemanya), que recomana tenir entre 30.000 i 50.000 comptes.

Tal com es pot observar a la figura 5.1.20, en aquest cas el valor absolut de les mesures amb els dos sistemes és altament comparable, i la variació entre els pendents dels calibratges realitzats és força reduïda, amb una desviació del 13% respecte l'espectrofotòmetre de referència.

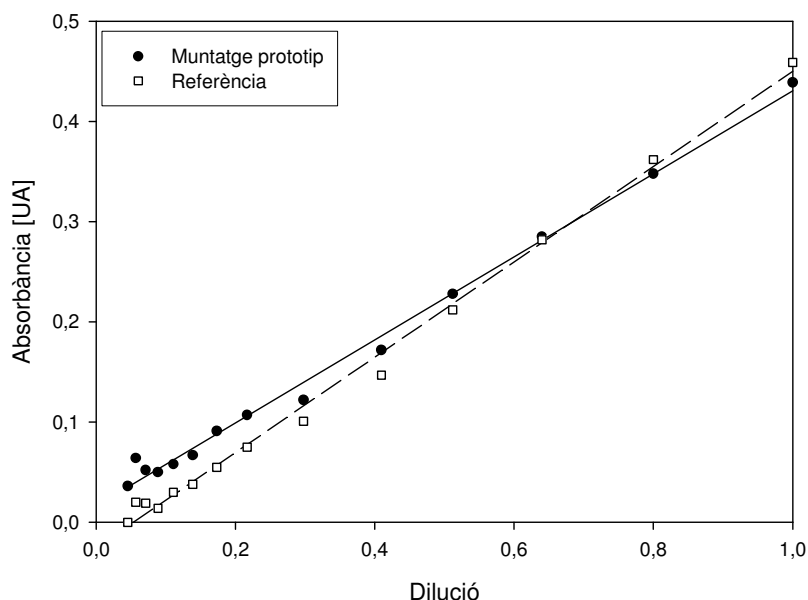


Figura 5.1.20. Absorbància mesurada amb el muntatge experimental (presentat a la figura 5.1.19) a 650 +/-20 nm, i en un sistema de referència (NOVASPEC) a 650 nm, en funció de la dilució aplicada a una suspensió de liposomes.

La linealitat d'ambdós calibratges és elevada, amb valors de $r^2 = 0,994$ per al muntatge experimental emprat i $r^2 = 0,995$ per a l'espectrofotòmetre de referència. Les majors desviacions respecte la linealitat s'observen per valors d'absorbància inferiors a 0,014 UA (mesurada amb l'espectrofotòmetre de referència), que corresponen a valors inferiors a la densitat cel·lular habitualment emprada per a la inoculació dels bioreactors (2×10^5 Cèl·l./mL).

Aquest experiment, on s'ha avaluat conjuntament els efectes d'una reducció de l'obertura numèrica per la part superior i inferior del minibioreactor ha mostrat un bons resultats, tot i que al tenir una intensitat lumínica anormalment baixa, aquest fet pot estar potenciant l'error en la mesura, de manera que per a millorar aquest aspecte en els experiments següents s'ha intentat incrementar la intensitat de llum.

- (c) Reducció angle de l'angle d'obertura de la font de llum i la fibra òptica de recepció: set-up òptic sense lent, emprant únicament un forat amb una relació llargada/diàmetre elevada, a continuació de la font de llum.

Veient que el conjunt format per un forat calibrat i una lent de bola tenia moltes pèrdues de llum, s'ha construït un muntatge sense cap lent per a permetre assegurar que el feix de llum no tingui un angle d'obertura elevat. D'entre les alternatives que s'ha avaluat, s'ha seleccionat la utilització d'un forat com l'emprat en el muntatge anterior, però amb una relació de profunditat/diàmetre el més elevada possible (dins els límits associats a les possibilitats de mecanització). Aquesta relació en les dimensions del forat permet que els feixos de llum que el travessen tinguin un angle de sortida reduït.

A la figura següent es mostra un esquema del muntatge emprat, que finalment ha contemplat un forat de 0,5 mm de diàmetre i 1,0 mm de profunditat situat immediatament després de la font de llum.

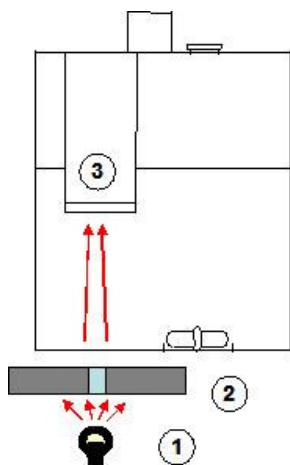


Figura 5.1.21. Representació esquemàtica del muntatge per a reduir l'angle d'obertura a la base del minibioreactor mitjançant la utilització dels següents components: 1) una font de llum (Luxeon LXHL-BW03 warm-white LED), 2) un forat 0,5 mm de diàmetre i 1,0 mm de profunditat i 3) port del minibioreactor on es situa la fibra òptica de recepció.

Les proves preliminars realitzades amb aquest muntatge han mostrat que permetia el pas d'una intensitat lumínica suficient per assolir un nombre de comptes considerat prou elevat pel fabricant del detector espectrofotomètric (30.000-50.000) (Steag Microparts GmbH, Dortmund, Alemanya), i que tot i que el feix de llum presentava un cert angle d'obertura, era força més reduït que sense la presència del forat.

Per a la realització dels calibratges novament s'ha emprat la fibra òptica de recepció amb una obertura numèrica de 22° i una suspensió de liposomes amb una absorbància comparable a les concentracions de cèl·lules màximes mesurades (aproximadament 25×10^5 Cèl·l./mL). A partir d'aquesta suspensió, s'han anat realitzant dilucions successives, i prenent mesures d'absorbància a amb el muntatge experimental (a 650 +/- 20 nm) i amb mesures d'absorbància s'han realitzat a 650 nm en el cas de l'espectrofotòmetre de referència

L'experiment efectuat amb aquest sistema (veure figura 5.1.22), mostra que la linealitat d'ambdós calibratges és elevada, amb valors de $r^2 = 0,993$ per al muntatge experimental emprat i $r^2 = 0,999$ per a l'espectrofotòmetre de referència. En aquest cas però, la sensibilitat de mesura del muntatge experimental és més elevada respecte experiments anteriors, i prenent el tram d'absorbància (NOVASPEC, 650 nm) entre 0,0 UA i 0,1 UA, la linealitat segueix essent molt alta, amb valors de $r^2 = 0,998$ per al muntatge experimental emprat, mentre que per a l'espectrofotòmetre de referència baixa a $r^2 = 0,990$. Traduint aquest augment de sensibilitat a concentracions de cèl·lules animals mesurables, aquest arriba a valors inferiors als dels inòculs habitualment emprats (2×10^5 Cèl·l./mL).

Tot i els bons resultats observats, es pot observar que encara es manté una diferència en els pendents dels calibratges realitzats (17% respecte l'espectrofotòmetre de referència), que pot ser deguda a que encara romangui una certa presència de dispersions deguda a l'angle d'obertura de la llum.

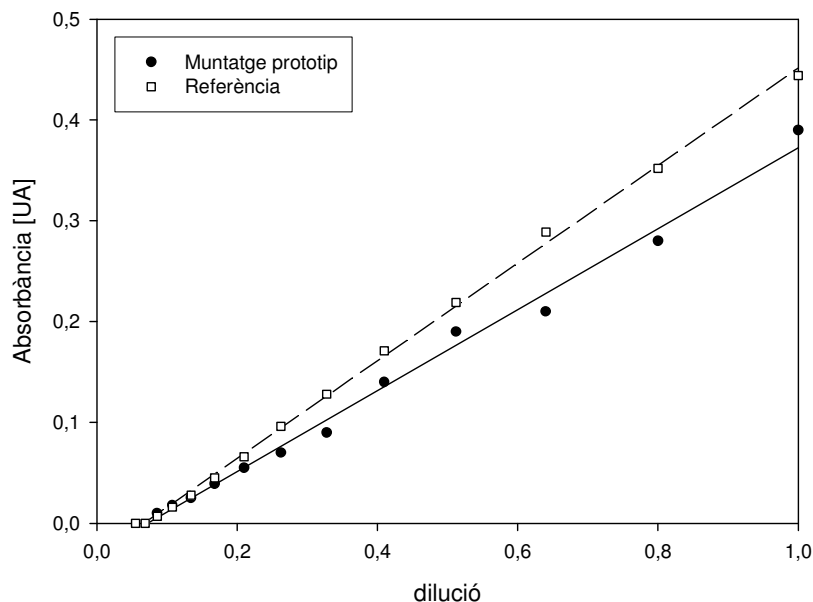


Figura 5.1.22. Absorbància mesurada amb el muntatge experimental (presentat a la figura 5.1.21) a 650 +/-20 nm i en un sistema de referència (NOVASPEC) a 650 nm, en funció de la diluïció aplicada a una suspensió de liposomes.

Els resultats obtinguts amb el muntatge de la figura 5.1.22 ja permeten que aquesta configuració d'elements òptics pugui ser fixada com la que ha de ser incorporada en els sistemes de cultiu, ja que la sensibilitat és prou elevada com per cobrir tot el rang de concentracions cel·lulars habituals ($2\text{-}20 \times 10^5$ Cèl·l./mL), i la diferència de pendents respecte un espectrofotòmetre de referència és calibrable.

De totes maneres, per acabar d'ajustar la separació entre pendents i comprovar que aquest fenomen era degut a l'angle d'obertura de la font de llum, s'ha afegit una lent plano-convexa (Edmund Optics, K32-471) a continuació del forat, de manera que l'angle de la llum fos encara més reduït (veure un esquema del muntatge a la figura 5.1.23).

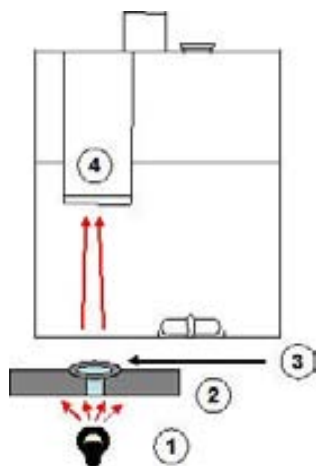


Figura 5.1.23. Representació esquemàtica del muntatge per a reduir l'angle d'obertura a la base del minibioreactor mitjançant la utilització dels següents components: 1) una font de llum (Luxeon LXHL-BW03 warm-white LED), 2) un forat 0,5 mm de diàmetre i 1,0 mm de profunditat, 3) una lent plano-convexa (Edmund Optics, K32-471) i 4) port del minibioreactor on es situa la fibra òptica de recepció.

En aquest cas, l'experiment efectuat és exactament el mateix que l'explicat per al cas immediatament anterior, amb la única diferència en la configuració òptica acabada de comentar.

En els resultats obtinguts (figura 5.1.24) s'observa que els calibratges obtinguts tenen una elevada linealitat, amb valors de $r^2 = 0,993$ per al muntatge experimental emprat i $r^2 = 0,999$ per a l'espectrofotòmetre de referència. Novament, en el tram d'absorbàncies baixes, mesurades amb l'espectrofotòmetre de referència entre 0,0 UA i 0,1 UA, la linealitat segueix essent molt alta per al muntatge experimental emprat, amb $r^2 = 0,997$ ($r^2 = 0,994$ per l'espectrofotòmetre de referència). Referent a la comparabilitat entre ambdós sistemes de mesura, aquesta és molt elevada, essent la diferència entre els pendents solament d'un 1,9% respecte l'espectrofotòmetre de referència.

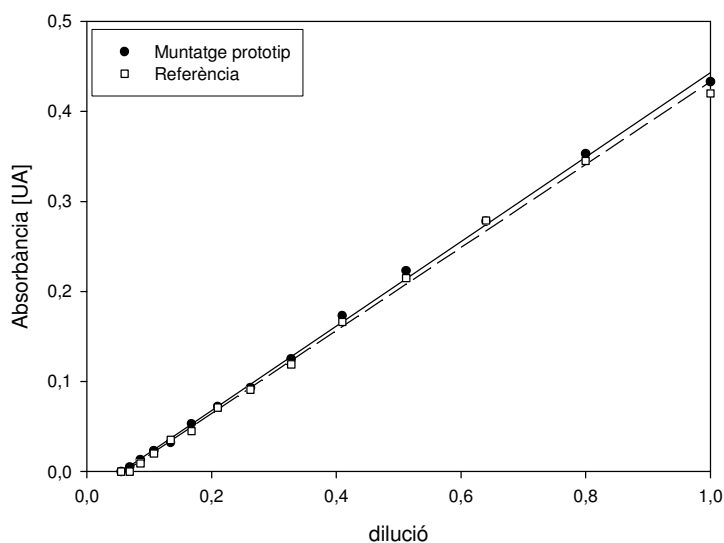


Figura 5.1.24. Absorbància mesurada amb el muntatge experimental (presentat a la figura 5.1.23) a 650 ± 20 nm i en un sistema de referència (NOVASPEC) a 650 nm, en funció de la dilució aplicada a una suspensió de liposomes.

Havent determinat que l'alternativa experimental (c) (*Reducció l'angle d'obertura de la font de llum i de la fibra òptica de recepció. Set-up òptic emprant un forat amb una relació llargada/diàmetre elevada*), és aquella que permet una sensibilitat en tot el rang de concentracions cel·lulars d'interès ($2-20 \times 10^5$ Cèl·l./mL), bé sigui emprant una lent, o bé sense, s'ha procedit a completar la construcció d'un sistema òptic integral en l'equip d'un únic minibioreactor. Per simplicitat i limitacions d'espai, finalment, per la part d'il·luminació s'ha optat pel sistema que no contemplava cap lent, i per a la part de detecció, s'ha emprat una fibra òptica amb 22° d'angle d'acceptació, amb dues connexions cap a l'interior de la caixa que incorpora l'electrònica del sistema d'un únic minibioreactor del tipus SMA, fins arribar al microespectrofotòmetre (Steag microparts UV/VIS microspectrometer module). Per a major detall d'aquest sistema de cultiu, veure'n els detalls al capítol de Materials i Mètodes, A les figures 8.2.8 i 8.2.9.

Per a comprovar la funcionalitat dels canvis realitzats, s'ha tornat a realitzar un experiment de calibració amb una suspensió de liposomes de $2 \mu\text{m}$, a partir d'una concentració elevada (0,5 UA a 650 nm mesurades amb l'espectrofotòmetre de referència). A partir d'aquesta, s'han anat realitzant dilucions successives, i prenent mesures d'absorbància a amb el muntatge experimental (a 650 ± 20 nm) i amb mesures d'absorbància s'han realitzat a 650 nm en el cas de l'espectrofotòmetre de referència (NOVASPEC).

A la figura 5.1.25 s'observa l'elevada linealitat d'ambdós sistemes, amb valors de $r^2 = 0,999$ tant pel sistema d'un únic minibioreactor com per l'espectrofotòmetre de referència. La diferència entre els pendents dels calibratges és aproximadament d'un 18% respecte a l'espectrofotòmetre de referència, valor similar al obtingut anteriorment amb el mateix sistema d'il·luminació (veure figura 5.1.22).

D'acord amb aquests resultats, els canvis realitzats en la recepció i tractament de la llum transmesa a través del minibioreactor no han implicat variacions en els comportaments observats, de manera que per a una caracterització del sistema desenvolupat més propera a la seva funcionalitat en cultiu, s'han abandonat els liposomes com a model per a la realització de calibratges i s'ha tornat a realitzar calibratges amb cèl·lules animals en suspensió, aprofundint ja no en les diferències respecte un espectrofotòmetre de referència sinó amb la sensibilitat del sistema.

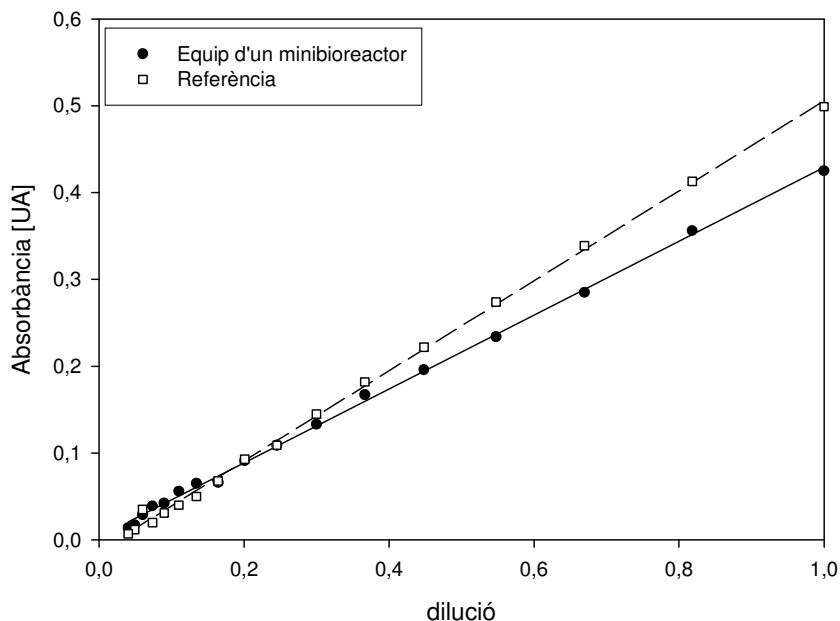


Figura 5.1.25. Absorbància mesurada en el sistema d'un únic minibioreactor a 650 ± 20 nm i en un sistema de referència (NOVASPEC) a 650 nm, en funció de la dilució aplicada a una suspensió de liposomes. El muntatge emprat es presenta al capítol de Materials i Mètodes, figures 8.2.8 i 8.2.9.

En l'experiment realitzat a continuació, s'ha realitzat el calibratge entre la concentració cel·lular d'una suspensió d'hibridomes en medi DMEM (Sigma, D-5796) amb un 5% de FCS (Biological Industries, 04-001-1A), amb concentracions aproximadament entre 2 i 20×10^5 Cèl·l./mL, mesurant l'absorbància amb el sistema d'un únic minibioreactor a $650 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$.

A la figura 5.1.26, es presenta l'absorbància mesurada en funció de la concentració cel·lular, calculada a partir de la concentració inicial ($22,3 \times 10^5$ Cèl·l./mL) i de les dilucions efectuades. Per tal de contrastar l'exactitud de les dades de concentració cel·lular calculades s'han realitzat recomptes al microscopi (veure taula presentada a la figura 5.1.26, a la dreta de la gràfica), observant-se una elevada equivalència entre ambdues.

La linealitat observada és elevada ($r^2 = 0,997$), tot i que hi ha poques dades en el tram de concentracions cel·lulars per sota de 5×10^5 Cèl·l./mL, i en les que s'observa una desviació més elevada respecte la linealitat. Així doncs, serà necessari aprofundir l'estudi en el rang de concentracions baixes.

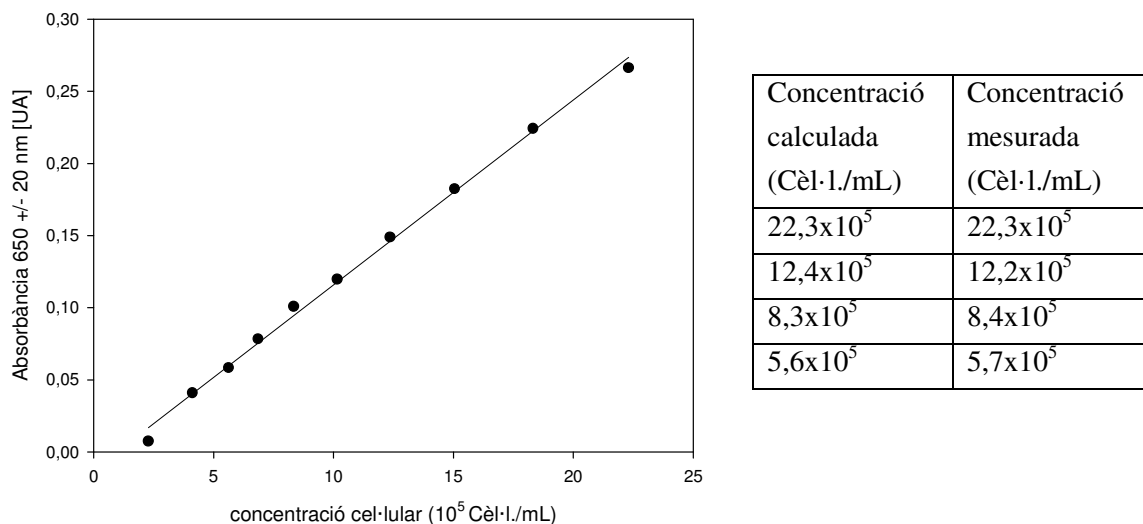
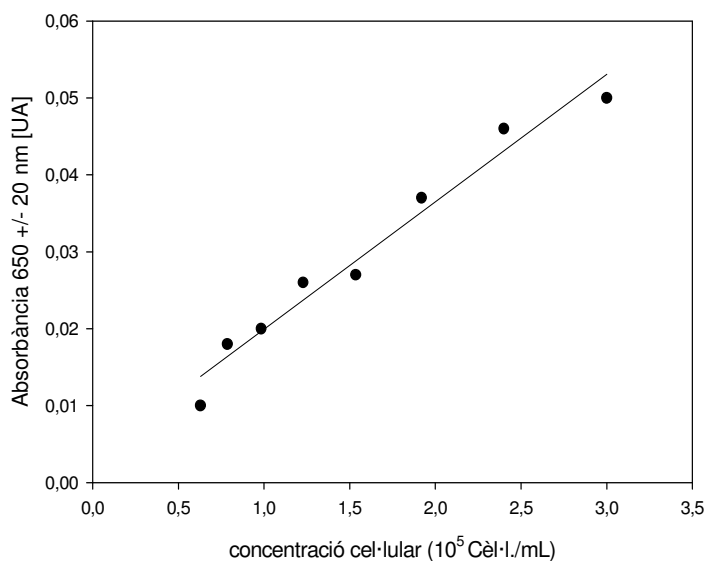


Figura 5.1.26. A l'esquerra, calibratge de l'absorbància a diferents concentracions cel·lulars realitzat amb l'equip d'un únic minibioreactor, a 650 +/- 20 nm. A la dreta, comprovació de l'equivalència entre les concentracions cel·lulars calculades (a partir del recompte al microscopi inicial i les dilucions efectuades), amb les mesures amb recomptes fora de línia al microscopi. El muntatge emprat es presenta al capítol de Materials i Mètodes, figures 8.2.8 i 8.2.9.

Per tal de caracteritzar millor la linealitat del calibratge a concentracions cel·lulars baixes, s'ha repetit el mateix experiment que s'acaba de realitzar (el presentat a la figura 5.1.26) partint de concentracions més baixes (aproximadament 3×10^5 Cèl·l./mL). Els resultats obtinguts (figura 5.1.27) mostren que si bé la dispersió de les dades respecte la linealitat augmenta ($r^2 = 0,966$), segueix existint una relació lineal entre la reducció de la concentració cel·lular i l'absorbància, a concentracions menors a les que s'empren habitualment per a l'inòcul dels cultius (2×10^5 Cèl·l./mL). Així doncs, es considera que s'ha aconseguit la funcionalitat desitjada en el sistema de mesura de la concentració cel·lular.

De forma similar a l'experiment anterior, s'ha realitzat una comprovació de l'equivalència entre les dades de concentració cel·lular calculades i els recomptes realitzats al microscopi (veure taula presentada a la figura 5.1.27, a la dreta de la gràfica), però en aquest cas, l'elevat error intrínsec del recompte al microscopi de concentracions tant reduïdes, no permet discutir l'equivalència entre ambdós valors.



Concentració calculada (Cèl·l./mL)	Concentració mesurada (Cèl·l./mL)
$3,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$
$1,2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
$0,8 \times 10^5$	$0,4 \times 10^5$

Figura 5.1.27. A l'esquerra, calibratge de l'absorbància a diferents concentracions cel·lulars realitzat amb l'equip d'un únic minibioreactor, a 650 +/- 20 nm (veure figura 5.1.26). A la dreta, comprovació de l'equivalència entre les concentracions cel·lulars calculades (a partir del recompte al microscopi inicial i les dilucions efectuades), amb les mesures amb recomptes fora de línia al microscopi. El muntatge emprat es presenta al capítol de Materials i Mètodes, figures 8.2.8 i 8.2.9.

Amb aquest darrer experiment, es dona per completada la realització de millores de la sensibilitat del sistema de mesura d'absorbància en l'equip d'un únic minibioreactor, havent-se assolit la definició i validació d'un muntatge òptic propi amb la capacitat de seguir les concentracions cel·lulars habituals en cultius de cèl·lules animals en suspensió ($2-20 \times 10^5$ Cèl·l./mL).

5.1.2.2. Implementació d'una metodologia de càlcul per a les mesures òptiques en el sistema d'un únic minibioreactor

Proposta d'un model de càlcul

Tal com s'ha observat, la mesura òptica de la concentració cel·lular a 650 nm no es veu influenciada pel pH, però en canvi, la mesura del pH sí que es veu afectada per la concentració cel·lular. Conseqüentment, es proposa un model de càlcul seqüencial que permeti conèixer la concentració cel·lular i el pH. Inicialment es partirà de dades d'absorbància a 650 nm, indicatives de la concentració cel·lular. A continuació, amb les dades de 560 nm s'obindrà al valor del pH, si bé caldrà aplicar una correcció per eliminar la influència de la concentració cel·lular. Seguidament es descriu la metodologia de mesura i càlcul amb més detall:

- I. Mesura de l'absorbància a 650 +/- 20 nm. Aquest valor és directament indicatiu de la concentració cel·lular. Pel cas en què per una determinada línia cel·lular es vulgui disposar d'un calibratge que estableixi aquesta relació, i aquest es vulgui aplicar en diferents experiments, s'ha realitzat l'estudi de l'error que s'acumularà, realitzant tres repeticions de calibratge (incloent posades a punt independents que contemplen el posicionament de la sonda òptica, termostatació a 37°C i realització de blanc òptic) i avaluant les diferències entre aquests.

L'experiment s'ha realitzat amb suspensions concentrades d'hibridomes (aproximadament 25×10^5 Cèl·l./mL), en medi DMEM, sense roig de fenol, al 5% en FCS, diluint progressivament les suspensions amb aquest medi, mesurant l'evolució de l'absorbància (a 650 +/- 20 nm).

A la gràfica (figura 5.1.28), es mostren els punts experimentals mesurats, així com la mitjana entre les tres rectes de calibratge entre la concentració cel·lular (en Cèl·l./mL) i l'absorbància (a 650 +/- 20 nm). La barra d'error es calcula a partir de la diferència entre les absorbàncies calculades a partir d'una concentració cel·lular fixada, emprant cadascuna de les tres rectes de calibratge. A partir d'aquestes diferències s'ha calculat la desviació estàndard, que es mostra a la figura en format de barra d'error.

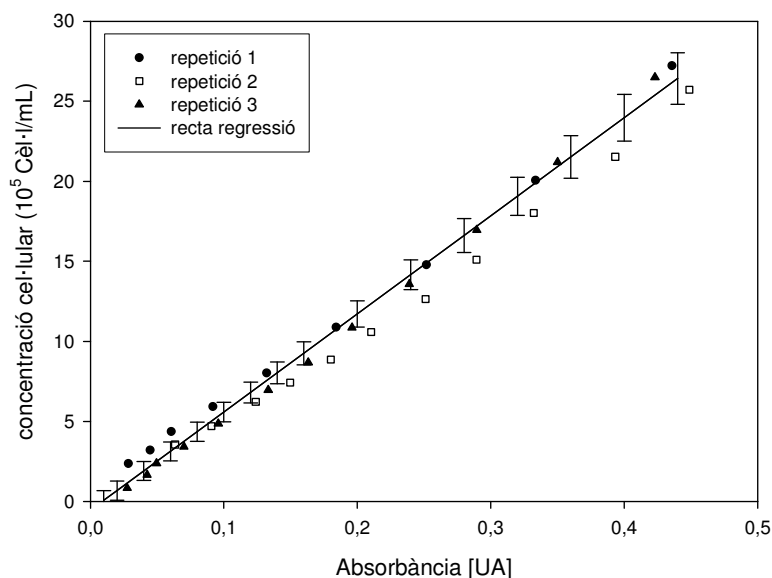


Figura 5.1.28. Calibratges entre la concentració cel·lular i l'absorbància a 650 +/- 20 nm. Es mostren dades de tres repeticions diferents, i provinent d'aquests, una recta de regressió calculada a partir de cadascuna de les rectes de regressió individuals, amb la barra d'error resultant. Equació recta de regressió: $Conc. Cel·lular (10^5 Cèl·l./mL) = -0,5535 + 61,32 \cdot Absorbància [UA]$.

Les dades de la figura 5.1.28 mostren que l'error en la concentració de cèl·lules estimada a partir d'una determinada absorbància es situa per sota de $\pm 1,8 \times 10^5$ Cèl·l./mL (0,04 UA) per sobre de 20×10^5 Cèl·l./mL, per sota de $\pm 1,2 \times 10^5$ Cèl·l./mL (0,03 UA) entre 10 i 20×10^5 Cèl·l./mL, i inferior a $0,7 \times 10^5$ Cèl·l./mL (0,02 UA) per concentracions inferiors a 10×10^5 Cèl·l./mL.

- II. Càlcul de l'absorbància deguda a les cèl·lules a 560 nm a partir de dades a 650 nm (± 20 nm).

Els valors d'absorbància a 560 nm deguts a la suspensió cel·lular seran emprats per tal de restar-los de l'absorbància total a aquesta longitud d'ona i així disposar de l'absorbància deguda només a l'indicador de pH, i poder estimar el valor d'aquesta variable.

Les dades per a establir el càlcul i analitzar l'error provenen de l'experiment anterior, on a banda de mesurar l'absorbància a 650 ± 20 nm, també s'ha mesurat l'absorbància a 560 nm, aplicant també a les mesures un entorn de ± 20 nm per tal de reduir l'error.

Al gràfic (figura 5.1.29) es mostren les dades que provenen de cada repetició (amb diferents minibioreactors i posades a punt independents) juntament amb una recta de calibratge que prové de les mitjanes de cadascuna de les rectes de calibratge individuals.

Pel que fa a l'error per a l'estimació de l'absorbància a 560 nm a partir de l'obtinguda a 650 nm l'error és molt menor que en el cas anterior, ja que els possibles sorolls elèctrics o d'intensitat de la llum emesa l'incorporen les mesures a ambdues longituds d'ona. Per a aquesta estimació, l'error és inferior a 0,006 UA (a 560 ± 20 nm) per a tot el rang d'absorbàncies estudiat.

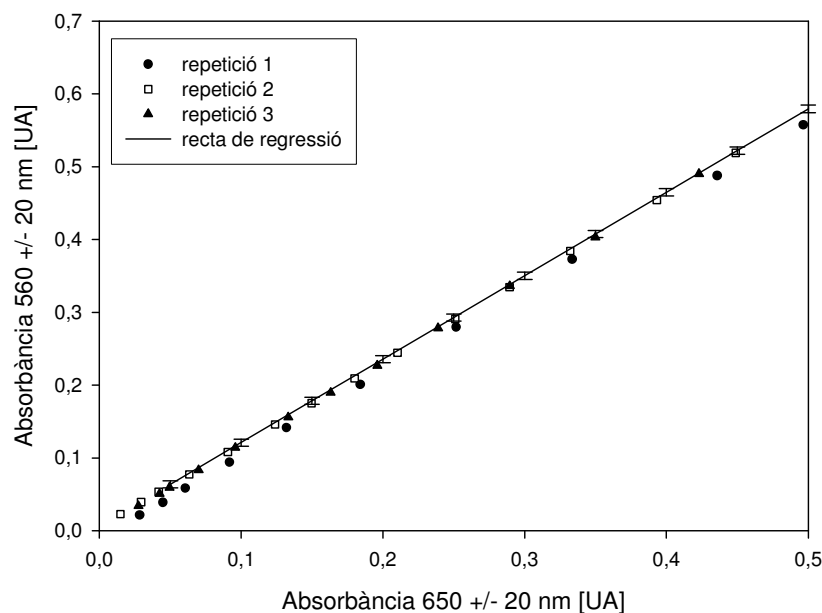


Figura 5.1.29. Calibratges per a obtenir la relació d'absorbàncies entre 560 +/- 20 nm i 650 +/- 20 nm per a hibridomes en un medi de cultiu de cèl·lules animals sense influència del roig de fenol. Es mostren dades de tres repeticions diferents, i provinent d'aquestes, una recta de regressió calculada a partir de cadascuna de les rectes de regressió individuals, amb la barra d'error resultant. Equació recta de regressió: $\text{Absorbància (560 +/- 20 nm) [UA]} = 0,0067 + 1,1452 \cdot \text{Absorbància (650 +/- 20 nm) [UA]}$.

- III. Mesura de l'absorbància a 560 nm, que inclou la deguda a les cèl·lules i la deguda a l'indicador de pH. Com ja s'ha comentat, l'absorbància de la forma bàsica és la que presenta una major sensibilitat, de manera que aquesta és la dada que inicialment s'utilitzarà per al càlcul del pH.

Per a calcular el pH a partir de la mesura d'absorbància a 560 nm (integrant novament un entorn de +/-20 nm per a reduir l'error), primer es calcula l'absorbància a aquesta longitud d'ona deguda a les cèl·lules, a partir de l'absorbància a 650 +/- 20 nm i l'equació (mostrada a la figura 5.1.29) per a calcular l'absorbància equivalent a 560 +/- 20 nm. Aquest valor d'absorbància deguda a la suspensió cel·lular es resta del total d'absorbància a 560 +/-20 nm, i al valor resultant d'aquesta operació s'hi aplica la sigmoïdal que permetrà calcular el valor del pH.

Exemple de càlcul:

- i. Absorbància cèl·lules mesurada a 650 nm = 0,200 UA
- ii. Absorbància cèl·lules calculada a 560 nm = 0,236 UA

$$\text{calibratge aplicat: } Abs_{560} = 1,1452Abs_{650} + 0,0067$$

iii. Restar a l'absorbància total la deguda a les cèl·lules:

$$Abs_{pH} = Abs_{total,560nm} - Abs_{cell\ 560nm} = 0,800 - 0,236 = 0,564 \text{ UA}$$

iv. A partir del valor anterior, aplicar la sigmoïdal per calcular el valor de pH (sigmoïdal de DMEM 10% FCS):

$$pH = x_0 - b \ln\left(\frac{a}{y-y_0} - 1\right)$$

$$pH = 7,5665 - 0,148 \ln\left(\frac{1,8851}{0,564 - 0,0608} - 1\right)$$

$$pH = 7,15$$

Validació de la metodologia de càlcul

Per a comprovar que la metodologia de càlcul proposada segueix de forma acurada el pH, s'ha emprat una suspensió amb una concentració de 8×10^5 Cèl·l./mL (hibridomes) en medi DMEM 10% FCS (aplicant un calibratge de l'indicador realitzat en aquest medi). Per a variar el pH, s'ha afegit una solució d'àcid clorhídric diluït, mesurant-se el pH amb una sonda de referència (Hamilton Polyclave 200), i mitjançant el sistema de mesura òptic desenvolupat, i la metodologia de càlcul presentada.

Tal com s'observa a la figura (5.1.30), en un rang $6,5 < pH < 8,5$ la correlació entre la mesura obtinguda mitjançant el model de càlcul i el seguiment mitjançant la sonda de referència és bona, amb un error menor al 1,6%, així doncs queda comprovada la validesa del model per a seguir el pH a una única concentració de cèl·lules, i en el capítol 6 (aplicació de models biològics) se'n podrà avaluar la validesa per a seguir el pH durant un cultiu, on la concentració cel·lular i el pH variaran progressivament.

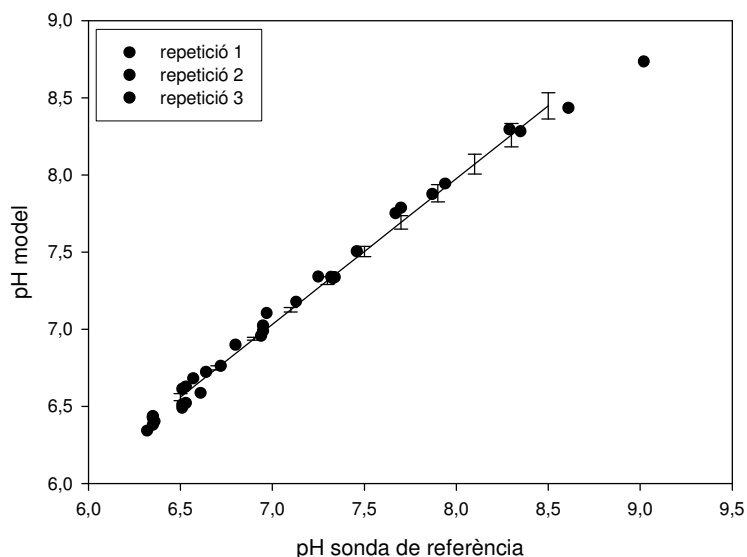


Figura 5.1.30. Comprovació de la validesa del model de càlcul del pH a partir de les dades d'absorbància de la forma bàsica del roig de fenol. Es representen dades de tres repeticions, a partir de les quals es genera una recta amb valors mitjans i desviació estàndard, calculada a partir de les mitjanes de les rectes individuals que defineix cada repetició.

5.1.3. Adaptació del sistema òptic desenvolupat a un equip de sis minibioreactors

Una vegada completat el desenvolupament del sistema amb un únic minibioreactor, i iniciat el desenvolupament d'un equip amb sis minibioreactors, s'ha expandit el disseny del dispositiu òptic prèviament desenvolupat a sis canals de mesura, seguint l'esquema que es mostra a la figura 5.1.31.

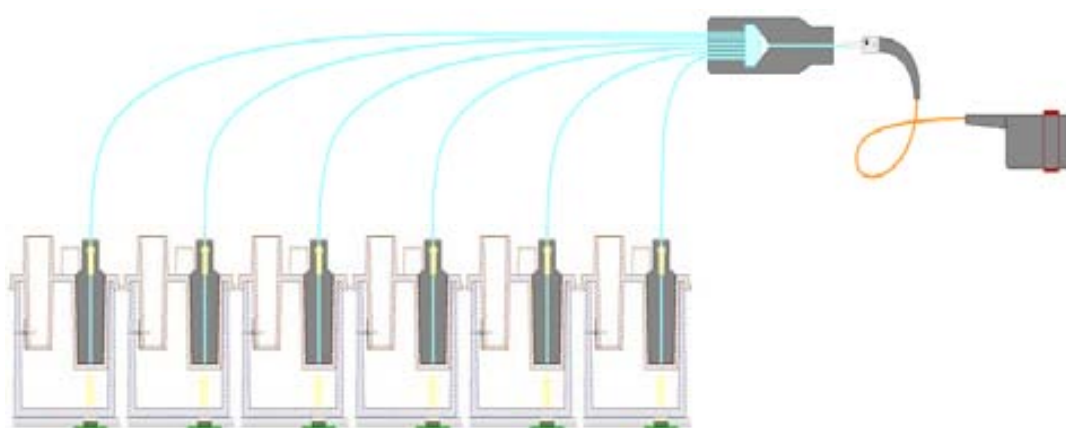


Figura 5.1.31. Representació simplificada del dispositiu òptic per a sis canals de mesura. A la part inferior esquerra es poden observar sis fibres situades de forma individual a cadascun dels minibioreactors. La llum captada per aquestes fibres passa per un concentrador de llum que passa de sis canals a un canal, i finalitza en una única fibra que es connecta a l'espectrofotòmetre situat a l'interior de l'equip (part dreta del dibuix esquemàtic).

Les comprovacions de funcionalitat realitzades amb aquest desenvolupament han contemplat la realització de calibratges respecte patrons d'absorbància, i la comprovació de l'estabilitat de la mesura.

Calibratge respecte patrons d'absorbància. Aquest experiment de calibratge per a comparar l'absorbància mesurada respecte la d'uns patrons comercials (In-Spec Photometric Standards, GFS Chemicals, Columbus, EUA) ha emprat una longitud d'ona de 635 nm (+/- 15 nm), adquirint sis mesures per cadascun dels punts presentats, amb la mitjana de deu espectres cadascun d'ells. Si s'observa les mesures anteriors, es podrà comprovar que s'ha reduït lleugerament respecte els 650 nm que s'empraven fins aquest moment. Aquest canvi és degut a una reducció en la intensitat lumínica observada en el sistema de sis minibioreactors, probablement deguda a la presència de majors interfícies en el canal de transmissió de la llum (principalment, apareix un *fiber taper* per passar de sis canals a un), que per no augmentar la incertesa de la mesura ha implicat el desplaçament ja comentat de la longitud d'ona de mesura de la concentració cel·lular.

Els resultats, presentats a la figura 5.1.32, mostren com la linealitat de tots els canals de mesura és molt bona (en tots els casos r^2 s'aproxima a 1), i els pendents són pròxims a 1, havent-hi una desviació estàndard entre canals del 0,046 (en el punt de màxima absorbància, on la dispersió també és màxima). El fet que els pendents siguin pròxims a 1, que els valors dels patrons d'absorbància coincideixin amb els mesurats ens mostra que la llei de Lambert-Beer es compleix, i que el resultat dels calibratges és correcte.

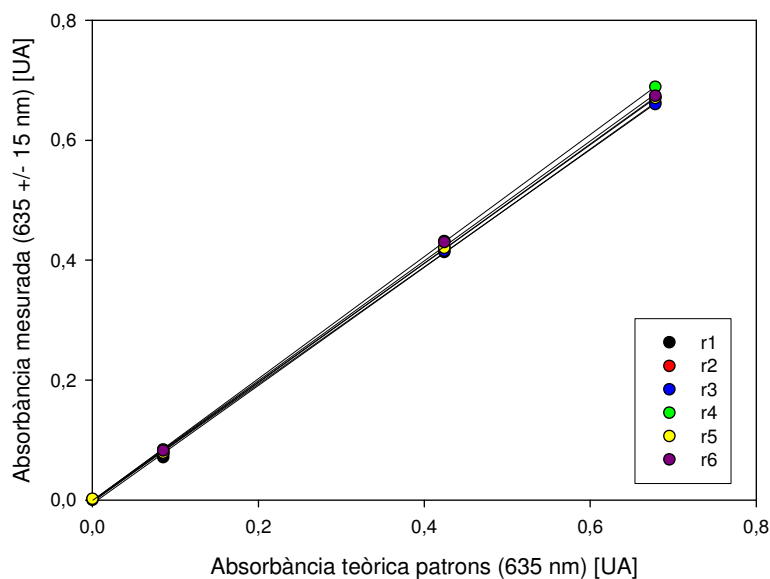


Figura 5.1.32. Calibratge de l'absorbància llegida a través dels sis minibioreactors, emprant patrons d'absorbància comercials (In-Spec Photometric Standards, GFS Chemicals, Columbus, EUA).

Comprovació de l'estabilitat temporal de la mesura. Per tal de completar l'estudi sobre la qualitat de la mesura, a banda de conèixer la desviació en la mesura dels patrons d'absorbància en un moment puntual, també s'ha cregut convenient realitzar mesures d'estabilitat a llarg termini (entenent per llarg la durada d'un subcultiu, que serà la durada aproximada dels experiments a realitzar amb l'equip).

L'experiment realitzat ha contemplat l'atemperament del contingut dels minibioreactors (aigua destil·lada), la realització d'un blanc òptic, i la mesura de l'absorbància a 635 ± 15 nm durant 96 h (cobrint més enllà de 72 h, considerat temps habitual de cultiu).

A la gràfica on es mostra el seguiment de l'absorbància (figura 5.1.33) es pot observar que l'estabilitat de les mesures és elevada, havent-hi una desviació entre canals de $+0,01/-0,03$ unitats d'absorbància (UA). Tenint en compte que els cultius que s'hauran de realitzar amb el sistema en desenvolupament arribaran aproximadament a $0,4$ unitats d'absorbància, la deriva observada és acceptable, només suposa una variació de $1,2 \times 10^5$ Cèl·l./mL quan els cultius s'espera que arribin a 20×10^5 Cèl·l./mL.

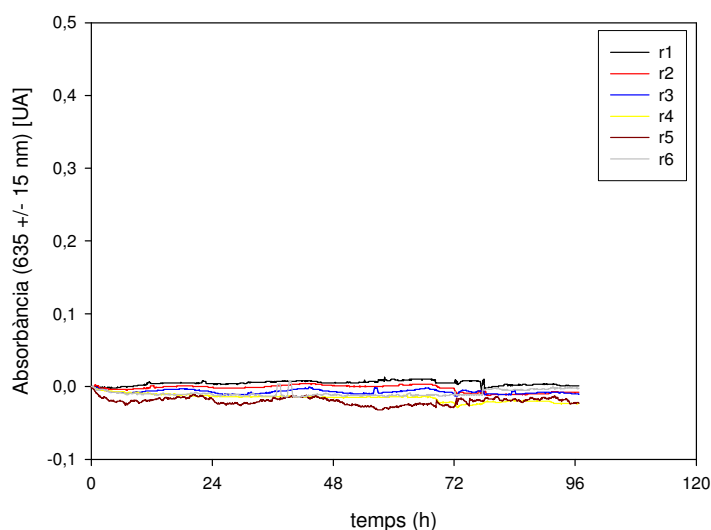


Figura 5.1.33. Seguiment de l'absorbància durant 4 dies, temps estimat de durada experimental. L'escala d'absorbància mostrada és representativa de la que s'observarà en un cultiu de cèl·lules animals en suspensió (s'estima que s'arribarà a absorbàncies al voltant de $0,4$ UA)

Tal com s'ha fet amb l'absorbància a 635 ± 15 nm, també s'ha seguit l'evolució del pH durant 96 h, havent-se observat que no hi havia influència de la desviació de l'absorbància total sobre el pH, ja que el model de càlcul emprat per aquest filtra interferències presents a tot l'espectre.

A la vista d'aquests resultats, es pot considerar que es disposa d'un sistema de seguiment òptic de la concentració cel·lular i del pH, amb precisió de mesura i estabilitat front el temps adequats per a la mesura de les concentracions habitualment presents en cultius de cèl·lules animals ($2\text{-}20 \times 10^5$ Cèl·l./mL), en la durada habitual d'aquests (aproximadament 72 h).

5.2. Desenvolupament d'un sistema de mesura d'oxigen dissolt

Un sistema per a la mesura de l'oxigen dissolt adaptat al sistema de minibioreactors en desenvolupament presenta la necessitat d'incorporar sondes d'una mida reduïda i perfectament adaptada al disseny de la tapa dels minibioreactors. El fet de disposar de limitacions espacials importants ja ha estat un dels factors considerats a l'hora d'escollir el sistema de mesura de pH i concentració cel·lular: un sistema òptic permet mesurar aquestes dues variables emprant una única sonda. En el cas de la sonda d'oxigen novament cal tenir en compte els requeriments espacials i de disseny, així com la necessitat que la sonda tingui un caràcter no invasiu, que permeti la utilització dels equips de cultiu sense requeriments addicionals d'esterilització per part de l'usuari. Al no haver-hi productes existents que compleixin tots aquests requeriments ha estat necessari el desenvolupament de sondes específiques per a la mesura d'oxigen dissolt.

5.2.1. Elecció de la tecnologia de mesura

En les darreres dècades, els nivells d'oxigen dissolt s'han mesurat en sistemes de cultiu com bioreactors, i també en altres múltiples aplicacions, principalment en l'àrea del medi ambient, preferentment mitjançant sondes polarogràfiques, també anomenades sondes de Clark.

El funcionament d'aquestes es fonamenta en què l'oxigen present a la solució on es vol mesurar travessa una membrana que incorpora la sonda i, degut a la diferència de potencial entre càtode i ànode a la que treballa la sonda, es redueix, de manera que es pot mesurar una intensitat elèctrica que és proporcional a la concentració d'oxigen dissolt en la solució.

Aquest mètode, però, presenta una sèrie de limitacions com són (Lee i Tsao, 1979; Bambot i Col., 1994; Gao i Col., 2004):

1. Inestabilitat a llarg termini, degut al consum de l'electrolit.

2. Es tracta d'una mesura invasiva, i per tant en sistemes estèrils s'han hagut de desenvolupar sondes esterilitzables.
3. Tenen un temps de resposta associat, que és un paràmetre crític en el cas de les mesures en cultius en bioreactor, en el cas de cultius d'organismes aerobis amb consums específics d'oxigen elevats.
4. Interferències elèctriques quan la intensitat de senyal mesurada és baixa.

En el cas de l'equip que es pretén desenvolupar el primer inconvenient no és crític, ja que la durada dels cultius no superarà els pocs dies d'operació, de manera que la inestabilitat a curt termini s'espera que sigui reduïda. Relacionat amb això, tot i que el soroll en les mesures elèctriques pot ser problemàtic, es pot superar amb un disseny adequat dels elèctrodes i de l'electrònica emprada. També es podrà resoldre mitjançant un disseny personalitzat el problema que la sonda sigui invasiva. Si la membrana s'incorpora al plàstic de cultiu, que serà estèril en el seu interior, la sonda no caldrà que entri en contacte amb l'interior del reactor. Més complicat serà aconseguir obtenir un temps de resposta prou ràpid per a ser útil per al seguiment de cultius, ja que mentre la construcció de la majoria dels components d'una sonda de Clark està perfectament descrita a la bibliografia, la naturalesa de les membranes i el seu acoblament a la sonda són informacions que els fabricants no fan públiques.

Una altra alternativa per a la realització de mesures d'oxigen dissolt són les mesures òptiques de fluorescència, que en els darrers anys estan expandint la seva àrea d'aplicació i la tecnologia desenvolupada per empreses com Fluorometrix (Baltimore, EUA), Ocean Optics (Dunedin, EUA), i Presens (Regensburg, Alemanya), està començant a ser aplicada a l'àrea biotecnològica (John i Col., 2003), bàsicament en sistemes de cultiu d'un sol ús (Singh, 1999; Rao i Col., 2009).

Les mesures òptiques d'oxigen dissolt es fonamenten en el fet que les molècules d'oxigen poden ser complexades per determinats compostos, que irradiats a determinades longituds d'ona emeten fluorescència a diferents intensitats, depenent de la quantitat d'oxigen que estiguin complexant.

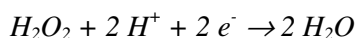
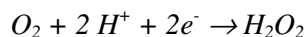
Els diferents sistemes de mesura òptica d'oxigen dissolt que han estat desenvolupats han seguit l'estratègia que s'empra habitualment en biosensors, que és l'immobilització de l'agent responsable de la detecció en una membrana. Els materials que presenten propietats de fluorescència interessants són diferents metalls de transició, els quals s'han combinat amb diferents molècules orgàniques que, sobretot, els donaran la capacitat de ser immobilitzats en membranes.

Per al sistema de minibioreactors a desenvolupar s'ha escollit desenvolupar un sistema polarogràfic d'oxigen dissolt, ja que el temps de desenvolupament necessari per aquest tipus de sonda és molt més ràpid que el necessari per a una sonda òptica de fluorescència. De totes maneres, l'alternativa de desenvolupar un sistema de mesura basat en aquesta tecnologia no s'ha abandonat sinó que s'ha abordat en un altre treball de tesi doctoral dut a terme en el marc del mateix projecte i en el mateix grup de recerca (Sarró, 2009).

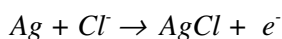
5.2.2. Desenvolupament d'un sistema de mesura polarogràfic

Tal com ja s'ha comentat, les sondes tipus Clark basen la mesura de l'oxigen dissolt en la mesura del corrent elèctric que circula entre dos elèctrodes quan es proporciona un determinat potencial que permet la reducció de l'oxigen a peròxid i l'oxidació de la plata a clorur de plata. Més concretament, les reaccions redox que es donaran són les següents:

- Reducció oxigen:



- Oxidació plata:



La figura 5.2.1 mostra un esquema amb els elements bàsics per a construir un sensor polarogràfic d'oxigen dissolt. Aquest consta d'un càtode (platí) a través del qual flueixen els electrons cap a una solució d'electrolit, on l'oxigen es reduirà. A la superfície de l'ànode (plata), la plata s'oxidarà a AgCl, permetent que es tanqui el circuit i els electrons circulin cap a la font externa de voltatge i de mesura d'intensitat. Per a un correcte funcionament de la sonda, l'ànode no pot utilitzar-se simplement amb la plata tal com aquesta es subministrada, sinó que serà necessari un tractament electrolític per tal de tenir un determinat gruix de AgCl sobre del metall (veure materials i mètodes).

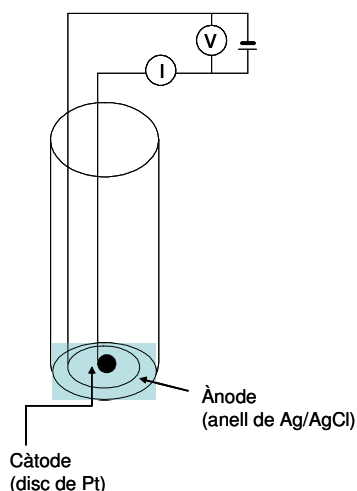


Figura 5.2.1. Esquema d'una sonda polarogràfica d'oxigen, contenint un càtode, ànode, i un contacte elèctric entre ambdós que els proporcionen la diferència de potencial requerida per tal que la reducció de l'analit (oxigen) sigui espontània i es pugui mesurar la intensitat elèctrica que circula entre ambdós.

Seguint aquest esquema s'han construït uns primers prototips, amb la metodologia i disseny presentats al capítol de Materials i Mètodes (apartat 8.3).

5.2.2.1. Determinació del potencial de treball

Una vegada han estat construïts els primers prototips de la sonda, ha estat necessari l'ajust del potencial de treball, que haurà d'estar al voltant del marcat pels potencials de reacció per a que es doni la reducció completa de l'oxigen. Aquesta determinació es realitza mitjançant voltamperometries cícliques, durant les quals s'aplica a una cel·la electroquímica un senyal d'excitació que és un potencial variable. Aquest senyal d'excitació provoca una resposta d'intensitat de corrent característica en la que es basa el mètode.

L'experiment realitzat ha emprat un analitzador electroquímic Autolab PGSTAT30 (Eco Chemie, Utrecht, Holanda) connectat a un ordinador amb un programari GPES, al laboratori del Grup de Sensors i Biosensors del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, realitzant mesures d'intensitat entre potencials de 0,0 V i -1,2 V.

Els resultats, que es presenten a la figura 5.2.2, mostren que l'oxigen dissolt present en una dissolució aquosa es redueix presentant dues ones atribuïbles a aquest element. La primera ona resulta de la reducció de l'oxigen a peròxid d'hidrogen $O_2 + 2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2O_2$; $E^\circ = -0,35$ V), i la segona correspon a la posterior reducció del peròxid d'hidrogen format en el primer pas ($H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \leftrightarrow 2H_2O$; $E^\circ = -0,60$ V.).

Finalment, el senyal que s'observa a -1 V. correspon a la reducció del peròxid d'hidrogen a aigua.

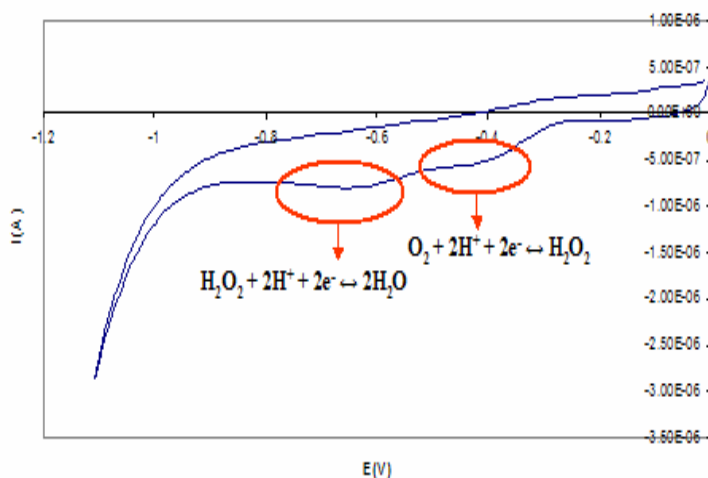


Figura 5.2.2. Voltamperograma realitzat per a un dels prototips de sonda construïts seguint l'esquema de la figura 5.2.1 (per a major detall de la construcció, consultar el capítol de Materials i Mètodes).

El potencial de treball escollit per a treballar és de -0,65 V, que al ser una mica major que el potencial de reacció necessari per tal que es doni la reducció completa de l'oxigen, permetrà assegurar unes condicions suficientment favorables per tal que les dues semireaccions de reducció es duguin a terme completament.

5.2.2.2. Caracterització de la funcionalitat: intensitat

Una vegada determinat el potencial de treball, s'ha construït una placa electrònica que proporcioni aquesta diferència de potencial entre el càtode i l'ànode (construcció realitzada pel Grup d'Instrumentació Electrònica i Biomèdica, UPC), i condueixi el senyal d'intensitat elèctrica mesurat cap a una placa d'adquisició de dades instal·lada en un PC. Una vegada en el PC, un programa desenvolupat en entorn LabView (National Instruments, Austin, EUA), permet una fàcil visualització i registre de les dades.

Amb una sèrie de sondes prototip (5 unitats), i el conjunt de plaques i el programari que s'acaba de comentar, s'ha realitzat una sèrie d'experiments amb la finalitat de determinar si les intensitats elèctriques mesurades eren detectables. D'entrada, s'ha realitzat mesures preliminars submergint les sondes directament en electrolit (KCl i K₂HPO₄ 0,5 M) sense la presència d'una membrana que les separi de la solució i pugui atenuar el senyal. Les mesures s'han realitzat en vasos de precipitats que contenen electrolit, i s'han agitat mitjançant varetes imantades per tal d'assegurar l'homogeneïtat.

Els resultats, presentats a la figura 5.2.3, mostren l'existència de zones amb molta oscil·lació de la intensitat elèctrica mesurada (entre 1000 i 2000 nA, en valor absolut), que corresponen als instants on l'agitació magnètica ha estat funcionant. En canvi, quan l'agitació ha estat aturada, el senyal s'ha estabilitzat al voltant d'uns 400 nA (en valor absolut).

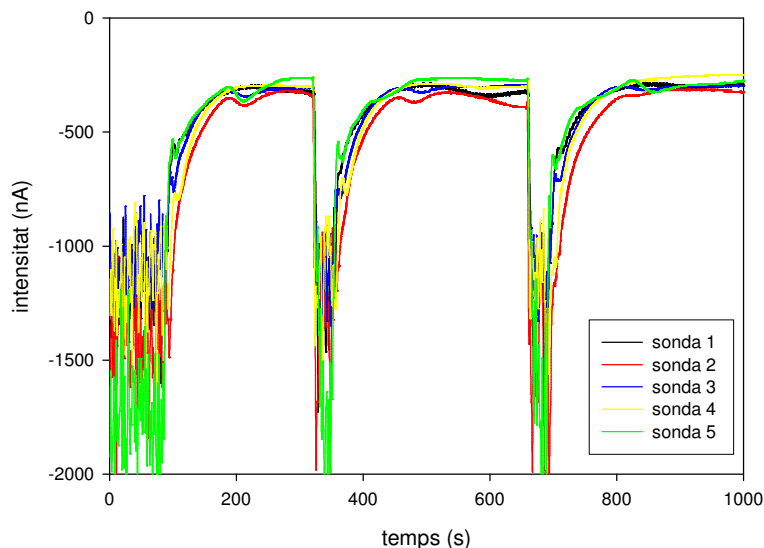
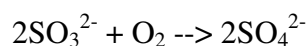


Figura 5.2.3. Influència de l'agitació magnètica sobre la intensitat mesurada en cinc prototips de sonda polarogràfica.

Una vegada detectada la influència de l'agitació, aquesta s'ha tingut en compte a l'hora de determinar el marge dinàmic de detecció: per a determinar la variació de senyal entre una concentració d'oxigen dissolt del 100% (saturació en aire) i una del 0%, per a adquirir les dades, s'ha parat l'agitació i s'ha esperat que el senyal s'hagués estabilitzat.

Per als experiments de variació de la concentració d'oxigen dissolt entre un 100% (equivalent a una intensitat elèctrica màxima) i un 0% (equivalent a una intensitat elèctrica nul·la), s'ha emprat una sèrie de 10 sensors. Inicialment s'ha saturat d'aire l'electrolit (KCl i K_2HPO_4 0,5 M) on estaven submergides les sondes mitjançant bombolleig d'aire i agitació magnètica. Per a obtenir una mesura no influenciada per l'agitació, aquesta s'ha aturat, i s'ha esperat l'estabilització del senyal. Per a reduir el senyal fins al 0% d'oxigen, s'han realitzat addicions de sulfit sòdic, de 2 mL d'una solució 0,1 M Na_2SO_3 sobre 80 mL totals, que consumeix tot l'oxigen present en el medi, donant-se la següent reacció:



Novament, per tal de no tenir influència de l'agitació en la mesura, aquesta s'ha aturat, i s'ha esperat l'estabilització del senyal. Per tal de determinar l'error de la mesura, s'ha repetit aquest procediment complet de saturació d'aire, i eliminació de l'oxigen dissolt tres vegades, i s'han calculat les mitjanes dels resultats corresponents.

A la taula 5.2.1 es mostren les variacions de la intensitat de corrent elèctric mesurades entre el 0 i 100% de saturació en aire, per a cadascuna de les 10 sondes d'una sèrie prototip.

Nº sonda	Variació de senyal mesurada entre el 0 i 100% de saturació en aire (nA)	desviació estàndard entre repeticions (%)
1	258	7,4
2	300	2,7
3	288	8,7
4	328	1,5
5	313	8,8
6	368	0,8
7	412	1,0
8	288	3,5
9	289	3,0
10	299	1,3

Taula 5.2.1. Variacions del senyal d'intensitat elèctrica mesurades entre el 100 i 0% de saturació en aire, per a cadascuna de les 10 sondes d'una sèrie prototip. Tant les dades com la desviació estàndard provenen de la realització de tres repeticions .

Per a les 10 sondes manufacturades les intensitats de corrent elèctric mesurades estan entre 258 i 412 nA, que en magnitud són valors majors que els obtinguts amb sondes comercials de les més exteses en el camp dels bioreactors, com són les Mettler-Toledo, que donen senyals al voltant de 40-110 nA (InPro 6050, Mettler-Toledo, Greifensee, Suïssa). Les intensitat són notables doncs, comparades amb les de sondes comercials, de manera que s'evita un dels possibles inconvenients que presenten les sondes polarogràfiques: la presència de interferències elèctriques quan la intensitat del senyal mesurada és baixa.

5.2.2.3. Caracterització de la funcionalitat: temps de resposta

Tot i que la variació d'intensitat mesurada és un paràmetre bàsic per al funcionament de la sonda, cal tenir-ne present un altre: el temps de resposta. Qualsevol sonda que es vulgui emprar en un elevat nombre i ventall d'aplicacions ha de permetre detectar

L'oxigen dissolt present en un determinat medi pràcticament en temps real o, si més no, es requerirà que el temps de resposta de la sonda sigui significativament més reduït que les dinàmiques de variació d'oxigen en els sistemes experimentals emprats. Cal tenir en compte que hi haurà determinats casos on a partir de la mesura de la sonda es controlarà l'oxigen dissolt present en el medi, de manera que per a determinar el funcionament dels actuadors i aconseguir que en el medi hi hagi de forma el més estable possible la concentració de consigna, caldrà conèixer amb el mínim temps de retard la concentració real d'oxigen en el medi.

En el present treball les sondes seran emprades més endavant per a fer mesures de consum d'oxigen, i com a criteri de disseny s'ha fixat que per a poder-les considerar funcionals caldrà que el seu temps de resposta sigui proper al de les sondes comercials que s'estan utilitzant habitualment per a aquest tipus de mesura (τ , temps de resposta al 63,2% de variació del senyal, de 20-50 s).

Per a fer una primera avaluació del temps de resposta de les sondes construïdes, s'ha fet un primer experiment on s'ha mesurat aquesta variable, encara sense la presència de membranes, de manera que si en aquest punt les sondes construïdes tenen un temps de resposta més ràpid que el d'una sonda de referència (Ingold 12 mm, Mettler-Toledo, Greifensee, Suïssa), encara hi haurà marge per a desenvolupar les membranes, que per definició alentiran el temps de resposta. En l'experiment realitzat, s'ha partit d'una solució d'electrolit (KCl i K_2HPO_4 0,5 M) saturada d'aire, on s'ha afegit un pols de sulfit, tant amb les sondes prototips com a la sonda de referència. Donades les limitacions del muntatge experimental, l'operació s'ha realitzat amb dues sèries, amb 5 sondes prototip més una de referència per a cada sèrie.

A la figura 5.2.4 es presenta una representació simplificada per a una major comprensió de l'experiment realitzat. En el primer pas, els vasos de precipitats on estan situades les cinc sondes prototip i la sonda de referència es saturen mitjançant el bombolleig d'un corrent d'aire. En el segon pas, l'aeració s'atura i s'afegeix sulfit sòdic a cadascun dels vasos de precipitats, i s'inicia el registre de la intensitat elèctrica, que és proporcional a l'oxigen dissolt. Per evitar errors de les dinàmiques de consum de l'oxigen per part del sulfit, habitualment s'utilitza un mètode alternatiu a aquest, realitzant el canvi de les sondes d'una solució al 100% oxigen dissolt a una altra a un 0%, però en aquest cas no es pot utilitzar, ja que al no tenir membrana les sondes prototip, si es treuen del medi aquós, es perd el contacte elèctric entre càtode i ànode.

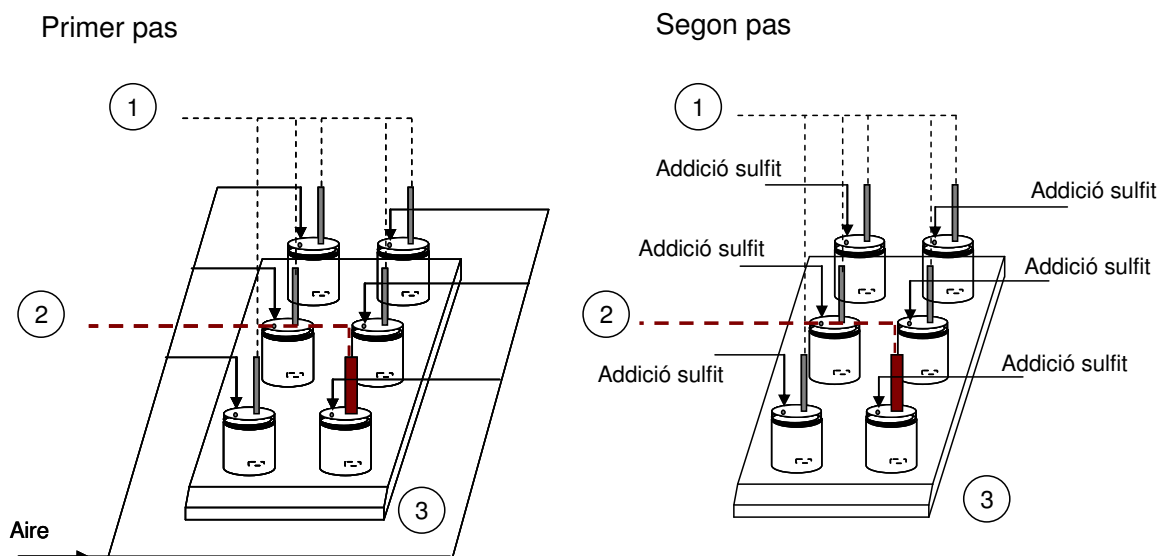


Figura 5.2.4. Representació simplificada del muntatge i procediment experimental. Referent al muntatge 1) sistema de subministrament de potencial i mesura de la intensitat de les sondes prototip, 2) connexions de la sonda de referència, i 3) placa d'agitació (agitador OX192, SBS Instruments, Badalona, Espanya) per mantenir homogeni el contingut dels vasos de precipitats. A l'esquerra, en el primer pas el contingut dels vasos de precipitats es manté agit, i es satura amb aire mitjançant bombolleig. En el segon pas, l'aeració s'atura i s'afegeix sulfít sòdic a cadascun dels vasos de precipitats.

A la figura 5.2.5 es presenten les corbes de variació de l'oxigen dissolt mesurades amb les sondes prototip, així com amb la sonda de referència. Si bé en el cas de la sonda de referència, una vegada calibrada, les mesures obtingudes són directament les d'oxigen dissolt, per a les sondes prototip les mesures obtingudes són les de intensitat elèctrica. Per presentar aquestes dades com a percentatge d'oxigen dissolt ha estat necessari realitzar un calibratge a partir de les dades d'intensitat al 0% i 100% d'oxigen dissolt.

A la figura 5.2.5 es presenten separadament les dues sèries realitzades, per no incorporar diferències degudes a l'execució experimental.

El primer que s'observa a les gràfiques és que el soroll de la mesura amb les sondes prototip és molt més gran que amb la sonda de referència. Cal tenir en compte que l'experiment s'ha realitzat sense membranes, amb l'elèctrode directament submergit en electrolit, i al mantenir l'agitació en marxa per tal d'assegurar la homogeneïtat del contingut dels vasos de precipitats, d'una banda els valors d'intensitat mesurats són majors als establerts a la taula 5.2.1 degut a la interferència de l'agitació, i d'altra banda, el soroll i pertorbacions sobre les mesures són també més elevats.

Tot i que el soroll observat fa difícil l'obtenció de dades quantitatives, de la figura 5.2.5 si que es pot obtenir la informació qualitativa de que la resposta de les sondes desenvolupades és més ràpida que la de la sonda de referència, de manera que, pel moment, el desenvolupament realitzat es considera vàlid.

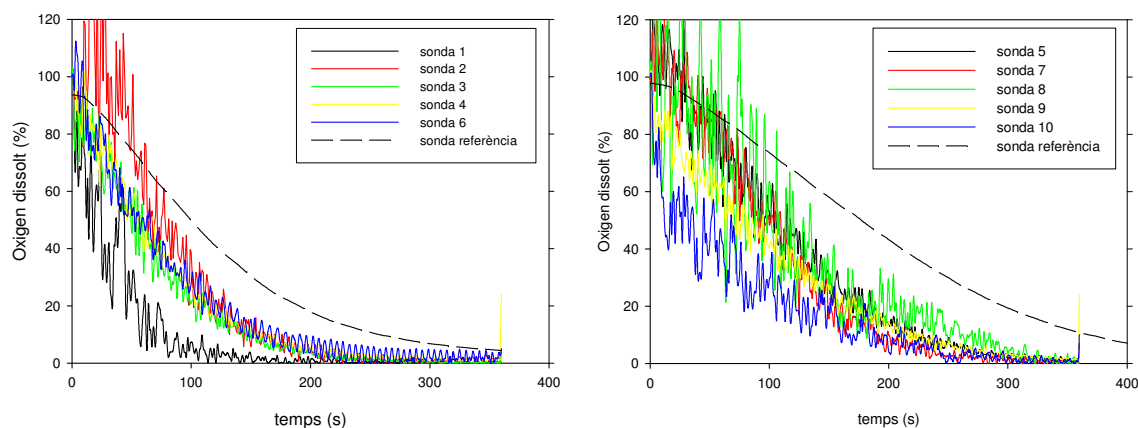


Figura 5.2.5. Dinàmiques de resposta de les sondes desenvolupades (prototips 1-10) en comparació amb una sonda de referència.

De totes maneres, es creu necessari fer esment de l'observació de la gràfica, ja que en tots els casos, tant amb les sondes prototip com amb la sonda de referència, les dinàmiques de resposta són força lentes, tenint en compte que la sonda de referència mostra un temps de resposta amb un valor mitjà de $\tau \approx 180$ s, quan el seu valor nominal es situa entre 20-30 s (sondes Ingold 12 mm). Així doncs, és probable que juntament amb el temps de resposta de les sondes també s'estigui mesurant la cinètica del procés de reacció del sulfit sòdic. Per comprovar aquesta hipòtesi, es van repetir dos experiments més de dinàmica de resposta de la sonda de referència, un novament amb el mètode d'addició de sulfit, i també fent un canvi de la sonda, d'un vas de precipitats saturat amb oxigen amb un altre on aquest hagués estat eliminat mitjançant la circulació d'un corrent de nitrogen. Els resultats obtinguts mostren la validesa de la hipòtesi efectuada, ja que si bé τ (temps de resposta al 63,2% de variació del senyal) pel mètode del sulfit ha estat de 125 s, seguint el mètode de canvi de vasos de precipitats (d'un vas saturat d'aire a un altre on aquest ha estat eliminat mitjançant la circulació de N_2), el seu valor s'ha reduït fins els 24 s.

Resolt el dubte de la lentitud observada, tot i que els resultats mostrats a la figura 5.2.5 no siguin apropiats per extreure'n dades quantitatives directament, cal remarcar que les dades són suficients per demostrar de forma qualitativa que la resposta de les sondes desenvolupades és més ràpida que la de la sonda de referència.

De totes maneres, cal tenir en compte que en el disseny previst de l'equip de minibioreactors en el qual hauran d'integrar-se les sondes, aquestes hauran d'estar separades de l'interior dels minibioreactors per membranes que garanteixin un funcionament no invasiu. Aquestes membranes suposaran un retard considerable en la detecció de l'oxigen en el medi, de manera que ha estat necessari realitzar-ne un disseny i desenvolupament molt acurat.

Resumint, en aquest punt del disseny es considera suficient la informació obtinguda sobre el temps de resposta, i es passarà al desenvolupament de la membrana de la sonda, tornant-se a mesurar els aspectes de la dinàmica de la resposta de la sonda quan aquesta ja estigui completament desenvolupada amb tots els seus elements, fet que també hauria de contribuir a la disminució del soroll de senyal obtinguda.

Resposta de les sondes amb diverses membranes

En la seva utilització en minibioreactors, les sondes d'oxigen dissolt cal que siguin no invasives, de manera que al no haver-hi contacte amb els cultius no hi haurà perill de contaminació pels ports de les sondes. Així doncs, aquestes sondes hauran d'estar separades del cultiu per membranes que hauran de permetre la transferència de gasos, i que en la part en contacte amb la sonda tindran un determinat volum d'electrolit per tal que hi hagi una bona circulació del corrent en la reacció redox.

Per a realitzar l'experimentació necessària amb membranes, s'ha construït un prototip que permeti integrar-les a la sonda d'oxigen, com el que es mostra a la figura 5.2.6. A l'interior del cilindre es col·loca electrolit i les sondes s'hi posicionen de tal manera que no quedin bombolles d'aire en el seu interior. Per tal d'evitar possibles entrades d'oxigen per la part superior del cilindre, s'ha construït amb un diàmetre intern molt proper al de les sondes, i addicionalment en cada experiment s'ha recobert la junta tòrica amb Parafilm.

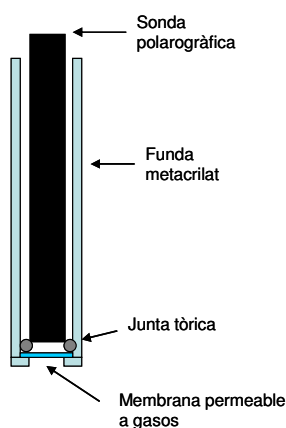


Figura 5.2.6. Muntatge per a realitzar l'experimentació necessària amb diferents tipus de membranes. Aquest consta d'una funda de metacrilat cilíndrica, on es situa la membrana permeable als gasos en un extrem, i per l'altre entra la sonda prototip. Entre ambdós elements (sonda i membrana) s'hi situa una junta tòrica, i l'espai entre la sonda i la membrana s'omple d'electrolit (KCl i K_2HPO_4 0,5M).

Com ja s'havia comentat, aquest disseny suposa l'aparició d'interfícies que afegixen una resistència a la transferència de matèria. A la figura 5.2.7 es presenta un esquema simplificat del procés de transferència d'oxigen en el sistema estudiat. A la figura s'observa que d'una banda cal considerar la transferència en el si del medi de cultiu a la interfície que suposa la membrana. D'altra banda es donarà una transferència de l'oxigen a través de la membrana, que suposarà un retard en funció de la resistència a la transferència de gasos del material, i del gruix de la membrana. Finalment, també cal considerar la transferència de la interfície de la membrana-electrolit al si de l'electrolit.

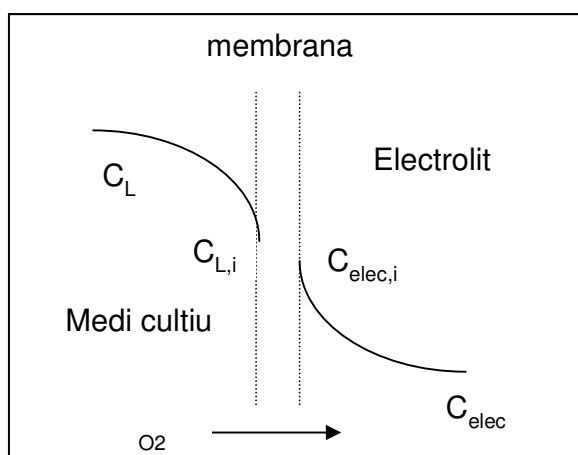


Figura 5.2.7 Esquema del procés de transferència de matèria (per a un analit que en aquest cas serà l'oxigen dissolt) des del medi de cultiu fins a l'electrolit on mesura la sonda d'oxigen en desenvolupament. C_L (concentració d'analit al si del medi de cultiu), $C_{L,i}$ (concentració d'analit a la interfície medi-membrana), $C_{elec,i}$ (concentració d'analit a la interfase membrana-electrolit), i C_{elec} (concentració d'analit al si de l'electrolit).

En un primer estadi de l'estudi, per a determinar quina era la membrana que es podia emprar que no alentís excessivament el temps de resposta de la sonda d'oxigen en desenvolupament, s'han utilitzat diferents membranes comercials permeables a gasos (silicona, tefló, polipropilè i policarbonat), utilitzant com a criteri principal per a avaluar el seu comportament el temps de resposta.

En l'estudi realitzat amb aquestes membranes, s'ha realitzat experiments individuals, situant en cadascun dels muntatges presentats a la figura 5.2.6 una de les membranes a la posició corresponent. Aquests muntatges s'han situat en vasos de precipitats amb aigua destil·lada saturada d'aire per bombolleig i una vegada estabilitzada la mesura, s'ha substituït el vas de precipitats per un altre on s'ha eliminat la presència d'oxigen dissolt mitjançant la circulació d'un corrent de nitrogen.

A la taula 5.2.2 es presenten els valors del temps de resposta obtinguts, expressats com a τ , paràmetre que es defineix com el temps que la sonda tarda en arribar al 63,2% del valor final de la mesura, i prové de l'equació amb la qual es sol expressar la dinàmica de les sondes d'oxigen, que és de primer ordre i té la següent forma:

$$\frac{dC_{mes}}{dt} = \frac{(C_L - C_{mes})}{\tau} \quad \text{Eq. 5.2.1}$$

On,

C_{mes} és la concentració d'analit (oxigen, en aquest cas) mesurada per la sonda

C_L és la concentració d'analit (oxigen, en aquest cas) al si del medi de cultiu

Tal i com es veu a la taula 5.2.2, tot i que la membrana de silicona (Membrane type 1 silicon film, Capsum Technologies GmbH, Trittau, Alemanya) (a partir d'aquest punt referida com a silicona Capsum) és la que ha donat una millor resposta, el temps de resposta d'aquesta és considerablement més gran que l'observat per a la sonda de referència (Ingold 3-532-58, Mettler-Toledo), de manera que caldrà realitzar una optimització d'aquesta membrana, ja sigui en la seva utilització o en la seva naturalesa.

Tipus de membrana		τ (s)
Polipropilè	YSI 5775, YSI, Yellow Springs, EUA	9112
Teflò	FGLP02500, Millipore Iberica, Madrid, Espanya	3110
Silicona	Membrane type 1 silicon film, Capsum Technologies GmbH, Trittau, Alemanya	1750
Policarbonat	ATTP 025 00, Millipore Iberica, Madrid, Espanya	$12,1 \cdot 10^7$
Sonda de referència		τ (s)
Ingold 3-532-58, Mettler-Toledo		33,2

Taula 5.2.2. Temps de resposta de les sondes d'oxigen prototip amb diferents membranes comercials. A la darrera fila es mostra el temps obtingut amb la sonda emprada com a referència.

Per a millorar la funcionalitat de la membrana de silicona Capsum, un primer paràmetre a analitzar és la distància entre la membrana i la sonda. Mentre inicialment hi havia una junta tòrica com element que fixava el volum de líquid i la separació entre ambdós, a continuació s'han realitzat modificacions del muntatge presentat a la figura 5.2.6 eliminant la presència de la junta tòrica, de manera que el volum mort s'ha reduït, i és d'esperar que el temps de resposta sigui menor.

En l'experiment, els muntatges realitzats amb les sondes d'oxigen prototip s'han situat en vasos de precipitats amb aigua destil·lada saturada d'oxigen mitjançant el bombolleig d'aire i una vegada estabilitzada la mesura, s'han substituït els vasos de precipitats per altres on s'havia eliminat la presència d'oxigen dissolt mitjançant la circulació de nitrogen.

A la figura 5.2.8 es presenten les corbes de variació d'oxigen dissolt amb els muntatges sense junta tòrica, així com amb la sonda de referència. En el cas dels muntatges prototip novament les mesures realitzades han estat en forma d'intensitat elèctrica, i per presentar-les com a oxigen dissolt s'han calibrat amb les mesures al 0 i 100%. Tal com es pot observar, en el cas estudiat (silicona Capsum), el fet d'utilitzar junta tòrica implica un temps mort d'uns 400 segons. De totes maneres, la millora observada al no utilitzar junta tòrica és molt petita i no és suficient per acostar-nos al temps de resposta de la sonda de referència, així que caldrà considerar altres estratègies de millora.

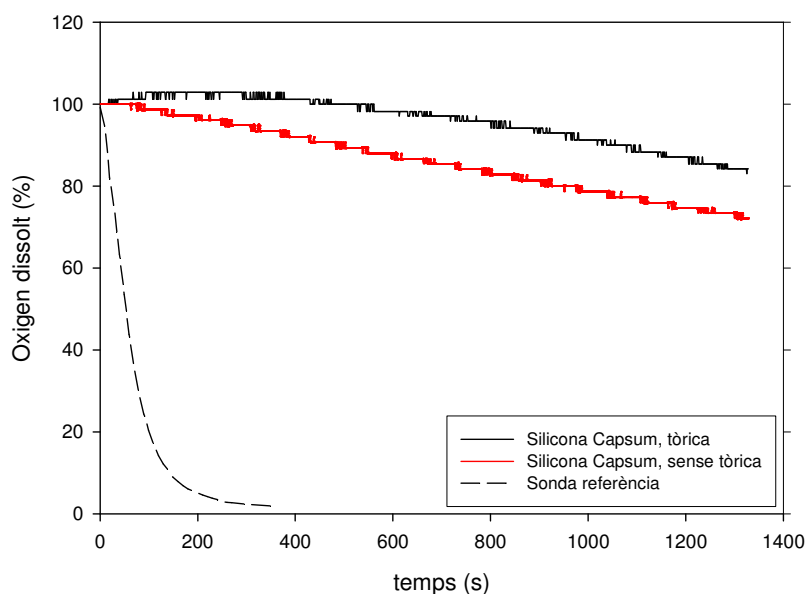


Figura 5.2.8. Dinàmiques de resposta d'una de les sondes prototip emprant el muntatge presentat a la figura 5.2.6, amb i sense junta tòrica, emprant la silicona Capsum com a membrana.

Al obtenir resultats que estan molt lluny de la capacitat de resposta d'una sonda comercial (20-50 s), s'ha realitzat un desenvolupament d'una membrana específica per a l'aplicació desitjada. Tot i els mals resultats assolits fins aquest punt, s'ha pogut observar com la silicona ha estat el material que permet un temps de resposta més reduït. Així doncs s'ha cercat materials per elaborar membranes de naturalesa química

similar, però que es puguin treballar al laboratori per tal de fixar el gruix de la membrana i així intentar reduir el temps de resposta del conjunt de la sonda i la membrana.

Amb aquesta finalitat, s'han manufacturat membranes de silicona de diferents gruixos, utilitzant com a material una silicona Wacker E43 (Wacker Chemie, Munich, Alemanya), que es proporciona en forma de gel i polimeritza per assecament. Les primeres proves realitzades amb aquest material es basen en una tècnica tipus *screen printing* per tal d'utilitzar membranes d'un gruix determinat. Utilitzant làmines amb orificis de 100 µm d'alçada s'han dipositat unes gotes de silicona en aquest, s'ha eliminat el material sobrant, i s'ha deixat curar aproximadament durant una nit. Les membranes obtingudes d'aquesta manera han estat utilitzades de dues formes diferents, d'una banda utilitzant la membrana situada dins una funda on es posiciona la sonda (muntatge Wacker A), i d'altra banda fent un muntatge que permeti reduir la separació entre membrana i sonda, la importància de la qual es veu reflectida en el gràfic anterior (muntatge Wacker B). Per a major claredat, a la figura 5.2.9 es mostren ambdós muntatges:

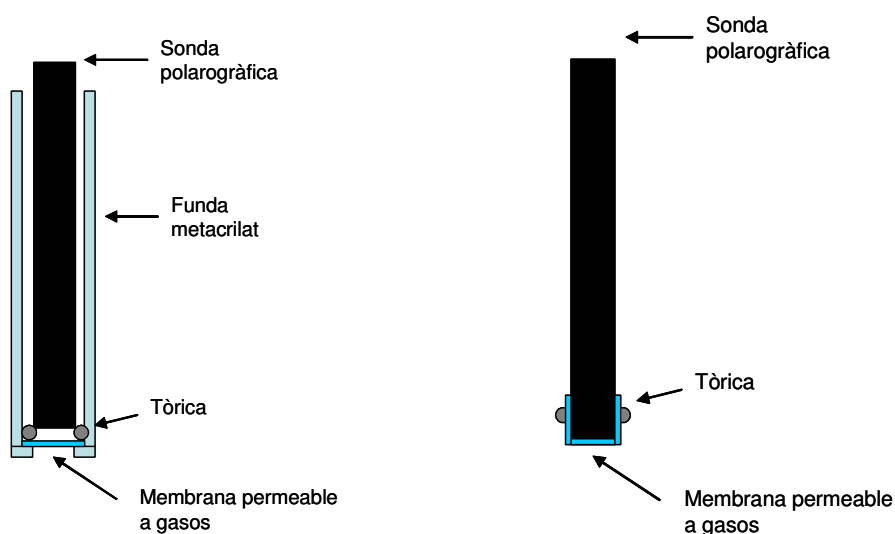


Figura 5.2.9. Esquerra, muntatge Wacker A, on la membrana s'ha integrat a l'estructura formada per la funda cilíndrica + sonda + junta tòrica. Dreta, muntatge Wacker B, on es posa una gota d'electrolit entre la sonda i la membrana i aquesta es subjecta a la sonda mitjançant una junta tòrica que permeti que no hi hagi separació d'ambdós elements.

Repetint el procediment experimental emprat amb les silicones Capsum, en aquest cas però, amb les noves membranes i els muntatges presentats a la figura 5.2.9, s'han obtingut els resultats que es mostren a la figura 5.2.10. Tal com s'observa, s'ha obtingut

una millora notable del que s'havia assolit fins aquest moment, ja que en el cas d'emprar una membrana situada més propera a la sonda (muntatge Wacker B), s'assoleix una dinàmica de resposta de l'ordre del de la sonda de referència (Mettler-Toledo, Ingold 3-532-58), com mostren els valors de τ calculats que es presenten a la taula.

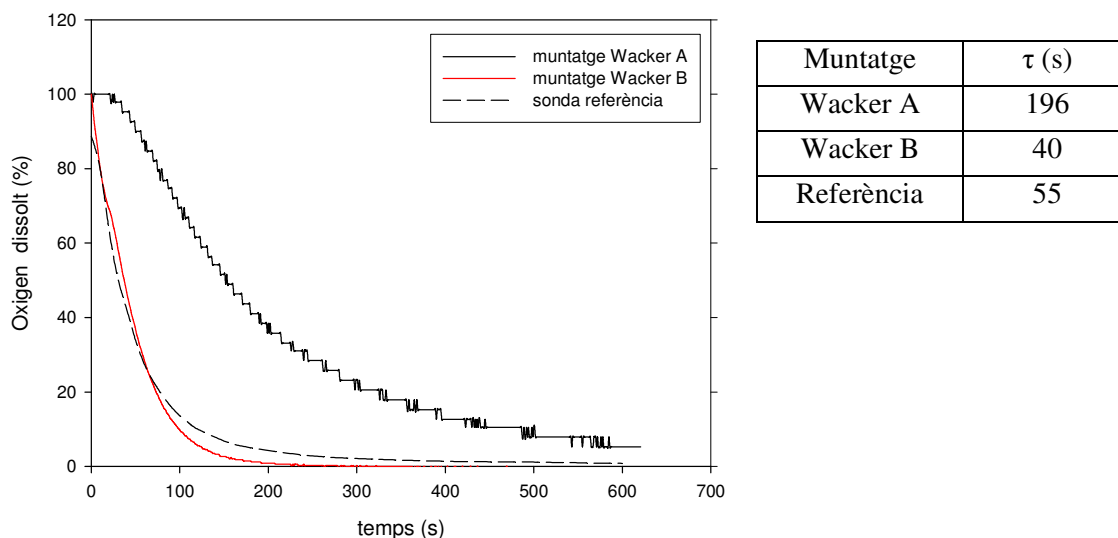


Figura 5.2.10. Dinàmiques de resposta de les sondes desenvolupades amb una membrana de silicona Wacker E43. A la dreta, taula amb els valors de τ .

Una altra observació que s'ha pogut fer durant aquest experiment han estat les notables diferències en la intensitat de senyal mesurada amb cadascun dels muntatges prototip (Wacker A tenia un senyal màxim de 250 nA, mentre que per a Wacker B aquest valor era d'uns 800 nA). Tot i que s'ha de comprovar en propers experiments, es pot realitzar la hipòtesi que la reducció de la separació entre la sonda i la membrana porta no solament associada una reducció del temps de resposta sinó també un increment en el senyal mesurat.

Resumint el resultat de l'experiment anterior, aquest demostra la possibilitat d'aconseguir temps de resposta de l'ordre dels de la sonda de referència. Per tant, en base a aquests resultats es creu necessari idear un disseny que permeti aconseguir que per una banda la membrana i la sonda estiguin el més properes possible, i per altra banda que aquest sistema s'integri en el concepte de minibioreactors en desenvolupament, que requereix sondes no invasives.

El concepte de bioreactor en el que es treballa (definit en el capítol 3) contempla plaques similars a les habitualment emprades per a cultiu, de 6 pous, on les tapes de cadascun

dels pous són independents i tenen sistemes per al bescanvi de gasos, entrada de cèl·lules i mesura mitjançant sondes. A la figura 5.2.11 es presenta una captura d'imatge del disseny del motlle per al plàstic, en l'estadi preliminar que correspon a aquest punt del treball a l'espera de finalitzar el desenvolupament de les sondes i el sistema d'agitació. Tal com es veu a la figura, per a posicionar les sondes s'han proposat entrades cilíndriques (amb una mínima conicitat per permetre el desenmotllat), que a mode de vaines contindran les sondes. En el cas de la sonda òptica el caràcter no invasiu d'aquesta és fàcilment assolible fent que el fons del port sigui cec. Com que el material de fabricació per als minibioreactors és poliestirè cristall, al fons del port s'estableix una finestra òptica. En el cas de la sonda polarogràfica, el caràcter no-invasiu presenta més complicacions ja que aquest ha de venir donat per la membrana que ha de quedar sellada al fons del port, que ha de permetre que la sonda quedi situada sobre seu exercint una certa pressió per mantenir un temps de resposta ràpid.

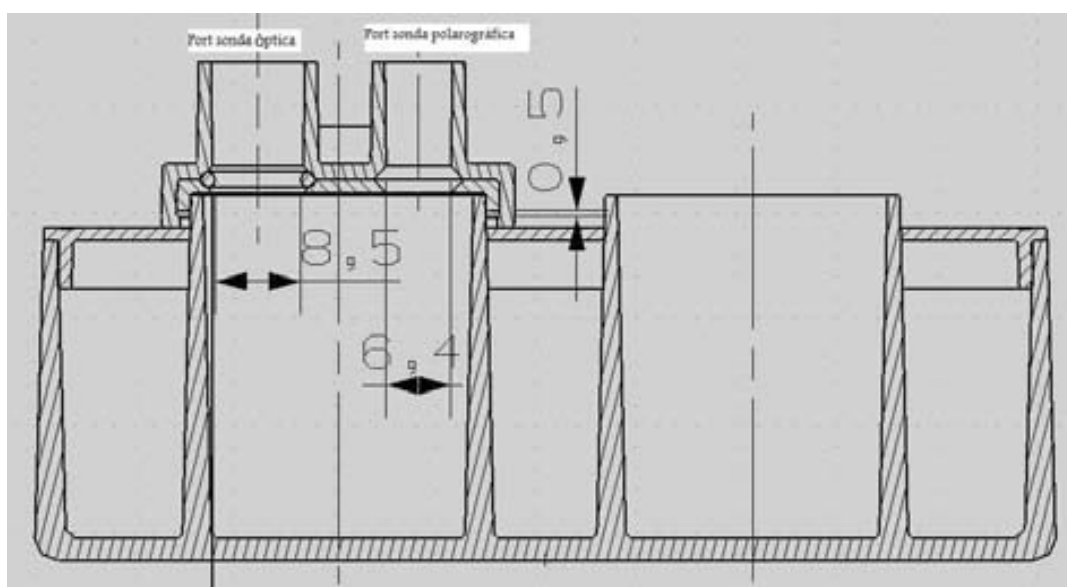


Figura 5.2.11. Detall del disseny del motlle per a la injecció de les plaques plàstiques de minibioreactors d'un sol ús. Detall de la tapa d'un dels minibioreactors, amb les sondes òptica i polarogràfica per definir.

El muntatge emprat que ha permès uns temps de resposta de l'ordre dels obtinguts amb una sonda de referència no es pot traslladar directament al disseny dels minibioreactors plàstics. Així doncs, cal definir un sistema basat en el concepte que ha donat bons resultats, però permetent la seva integració en els minibioreactors. Com a premises principals s'han tingut en compte la necessitat de robustesa que permetés evitar el trencament de les membranes en el moment que les sondes fossin situades sobre aquestes i la possibilitat de mantenir un temps de resposta reduït. La alternativa que s'ha

treballat més a fons ha estat la integració de les membranes de silicona en malles d'acer, mitjançant la sensibilització (polimerització) directament de la silicona sobre la malla. Aquesta opció també permet obtenir gruixos de membrana molt reduïts i reproduïbles, que vindran determinats bàsicament per la llum de pas de la malla i el gruix del fil metàl·lic, tenint a més una major estabilitat mecànica que serà útil tant durant les etapes de muntatge com de funcionament.

La malla escollida per a iniciar les tasques de desenvolupament ha estat d'acer inoxidable AISI314, amb 90 μm llum de pas (Alco, Terrassa, Espanya). Aquesta malla s'impregna amb la silicona (Wacker E 43) diluïda amb cloroform (Panreac, Castellar del Vallès, Espanya) (silicona 10:15 cloroform (p/V)), s'espera que es produeixi la sensibilització de la silicona durant 24 h i a continuació es tallen seccions circulars de les membranes generades (mitjançant un utilatge amb una matriu de tall de doble efecte), que s'enganxen amb la mateixa silicona als ports per a la mesura d'oxigen contemplats a cadascuna de les tapes plàstiques dels minibioreactors. A la figura 5.2.12 es presenten imatges dels passos de manufactura que s'acaben de comentar.

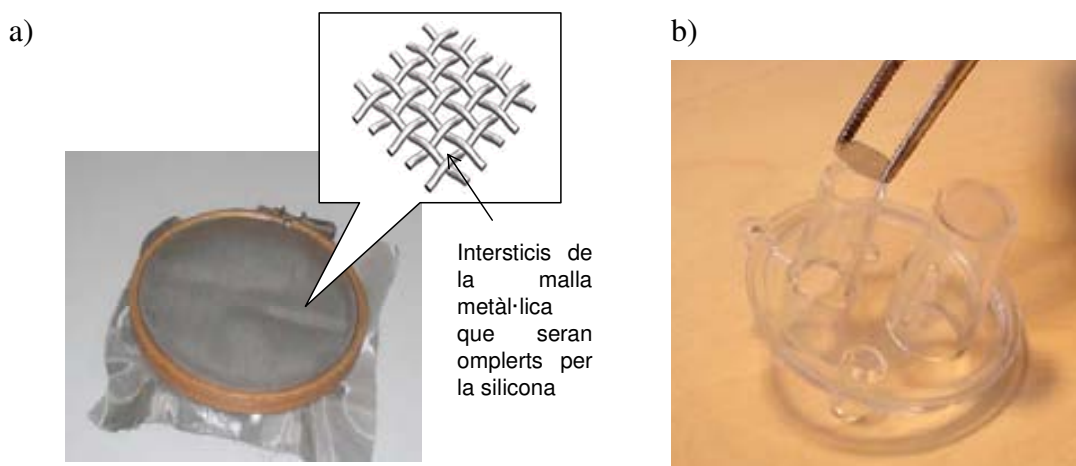
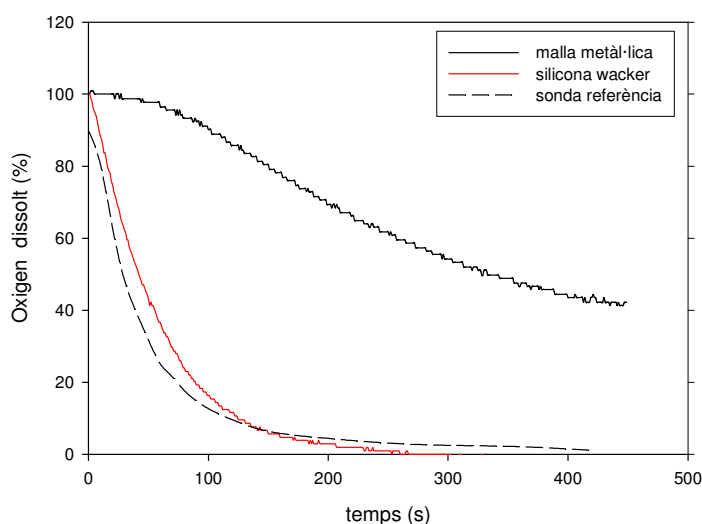


Figura 5.2.12. Imatges de la manufactura de membranes de silicona impregnant malles metàl·liques. a) fragment de malla d'acer inoxidable encaixada en un bastidor prèvia impregnació amb silicona, i detall de la malla i els intersticis que seran omplerts, i b) Una vegada impregnada la malla i sensibilitzada la silicona, es talla una secció circular i s'enganxa a l'extrem inferior del port per a la mesura d'oxigen contemplat a cadascuna de les tapes plàstiques dels minibioreactors.

Una vegada realitzats els muntatges, s'ha efectuat novament un experiment de dinàmica de resposta, situant inicialment les sondes en vasos de precipitats (minibioreactors pels casos de les membranes en estudi) amb aigua destil·lada saturada d'oxigen mitjançant el bombolleig d'aire i, una vegada estabilitzada la mesura, substituint els vasos de

precipitats per altres on s'havia eliminat la presència d'oxigen dissolt mitjançant la circulació de nitrogen.

A la figura 5.2.13 es mostren les dinàmiques de resposta per a un muntatge de silicona sensibilitzada sobre una malla metàl·lica, comparada amb la que s'obté amb un altre muntatge amb una membrana de silicona obtinguda per *screen-printing* adherida al fons del port del minibioreactor (intentant emular el muntatge Wacker A, figura 5.2.9, però sense tòrica per tal d'obtenir millors resultats), i també comparada amb una sonda de referència (Mettler-Toledo, Ingold 3-532-58). Els resultats mostren que amb la membrana sensibilitzada sobre la malla metàl·lica novament es poden obtenir dinàmiques comparables a les de la sonda de referència (com també es mostra a la taula presentada juntament amb la gràfica), mentre que amb la membrana únicament de silicona, la dinàmica de resposta és força més lenta.



Muntatge	τ (s)
Malla metàl·lica	52
Membrana Wacker	434
Referència	55

Figura 5.2.13. Comparació dels temps de resposta obtinguts amb el muntatge Wacker A enfront un altre on la silicona sigui sensibilitzada sobre una malla d'acer. A la dreta, taula amb els valors de τ .

Per tal d'explicar els resultats anteriors és significativa l'observació que, amb la membrana feta amb el suport de malla metàl·lica, és possible realitzar més pressió a l'hora de posar en contacte sonda i membrana, de manera que és més fàcil assegurar que tota la secció de la sonda queda en contacte amb la membrana. D'altra banda, en el cas de la membrana manufacturada únicament amb silicona, apareixen plecs que fan que no tota la secció de la sonda estigui en contacte d'igual manera amb la membrana. Aquestes diferències en la capacitat de fer pressió amb la sonda sobre la membrana comporten diferències considerables en la dinàmica de resposta, més ràpida en el cas de la membrana sobre la malla metàl·lica, com es mostra a la figura 5.2.13.

Tal com havia succeït en l'experiment anterior, s'ha observat novament una correlació entre la dinàmica de resposta i la intensitat màxima de senyal mesurada (uns 500 nA per la membrana de silicona en malla metàl·lica, i uns 200 nA per la membrana únicament de silicona), essent major aquesta quan els temps de resposta són ràpids.

A continuació, s'han realitzat diferents muntatges de silicona Wacker sensibilitzada sobre malles amb diferent diàmetre de fil i llum de pas, per tal d'acabar d'optimitzar les membrades desenvolupades, pel que fa a estabilitat mecànica i temps de resposta.

Les malles emprades han estat totes estat d'acer inoxidable AISI314, amb llums de pas de 90, 160 i 300 μm (Alco, Terrassa, Espanya), havent-se realitzat els muntatges de la mateixa manera que en el cas que s'ha comentat de la malla de 90 μm (veure figura 5.2.12). L'experiment realitzat ha consistit novament en situar inicialment els muntatges en vasos de precipitats (minibioreactors pels casos amb malles metàl·liques) amb aigua destil·lada saturada d'oxigen mitjançant el bombolleig d'aire i una vegada estabilitzada la mesura, substituint els vasos de precipitats per altres on s'havia eliminat la presència d'oxigen dissolt mitjançant la circulació de nitrogen.

A la figura 5.2.14 es mostren les dinàmiques de resposta enfront el canvi de concentració d'oxigen, i les dades de temps de resposta es presenten a la taula 5.2.3. Les corbes per a malles amb llum de pas de 90 i 160 μm presenten ambdues comportaments molt propers a la de la sonda de referència (indicant aquest fet que s'ha pogut obtenir gruixos de membrana prou reduïts per tenir un temps de resposta com a mínim tant ràpid com el d'una sonda de referència). En el cas que la llum de pas augmenta a 300 μm , s'observa un increment del temps de resposta.

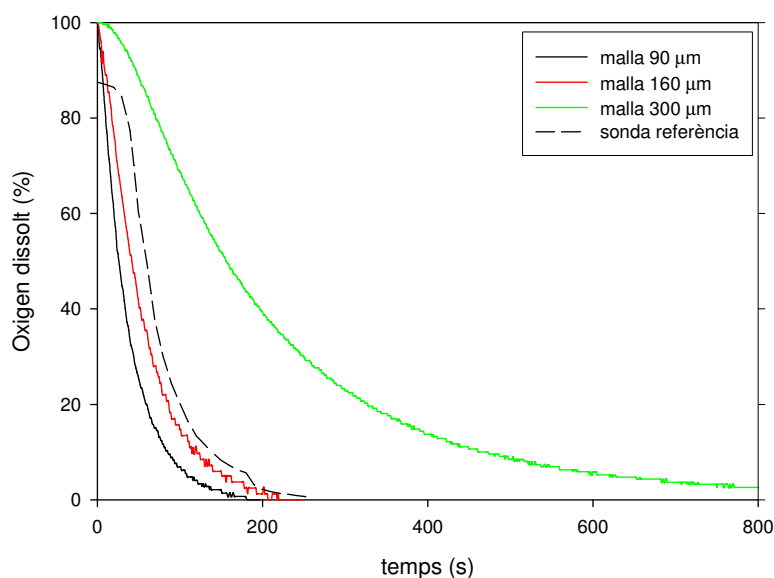


Figura 5.2.14. Dinàmiques de resposta d'una de les sondes desenvolupades amb membranes realitzades amb silicona i amb malles metàl·liques de diferent llum de pas (90, 160 i 300 μm), en comparació a una sonda de referència.

Novament, tal com s'havia observat en els casos anteriors, a major intensitat més ràpids han estat els temps de resposta (veure taula 5.2.3).

Llum de pas malla	τ (s)	Intensitat màxima mesurada (nA)
90 μm	37	708
160 μm	57	630
300 μm	212	459
Sonda de referència	52	-

Taula 5.2.3. Valors obtinguts d'intensitat mesurada i temps de resposta per a cadascuna de les malles utilitzades en els experiments referents a la figura 5.2.14.

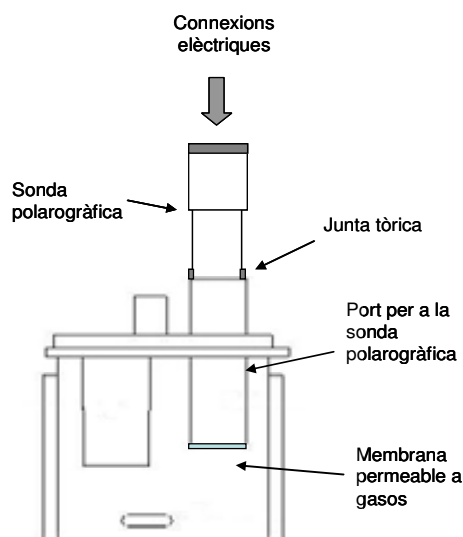
Per a realitzar la selecció entre les dues malles que han donat un temps de resposta prou ràpid, s'ha emprat com a criteri principal la reproduïbilitat en la fabricació de les membranes. Cal tenir en compte que la malla més prima, de 90 μm de llum de pas és difícilment manipulable, ja que durant el procediment d'aplicació de la silicona, pateix deformacions, que provoquen irregularitats en la distància entre la sonda i la membrana que implicaven majors dificultats per a ser adherit al port del minibioreactor i que tenen efectes sobre els temps de resposta. Aquest efecte no ha estat observat amb la malla de 160 μm de llum de pas, de manera que aquesta és la seleccionada per a seguir amb el desenvolupament.

5.2.2.4. Caracterització de la funcionalitat: calibratge i validació

Una vegada validada la capacitat d'obtenir temps de resposta de l'ordre dels obtinguts amb una sonda de referència, s'ha realitzat la fabricació d'una nova sèrie de sondes prototip, amb un disseny més adaptat al ports de les tapes dels minibioreactors on s'han de situar les sondes.

A la figura 5.2.15 es presenta un esquema del minibioreactor i la situació dels elements per a la mesura d'oxigen dissolt (sonda i membrana), així com una fotografia per a una millor visualització.

A)



B)



Figura 5.2.15. A) Esquema del minibioreactor, on la tapa té un port per a situar la sonda d'oxigen dissolt, que encaixa al port per mitjà de la seva conicitat (idèntica a la del port), així com per la presència d'una junta tòrica de fixació. La membrana de silicona en malla metàl·lica es troba adherida al port també mitjançant silicona, sense la presència de cap junta tòrica que la separi de la sonda. B) Fotografia d'un minibioreactor amb la sonda d'oxigen encaixada al port corresponent.

Amb aquestes sondes i muntatges, s'ha realitzat calibratges per tal de comprovar la linealitat de la mesura. Per als calibratges s'ha emprat una única sonda prototip i tres tapes de minibioreactor diferents amb membranes adherida de la forma mostrada a la figura 5.2.12, emprant aigua destil·lada com a líquid per omplir el vas de precipitats on es situava la tapa del minibioreactor, conjuntament amb una sonda de referència. En cadascun dels casos, previ a l'inici de l'experiment, s'ha saturat amb aire el contingut del vas de precipitats fins assolir una estabilització al voltant del 100% de saturació per a la sonda de referència, i a partir d'aquest moment s'ha iniciat el registre de les mesures, i s'ha iniciat la circulació d'un cabal de nitrogen per capçal, de tal forma de la dinàmica de variació de l'oxigen dissolt en el sistema fos significativament més lenta que la pròpia de les sondes. A la figura 5.2.16 es mostren els valors d'intensitat obtinguts amb les sondes per als diferents valors de concentració d'oxigen al medi líquid. resultats obtinguts, a l'eix d'abcises la intensitat mesurada amb la sonda desenvolupada, i a les ordenades els percentatges d'oxigen dissolt mesurats amb la sonda de referència. Com es pot observar, la linealitat i comparabilitat dels tres calibratges és molt elevada, assolint-se de mitjana un valor de $r^2 = 0,997$.

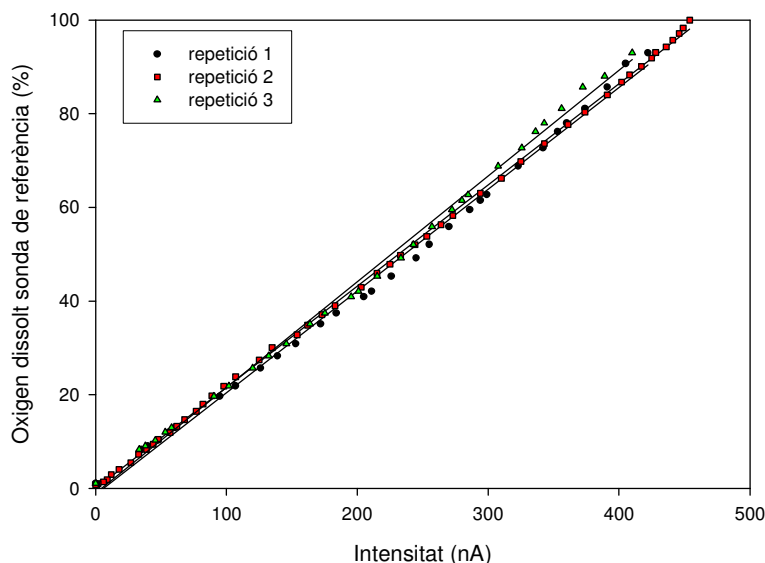


Figura 5.2.16. Calibratges d'una sonda prototip emprant per a cada repetició una tapa de minibioreactor diferent. Es presenta la intensitat mesurada amb la sonda desenvolupada, els percentatges d'oxigen dissolt mesurats amb la sonda de referència.

A continuació s'ha realitzat un primer experiment d'estabilitat del senyal en períodes de temps perllongats per valorar quina serà la fiabilitat de la mesura al llarg dels cultius, que de mitjana s'espera que tinguin una durada d'uns tres dies. En aquest, s'ha emprat un únic minibioreactor, amb un contingut de 13 mL d'aigua destil·lada, i una única de les sondes desenvolupades (tal com mostra la figura 5.2.15). Prèviament a la mesura, s'ha realitzat un calibratge del 0 i 100% mitjançant la saturació del contingut del minibioreactor amb nitrogen i aire, respectivament. A continuació s'ha iniciat la mesura, mantenint de forma constant un cabal de 0,2 L/min, per assegurar que la concentració d'oxigen dissolt en el líquid sigui constant.

A la figura 5.2.17 es mostren els resultats del seguiment de l'oxigen dissolt (expressat com a percentatge de saturació respecte l'aire) durant un període de 72 h. Tal com s'observa, hi ha una certa deriva del senyal, que s'incrementa progressivament, a un ritme mitjà del 3,8% diari.

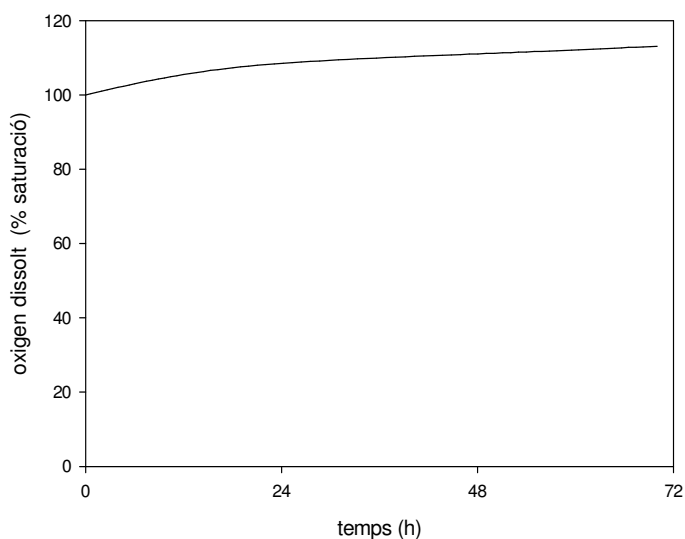


Figura 5.2.17. Estabilitat de la mesura d'oxigen dissolt durant 72h amb la sonda i el muntatge presentats a la figura 5.2.15.

Aquest efecte de deriva, o bé de manca d'estabilitat, foren observats també en altres desenvolupaments de sensors d'oxigen tipus Clark (Revsbech i Col., 1983). En aquest treball s'observà una certa presència d'òxid sobre les membranes permeables a gasos, de manera que es pot realitzar la hipòtesi que aquest podia generar un cert curtcircuit entre l'ànode i el càtode, augmentant la circulació de corrent entre ambdós. Per tal de reduir aquest efecte, s'ha optat per emprar espaiadors de cel·lulosa, que a banda d'impedir un contacte directe entre la membrana i els metalls de la sonda (càtode/ànode), també permet millorar l'eficiència en la utilització d'electrolit, utilitzant-ne menor quantitat i millorant el seu repartiment.

Amb aquest nou muntatge, emprant espaiadors de cel·lulosa (veure la seva ubicació a la figura 5.2.18), s'ha repetit el mateix procediment per a estudiar l'estabilitat, en aquest cas però emprant tres minibioreactors diferents, amb tres sondes prototip diferents.

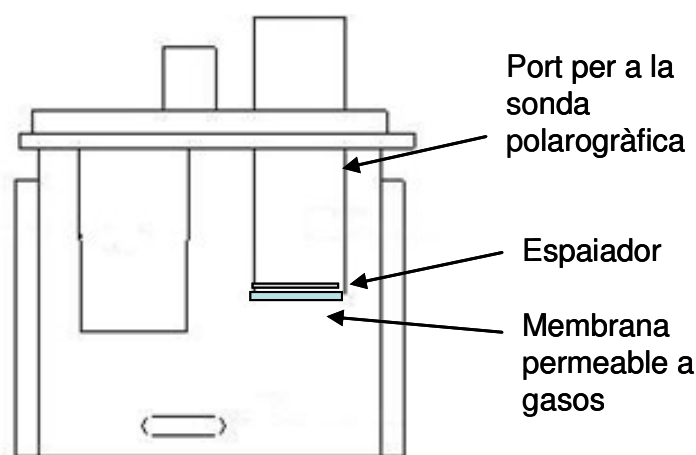


Figura 5.2.18. Ubicació dels espaiadors de cel·lulosa al port per a la sonda polarogràfica del minibioreactor plàstic.

A la figura 5.2.19 es mostren els resultats obtinguts per al seguiment de l'oxigen dissolt (expressat com a percentatge de saturació respecte l'aire) durant un període de 72 h. En aquest cas s'observa que la deriva pràcticament és inexistent (a les 72 h el percentatge d'oxigen dissolt varia de mitjana un 2,7% respecte el mesurat a temps inicial). De totes maneres, s'observa un cert soroll que fa que en tot el període hi hagi oscil·lacions amb unes desviacions màximes (de mitjana entre les tres sondes estudiades) d'aproximadament el +/-3%, respecte la mitjana de les mesures.

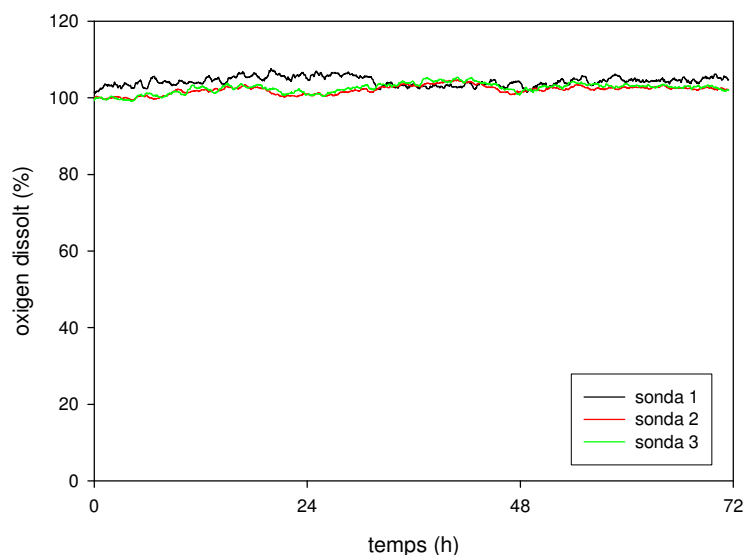


Figura 5.2.19. Estabilitat de la mesura d'oxigen dissolt per a tres dels prototips de sonda polarogràfica tipus Clark construïts, col·locant una membrana de cel·lulosa entre cada sonda i la membrana permeable a gasos present al fons del port polarogràfic.

Havent assolit un senyal estable per a les sondes desenvolupades, amb una metodologia de treball que implica però la seva col·locació manual, una a una, al port corresponent de cada minibioreactor, s'ha procedit a adaptar la metodologia de treball a un sistema de cultiu amb sis minibioreactors. Per a treballar amb aquest sistema cal que existeixi un posicionament semi-automàtic de les sondes. Aquestes estaran fixades a una platina que contempla l'estació de treball del sistema de minibioreactors, i una vegada el plàstic amb els sis minibioreactors estigui situat correctament, la platina es fa baixar manualment, quedant correctament posicionades cadascuna de les sondes. Aquest concepte es presenta a la figura 5.2.20, que s'explica amb més detall a la figura 8.2.13 del Capítol de Materials i Mètodes.

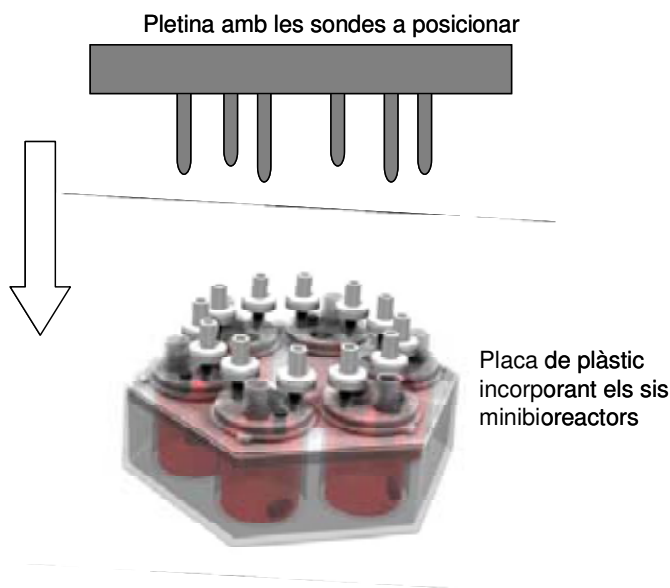


Figura 5.2.20. Posicionament de les sondes polarogràfiques a un sistema de 6 minibioreactors. Aquestes estan situades en una platina amb diversos components, que es farà baixar manualment fins que les sondes quedin a les seves posicions respectives.

Amb aquest nou sistema, es planteja un experiment d'estabilitat de la mesura, seguint els següents passos i especificacions:

1. Partint d'una placa de plàstic de sis minibioreactors, omplir cadascun dels minibioreactors amb 13 mL d'aigua destil·lada, i els ports per a les sondes d'oxigen amb membranes de cel·lulosa i 100 μ L d'electrolit (KCl 0,5 M i K_2HPO_4 0,5 M).
2. Posicionar la placa de minibioreactors al sistema de sis minibioreactors, i tancar el sistema (per a major detall veure passos 1,2 i 3 indicats a la figura 8.2.13, a Materials i Mètodes).
3. Atemperar els minibioreactors a 37°C, i circular un cabal d'aire comprimit de 0,2 L/min (a condicions normals) de forma alterna pels sis minibioreactors (5 segons d'aeració per reactor cada 30 segons).
4. Una vegada estabilitzada la temperatura (aproximadament dues hores), i la mesura de voltatge de les sondes d'oxigen desenvolupades, fer el 100% d'oxigen dissolt (respecte la saturació d'aire).
5. A continuació, fer el 0% fent circular un cabal de nitrogen (0,8 L/min a condicions normals) repartits pels capçals dels diferents minibioreactors, i una vegada estabilitzada la mesura prenent el valor de voltatge de cada sonda com a zero.
6. Iniciar les mesures.

Seguint aquesta metodologia s'han obtingut els resultats que es mostren a la figura 5.2.21. En aquesta es pot observar que per dos dels minibioreactors (números 1 i 6) apareixen derives especialment remarcables, que després de 10 h suposen unes desviacions respecte els valors inicials del 33 i 21% respectivament.

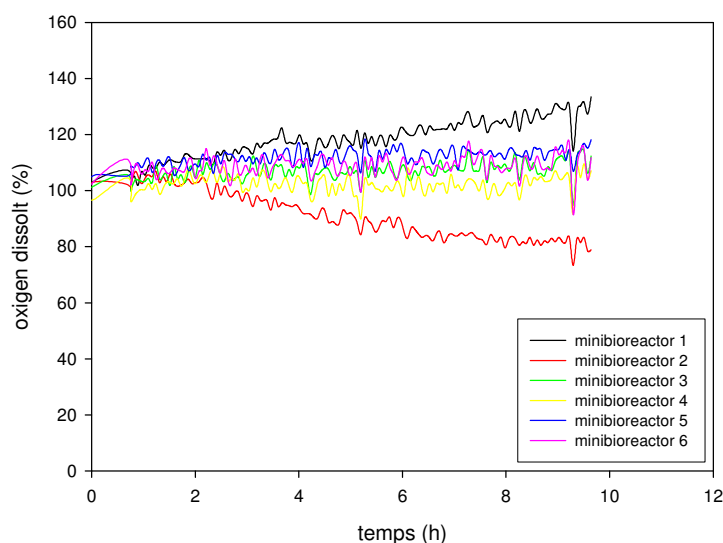


Figura 5.2.21. Estabilitat de la mesura d'oxigen dissolt emprant les sondes desenvolupades, i el sistema de cultiu de sis minibioreactors.

A la vista d'aquests resultats s'han realitzat diverses repeticions de proves d'estabilitat seguint la metodologia anterior, observant-se en la major part de casos derives per a un o més canals, que fins i tot arriben a valors d'intensitat elèctrica mesurada propis d'un curtcircuit. Per explicar aquests efectes es planteja que puguin ser deguts al posicionament semi-automàtic de les sondes. Es creu que això pot ser així ja que en alguns casos s'ha observat que l'electrolit havia vessat del port de la sonda, portant a possibles curtcircuits (que en la mesura d'oxigen es veuen com un increment considerable del senyal), i en altres casos, l'execució dels passos de tancament del sistema de sis minibioreactors amb una força massa elevada han dut a la perforació d'alguna membrana.

La impossibilitat de garantir una funcionalitat correcta de les sondes, deguda a l'elevada precisió que requereix el posicionament entre la sonda i la membrana, i també la incapacitat de garantir la no-ruptura de les membranes permeables a oxigen i finalment també els resultats positius en el desenvolupament de sistemes de mesura d'oxigen dissolt per fluorescència, que es realitzaven en paral·lel als experiments descrits amb les sondes polarogràfiques (Sarró, 2009) han portat a la utilització de les sondes de fluorescència per a prosseguir en el desenvolupament del sistema de cultiu cap a un equip industrialitzat.

Cal esmentar que, substituint el tancament semi-automàtic per un altre que contempli que es puguin fer ajustos de forma manual, es poden seguir aplicant sondes de tipus polarogràfic, però donara la voluntat de desenvolupar un equip amb aplicació industrial, s'explorarà la possibilitat d'aplicar sistemes de mesura de fluorescència.

5.2.3. Aplicació de sistemes de mesura d'oxigen dissolt per fluorescència

5.2.3.1. Fonament de les mesures d'oxigen per fluorescència

Les mesures òptiques d'oxigen dissolt es fonamenten en el fet que les molècules d'oxigen poden ser complexades per determinats compostos, que irradiats a determinades longituds d'ona emeten fluorescència a diferents intensitats, depenent de la quantitat d'oxigen que estiguin complexant.

Els diferents sistemes de mesura òptica d'oxigen dissolt que han estat desenvolupats han seguit la metodologia emprada habitualment en la fabricació de biosensors, que és la immobilització de l'agent responsable de la detecció en una membrana. Els compostos

que presenten propietats de fluorescència interessants són diferents metalls de transició, els quals s'han combinat amb diferents molècules orgàniques que, sobretot, els confereixen la capacitat de ser immobilitzats en membranes. A la taula 5.2.4 es presenten alguns exemples.

Fluoròfor	Referència
Ru(p) ₃ (ClO ₄) ₂	Carraway i Col., 1991; Kuncova i Fialova, 1995
PdOEP	Amao i Col., 2001; Eaton i Col., 2004
BPh ₄	Kostov i col 2000a,b; Van Houten i Col., 1998
Camphorquinone	Charlesworth, 1994; Charlesworth i Gan, 1996

Taula 5.2.4. Compostos emprats per a la mesura d'oxigen dissolt per fluorescència. Ru(p)₃(ClO₄)₂ és el compost Tris(1,10-phenanthroline)ruthenium(II) dichloride. PdOEP és el compost 2,3,7,8,12,13,17,18-octaethyl-21H,23H-porphine palladium (II). BPh₄ és el compost 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane-Pt{S₂C₂(CH₂CH₂-N-2-pyridinium) }.

Les alternatives per a l'implementació de mesures d'oxigen dissolt per fluorescència són bàsicament la mesura de la intensitat i la mesura del temps de vida d'aquesta fluorescència.

Tot i que la mesura de la intensitat permet bons resultats en un ambient òpticament net, en sistemes de mesura com la sang o cultius microbians, aquesta opció comporta diferents problemes d'atenuació i pèrdua de llum al llarg del sistema. Així mateix, el propi envelliment del fluoròfor provoca una desviació, que és major a mesura que augmenta el temps de cultiu (Berndt i Lakowicz, 1992; Lakowicz, 2006). El funcionament d'una metodologia de mesura del temps de vida de la fluorescència ha donat millors resultats, de manera que és aquesta la metodologia amb la qual s'ha treballat. El mètode de detecció emprat per a la mesura del temps de vida del fluoròfor, que es pot trobar descrit al treball de tesi doctoral d'Enric Sarró (2009), és la desmodulació coherent per a l'obtenció de la fase de les ones electromagnètiques emeses respecte l'ona d'excitació, fase relacionada amb el temps de vida de l'ona emesa segons l'equació 5.2.2:

$$\tau_F = \tan(-\varphi) / 2\pi f_0 \quad \text{Eq. 5.2.2}$$

On,

τ_F és el temps de vida del fluoròfor

φ és la fase mesurada de l'ona emesa

f_0 és la freqüència de màxima interferència de l'oxigen en el temps de vida del fluoròfor

Amb aquesta equació es podrà trobar el temps de vida de les ones emeses a partir de les mesures de fase realitzades a través de la sonda i, mitjançant la realització d'un calibrat de l'equació d'Stern-Volmer (equació 5.2.3), es podrà trobar el valor de la concentració d'oxigen dissolt en el medi.

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_{F,0}}{\tau_F} = 1 + k_q \cdot \tau_{F,0} \cdot [O_2] \quad \text{Eq. 5.2.3}$$

On:

I_0 , I són les intensitats de la llum emesa en absència i una presència determinada d'oxigen, respectivament

$\tau_{F,0}$ i τ_F són els temps de vida de la llum emesa en absència i una presència determinada d'oxigen, respectivament

k_q és la constant de velocitat de desactivació que depèn de les constants físiques del sistema

$[O_2]$ és la concentració d'oxigen dissolt en el medi

5.2.3.2. Tecnologia emprada per a les mesures d'oxigen per fluorescència

La tecnologia emprada per a la mesura de l'oxigen dissolt per fluorescència consta, d'una banda, de membranes amb el fluoròfor immobilitzat i, d'altra banda, d'elements òptics i electrònics. Les membranes amb el fluoròfor immobilitzat emprades han estat de Ocean Optics (FOXY GF), i la tecnologia ha estat desenvolupada en el marc de la tesi doctoral d'Enric Sarró (2009), amb desenvolupaments realitzats al Grup d'Instrumentació Electrònica i Biomèdica del Departament d'Enginyeria Electrònica de la Universitat Politècnica de Catalunya.

Les membranes del fluoròfor immobilitzat han estat adherides a les tapes dels minibioreactors mitjançant una silicona (Dow Corning, Sylgard 184), quedant situades tal com es mostra a la figura 5.2.22. Per a major detall, veure la figura 8.3.5 del Capítol de Materials i Mètodes.

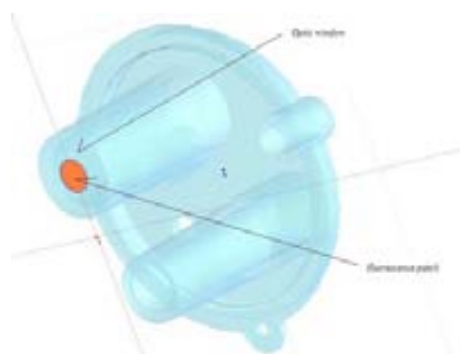


Figura 5.2.22. Representació esquemàtica de la localització de les membranes amb el fluoròfor immobilitzat adherides a la tapa de minibioreactor.

5.2.3.3. Validació funcional del sistema de mesura de fluorescència

Una vegada incorporada l'electrònica i òptica per a mesura de la fluorescència per desmodulació coherent i realitzats muntatges de plaques de minibioreactors incorporant les membranes amb fluoròfor immobilitzat (per a més detall veure el capítol de materials i mètodes), s'ha realitzat els següents passos per a validar-ne el funcionament:

i. Temps de resposta

Emprant una placa de 6 minibioreactors situada en el sistema de cultiu, sense líquid en els reactors, s'ha realitzat un canvi en l'aeració passant d'aire a nitrogen gas. A la figura 5.2.23 es representa la variació de l'oxigen mesurat en cadascun dels minibioreactors, expressat en voltatge i normalitzat per a cada canal respecte a la seva variació entre el 100 i el 0% d'oxigen.

Tal com s'observa a la figura 5.2.23, el temps de resposta (τ) és menor a 5 segons en tots els casos, que és un valor molt ràpid tenint en compte que aquest temps incorpora la dinàmica d'eliminació de l'oxigen dels minibioreactors i recanvi per nitrogen gas. No obstant, donat que incorpora altres paràmetres, no es pot determinar concretament el temps de resposta.

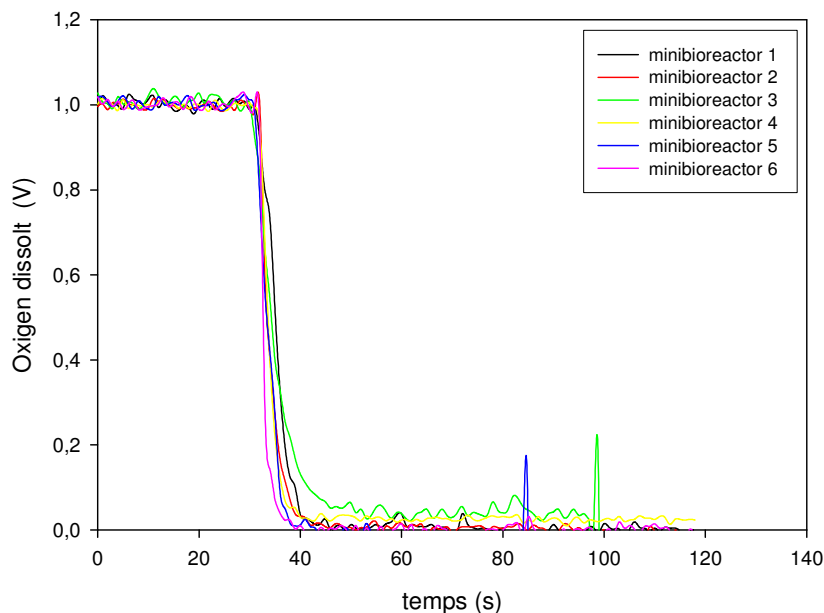


Figura 5.2.23. Temps de resposta del sistema de mesura d'oxigen incorporat en el sistema de cultiu de sis minibioreactors, en fase gas.

L'experimentació per a determinar el temps de resposta no es pot realitzar tenint la placa de minibioreactors situada en el sistema, ja que no es pot canviar les membranes sensores d'un ambient al 100% a una altre ambient al 0%. Per a realitzar la mesura exacta del temps de resposta caldrà determinar la d'una membrana amb el fluoròfor immobilitzat, situada en un minibioreactor individual.

Amb un únic minibioreactor individual amb una membrana amb el fluoròfor immobilitzat, enganxat a la tapa del minibioreactor, s'ha repetit els experiments per a determinar el temps de resposta en medi líquid (aigua destil·lada), realitzant la mateixa mètrica emprada a l'apartat 5.2.2.3, obtenint-se valors de τ menors a 5 s. Novament no s'ha pogut precisar el valor exacte, donat el reduït temps de resposta del sistema de mesura.

ii. Calibratge

Emprant un minibioreactor individual amb una membrana amb el fluoròfor immobilitzat, enganxat a la tapa del minibioreactor, omplert amb 12 mL d'aigua destil·lada, s'ha realitzat un calibratge fixant la concentració d'oxigen a diferents valors, emprant una estació de mescla de gasos (Braun, Biostat MCD). Durant aquest temps s'ha anat registrant el senyal provinent del sistema de mesura d'oxigen de fluorescència (en voltatge) i s'ha representat en funció del mesurat amb una sonda de referència (Ingold 12 mm, Mettler-Toledo, Greifensee, Suïssa), que coincidia amb el consignat a l'estació de mescla de gasos.

Aquesta representació, mostrada a la figura 5.2.24, permet constatar que el comportament de la sonda de fluorescència no és completament lineal sinó que segueix una tendència que es pot aproximar mitjançant una equació quadràtica. De totes maneres, en casos de cultiu on es mantingui una concentració major del 40%, es podrà realitzar un ajust lineal, entre el 40% i el 100% d'oxigen dissolt.

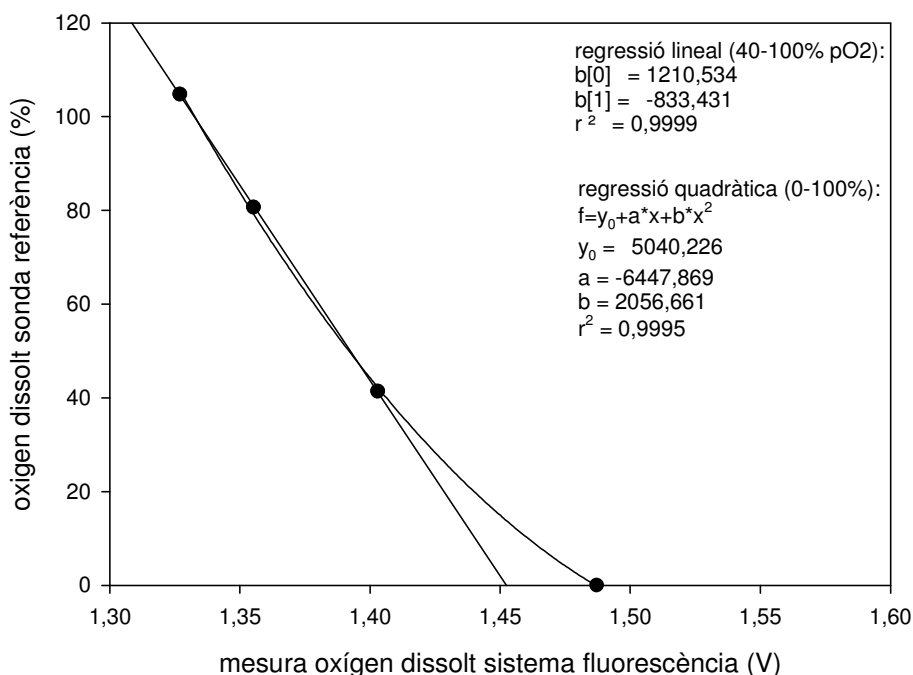


figura 5.2.24. Representació del percentatge d'oxigen dissolt present al sistema (mesurat amb una sonda de referència) en funció de la resposta de la sonda de fluorescència en Volts.

iii. Reproduïbilitat i estabilitat

Per tal d'avaluar la reproduïbilitat de la mesura d'oxigen en un mateix bioreactor, i les diferències entre bioreactors, s'ha emprat 6 plaques de 6 minibioreactors (un total de 36 minibioreactors), cadascun d'ells omplert amb 12 mL d'aigua destil·lada. Amb cadascuna de les plaques, el sistema s'ha atemperat a 37°C i sense calibrar el sistema de mesura d'oxigen dissolt s'han registrat les seves mesures (en voltatge), saturant els minibioreactors amb un cabal d'aire comprimit, i posteriorment, eliminant l'oxigen amb un cabal de nitrogen.

A la figura 5.2.25 es mostren les mesures obtingudes (en voltatge) per al 100% de saturació en aire, 0% de saturació, i la variació entre aquests dos valors. Tal com s'observa, hi ha una certa dispersió entre els canals de mesura de cadascun dels minibioreactors. Donades les diferències entre els valors mitjans per al 100% i 0% de saturació, i les barres d'error existents, es pot concloure que hi ha una certa variació implícita a cada placa de minibioreactors, i una certa variació deguda als sistemes òptics i electrònics independents de cadascun dels canals de mesura (cada canal correspon a un minibioreactor).

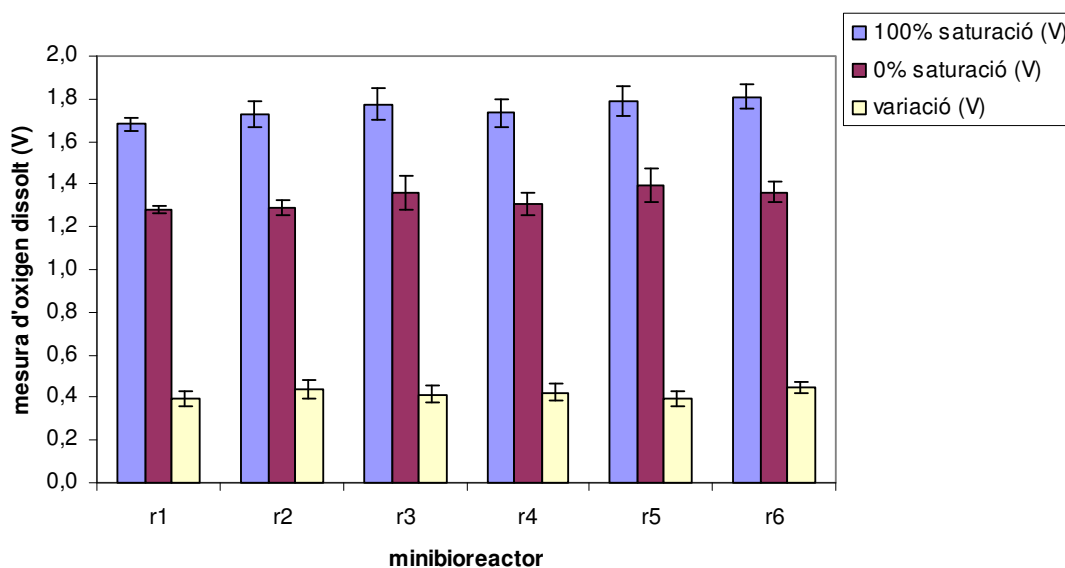


figura 5.2.25. Representació gràfica dels senyals del mesurador d'oxigen dissolt per als diferents minibioreactors, mesurant el 100%, 0% d'oxigen dissolt (en Volts), i de la variació entre ambdós valors. Totes les dades estan en voltatge.

El pas següent per a validar el sistema de mesura d'oxigen en l'equip de sis minibioreactors ha estat avaluar l'estabilitat tant del sistema de mesura com de les membranes amb el fluoròfor immobilitzat. Amb aquesta finalitat, s'ha emprat una placa de minibioreactors estèril, on cada minibioreactor s'ha omplert amb 12 mL de medi DMEM (Sigma, D5796). Inicialment s'ha atemperat els minibioreactors a 37°C i saturat el contingut dels minibioreactors amb aire comprimit, i a partir d'aquest instant, l'aeració s'ha mantingut fent polsos d'aire-5% CO₂ 4 s cada 250 s.

A la figura 5.2.26 es representen els valors de voltatge normalitzats respecte els valors d'inici de cada minibioreactor, essent l'amplitud d'escala de la gràfica equivalent a la variació de voltatge entre el 0 i 100% d'oxigen dissolt (0,4 V).

Tal com s'observa a la figura, la variació respecte el voltatge inicial és molt reduïda, de manera que l'estabilitat de la mesura es pot considerar molt elevada.

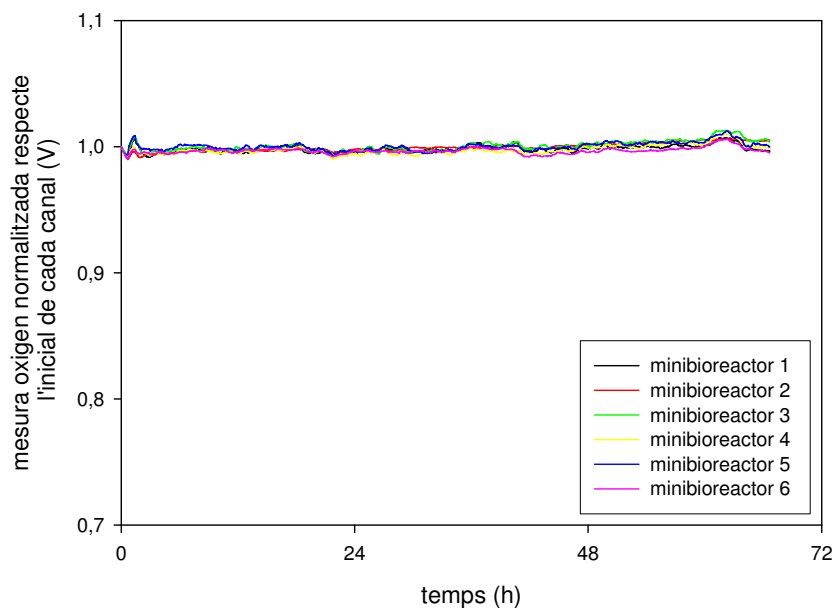


Figura 5.2.26. Seguiment de l'oxigen dissolt amb el sistema de sis minibioreactors durant aproximadament 65 h.

Amb la figura anterior, on es mostra que s'ha assolit mesures estables durant el temps habitual de cultiu, es dona per acabat l'apartat de desenvolupament del sistema de mesura d'oxigen dissolt.

Es pot concloure que s'ha assolit un sistema de mesura d'oxigen polarogràfic funcional, aplicable en sistemes d'un únic minibioreactor on el posicionament de la sonda sobre la membrana permeable a gasos es manual, però no aplicable en el cas de sistemes de múltiples minibioreactors, on el sistema de posicionament de totes les sondes és mecànic i semi-automàtic. En aquest cas s'ha optat per implementar un sistema de mesura de fluorescència, que no es veia afectat pel posicionament de les sondes, ja que la membrana sensora, responsable del senyal de mesura, està situada a l'interior del minibioreactor.

5.3. Altres desenvolupaments

Dins d'aquest apartat s'agrupen una sèrie de desenvolupaments addicionals i ajustos de determinades funcionalitats del sistema de minibioreactors, requerides per a la correcta operació dels mateixos.

5.3.1. Desenvolupament d'un sistema d'agitació específic

El sistema de minibioreactors en desenvolupament contempla com requeriment disposar de sistemes d'agitació, que en cultius cel·lulars són necessaris per a mantenir la suspensió homogènia, mantenint uns coeficients de transferència de matèria i energia que permetin evitar l'existència de gradients de nutrients, pH, i temperatura.

Una consideració necessària, prèvia a l'inici d'aquest desenvolupament, és l'alta sensibilitat dels cultius cel·lulars a l'estrès per cisalla. Així, seran necessàries diferències tant en el disseny com en la intensitat de mescla, que en cultius cel·lulars és menor que l'existent en cultius microbians, ja que la manca de paret cel·lular i la seva mida fa que les cèl·lules animals siguin enormement sensibles i fràgils a les forces hidrodinàmiques generades (Joshi i Col., 1996; Chalmers, 1996). En potència aportada al cultiu, aquesta diferència d'intensitat és de l'ordre de 100 vegades: d'una potència mitjana de 10 W/m^3 en cultius cel·lulars es passa a valors de 1000 W/m^3 en cultius microbians (Tramper i Col., 1988; Varley i Birch., 1999).

Tot i que calgui moderar la intensitat de l'agitació i adequar-ne el disseny per minimitzar la presència de forces de cisalla, cal tenir en compte que cal garantir uns mínims per tal que el cultiu es pugui desenvolupar sense limitacions, i que tot el cultiu es trobi en suspensió i sigui homogeni. Així, l'agitació proporcionada al cultiu haurà de ser suficient tant per mantenir en suspensió les cèl·lules i minimitzar l'existència de gradients, com per a que la transferència d'oxigen al cultiu sigui suficientment favorable com per evitar la utilització de sistemes d'aeració per bombolleig, que podrien comportar novament problemes d'estrès cel·lular (Dodge i Hu, 1986; Tramper i Col., 1986; Chalmers, 1994; Zhang i Col., 2010).

5.3.1.1. Elecció del disseny de l'agitador

El primer concepte d'agitació que s'ha treballat, entre d'altres raons per la senzillesa i cost reduït, és la utilització de varetes imantades. Aquestes poden ser introduïdes

directament a cadascun dels minibioreactors, sense cap requeriment de muntatge o ensamblatge addicional.

Tal com s'ha comentat al capítol 4, tot i que s'ha pogut realitzar amb èxit algun cultiu emprant varetes imantades cilíndriques, en la majoria dels casos el creixement ha estat molt reduït, i l'aparició de fragments cel·lulars elevada, mostrant l'existència de estrès per cisalla. Per a estudiar aquest fet, s'han realitzat creixements amb varetes imantades de diferents formes amb la finalitat d'observar si alguna d'aquestes permetia minimitzar l'estrès. Concretament, les geometries dels elements agitadors emprats han estat de prisma triangular, creu, cilindre i cilindre amb anella (veure figura 5.3.1):



Figura 5.3.1. Detall de les configuracions de vareta imantada. D'esquerra a dreta: prisma triangular, creu, cilindre amb anella i cilindre

En l'experiment realitzat, el model cel·lular emprat ha estat una línia d'hibridoma, l'inòcul de 2×10^5 Cèl·l./mL, i la velocitat d'agitació de 200 rpm (s'ha comprovat que permetés mantenir en suspensió les cèl·lules). Per detectar qualsevol problema en l'inòcul efectuat de forma conjunta a tots els minibioreactors s'ha inoculat també un flascó de cultiu com a control de creixement, a banda d'un minibioreactor sense vareta d'agitació.

A la figura 5.3.2 es poden observar les corbes de creixement (cèl·lules viables) obtingudes en aquest experiment.

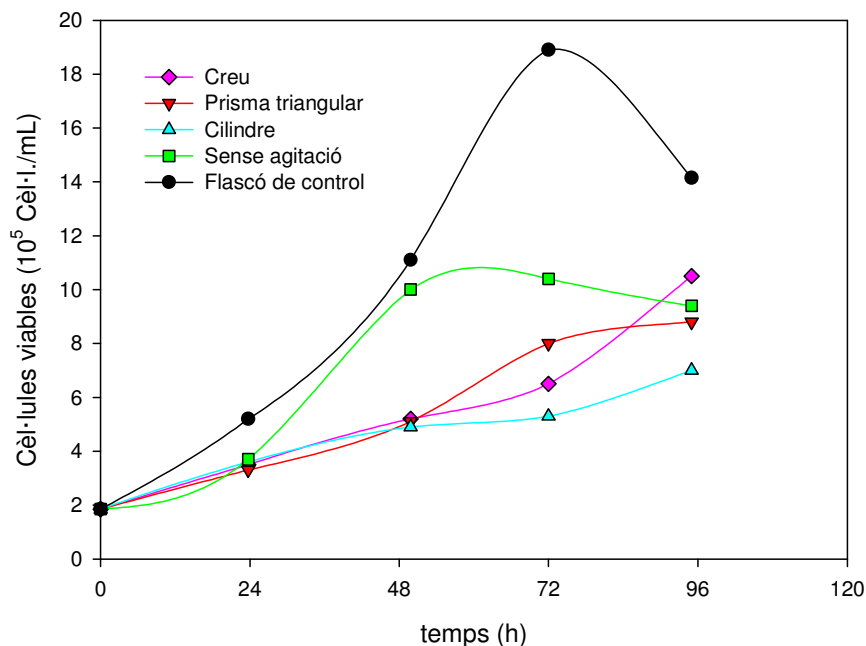


Figura 5.3.2. Evolució de la concentració de cèl·lules viables (X_v) en minibioreactor amb agitació de vareta imantada (200 rpm).

Tal com es pot veure a la figura 5.3.2, sigui quina sigui la geometria de vareta imantada, les velocitats de creixement han estat molt per sota de la del flascó de control, i tot i que ha existit creixement, l'aparició de fragments cel·lulars ha estat notable. Es planteja que entre la vareta i la superfície del fons del minibioreactor existeixi un fregament que provoqui la disrupció de la membrana cel·lular d'un determinat percentatge de les cèl·lules que circulen a través d'aquest espai, portant a cultius amb un comportament notablement diferents als controls sense agitació.

Una altra de les opcions estudiades per evitar el fregament que en els casos anteriors es produïa entre la vareta i la superfície del fons del minibioreactor ha estat l'ús de sistemes formats per un eix vertical on la vareta imantada es trobés inserida (veure representació esquemàtica a la figura 5.3.3), de forma que aquesta es mantingués en suspensió a una determinada alçada del minibioreactor. Amb aquesta base s'han provat diferents geometries, que permetien diferents potències d'agitació i també diferències en la seva manipulació i manufactura (cal tenir en compte que es partia d'imants perforats (Ima, Mollet del Vallès), els quals es sotmetia a un tractament de recobriments amb poliamida (Gewosint, Barcelona) per tal que esdevinguessin inerts enfront dels cultius). Per a més detall sobre els imants o bé els tractaments superficials als que s'ha sotmès aquests, veure el capítol de Materials i Mètodes.

Emprant novament les mateixes condicions experimentals de l'experiment anterior (inòcul d'hibridoma a 2×10^5 Cèl·l./mL, velocitat agitació 200 rpm) s'han realitzat novament corbes de creixement, els resultats de les quals es presenten a la figura 5.3.3.

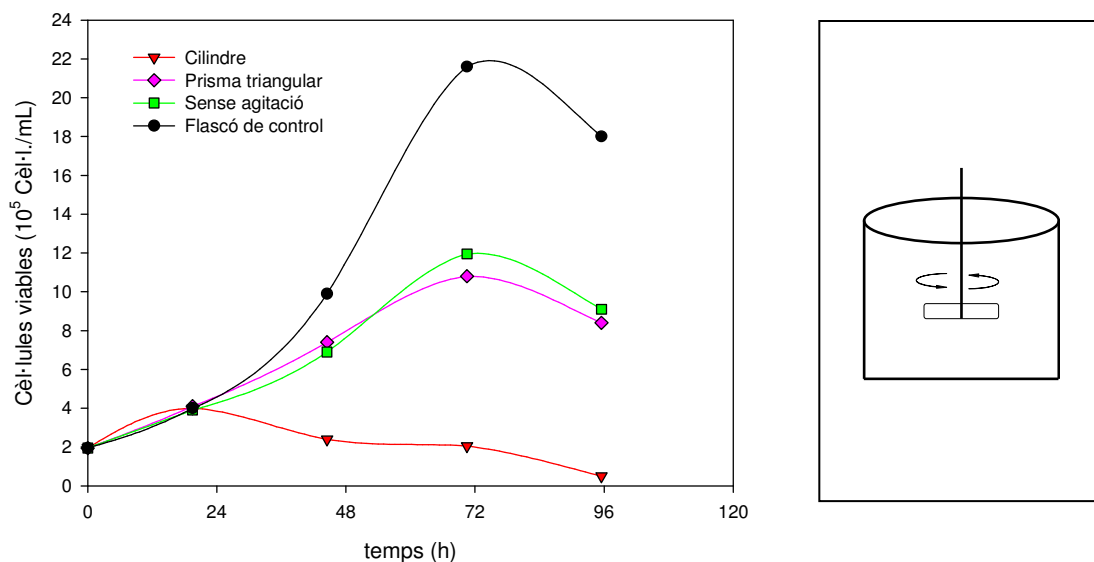


Figura 5.3.3. A l'esquerra, evolució de la concentració de cèl·lules viables (X_v) en minibioreactor amb agitació per eix central fix (200 rpm). A la dreta, representació esquemàtica dels sistemes d'agitació amb eix fix avaluats.

De la figura anterior es pot extreure la conclusió que, amb la modalitat d'agitació amb la vareta imantada situada en un eix central, la vareta en forma de prisma triangular és la que dona millors resultats, tot i que el creixement del cultiu es troba bastant allunyat de la referència del flascó control. L'altra configuració estudiada (cilindre) mostra un creixement inferior tant al flascó control com al minibioreactor no agitad. Havent-se observat novament fragments cel·lulars en ambdues configuracions, l'explicació més plausible de la diferència entre el cultiu control en flascó i els que tenen agitació és el fet que segueixi existint un punt de fregament, concretament entre l'eix central i la vareta imantada, ja que aquesta gira al voltant d'aquest, havent-hi una determinada distància entre ambos per on poden passar i sofrir cisalla les cèl·lules.

A la vista dels resultats anteriors s'ha estimat necessari proposar un disseny on no hi hagi punts de fregament, tal com succeïa amb els anteriors tipus d'agitació. Així doncs, s'ha proposat realitzar proves amb agitació de tipus pendular, consistint aquesta d'un eix d'agitació flexible, al final del qual es situï un imant (veure figura 5.3.4). El tipus d'actuador requerit per a moure aquest conjunt és el mateix que s'havia emprat fins

aquests moments, de manera que aquest canvi de disseny en el plàstic dels minibioreactors no ha requerir cap canvi en el maquinari.



Figura 5.3.4. Esquerra: disseny del pèndol flexible amb una cavitat (a la part inferior) on posicionar i segellar un imant. Dreta: detall de la tapa d'un minibioreactor que incorpora encaixat a un forat situat al seu punt central un pèndol de silicona flexible amb un imant a la seva part inferior.

Així doncs, s'han dissenyat i manufacturat un cert nombre d'unitats del pèndol d'agitació incloent un imant, s'ha realitzat un experiment de creixement amb un minibioreactor incorporant el pèndol a la tapa (tal com es mostra a la figura 5.3.4 dreta), comparant-lo amb un cultiu control en flascó no agitad. Novament l'indòcul (hibridoma) ha estat de 2×10^5 Cèl·l./mL, i la velocitat d'agitació per al minibioreactor ha estat de 200 rpm.

A la figura 5.3.5 es presenten les corbes de creixement obtingudes, on s'observa que els creixements en minibioreactor i en flascó control són molt similars. Aquest resultat, on per primera vegada s'ha observat una similitud elevada entre el creixement observat en ambdós sistemes de cultiu (flascó i minibioreactor agitad) ha portat a l'elecció del sistema d'agitació pendular. Havent realitzat aquesta elecció, a continuació (apartat 5.3.1.2) s'aprofundirà en l'estudi del sistema d'agitació proposat, augmentant el nombre de repeticions dels cultius realitzats, avaluant les diferències de creixement en funció de la velocitat, establint els límits pel que fa a la capacitat de mantenir les cèl·lules en suspensió, i caracteritzant-ne el temps de mescla i la capacitat de transferència d'oxigen.

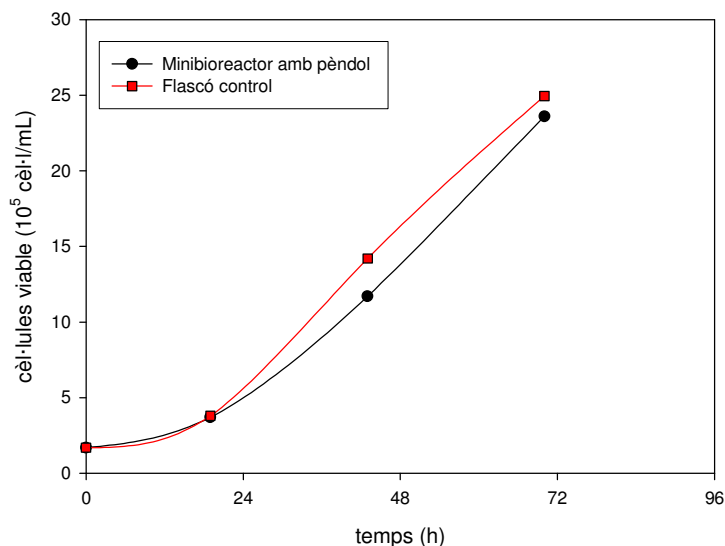


Figura 5.3.5. Comparació de les corbes de creixement en un minibioreactor amb un sistema d'agitació pendular i en un flascó de control.

5.3.1.2. Estudis hidrodinàmics i d'estrès derivat de les condicions hidrodinàmiques

Tal com s'acaba de comentar, en aquest apartat s'estudiaran diferents característiques funcionals del sistema per tal d'aprofundir en el seu coneixement. En concret, els diferents punts que s'avaluran són els següents:

- Estudi de la sedimentació.
- Estudi del temps de mescla.
- Estudi de la transferència d'oxigen.
- Estudi del creixement cel·lular a diferents velocitats d'agitació.

5.3.1.2.1. Estudi de la sedimentació

En el primer dels punts d'estudi de la hidrodinàmica del sistema s'ha estudiat l'existència de sedimentació a diferents velocitats d'agitació (50, 100, 150, 200, 250 i 300 rpm). Més enllà de 300 rpm el moviment dels pèndols esdevenia més erràtic, de manera que no s'ha estudiat agitacions majors a aquesta. D'altra banda, per sota de 50 rpm el moviment del fluid provocat pel gir del pèndol era manifestament massa petit (ràpidament es veia sedimentació de les suspensions cel·lulars), de manera que tampoc s'ha estudiat velocitats per sota d'aquesta. Per a l'experimentació s'ha treballat amb suspensions cel·lulars per sobre de 6×10^5 cèl·lules viables/mL. En cadascun dels casos s'ha omplert el minibioreactor amb 12 mL de la suspensió cel·lular d'hibridomes, s'ha

arrencat l'agitació a la velocitat consignada i s'ha recomptat les cèl·lules en suspensió a l'instant inicial i després de 3 h de mantenir-les a l'agitació estudiada.

A la figura 5.3.6 es mostren els percentatges de cèl·lules que quedaven en suspensió després de tres hores d'haver iniciat l'experiment, referides a les mesures inicialment. Tal com s'observa a la figura, per sota de 200 rpm la sedimentació augmenta exponencialment, mentre que per sobre d'aquest valor roman en percentatges molt estables i pròxims a zero.

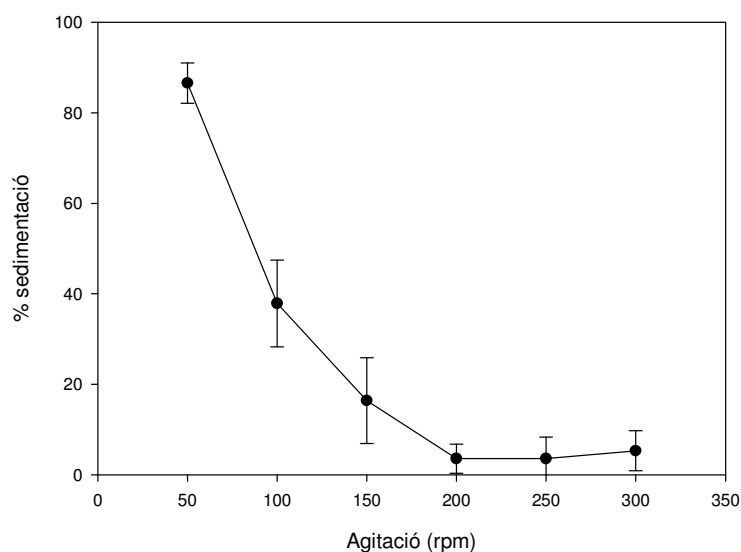


Figura 5.3.6. Percentatge de cèl·lules sedimentades (hibridomes) respecte el total de cèl·lules presents al minibioreactor. El sistema d'agitació emprat és el pèndol flexible presentat a la figura 5.3.4.

5.3.1.2.2. Estudi del temps de mescla

En el segon dels punts d'estudi de la hidrodinàmica del sistema, s'ha avaluat el temps de mescla a diferents agitacions. Cal tenir en compte que en un reactor agitat de volum reduït el temps de mescla és habitualment ràpid, però de totes maneres s'ha cregut interessant realitzar l'estudi per augmentar la caracterització del sistema.

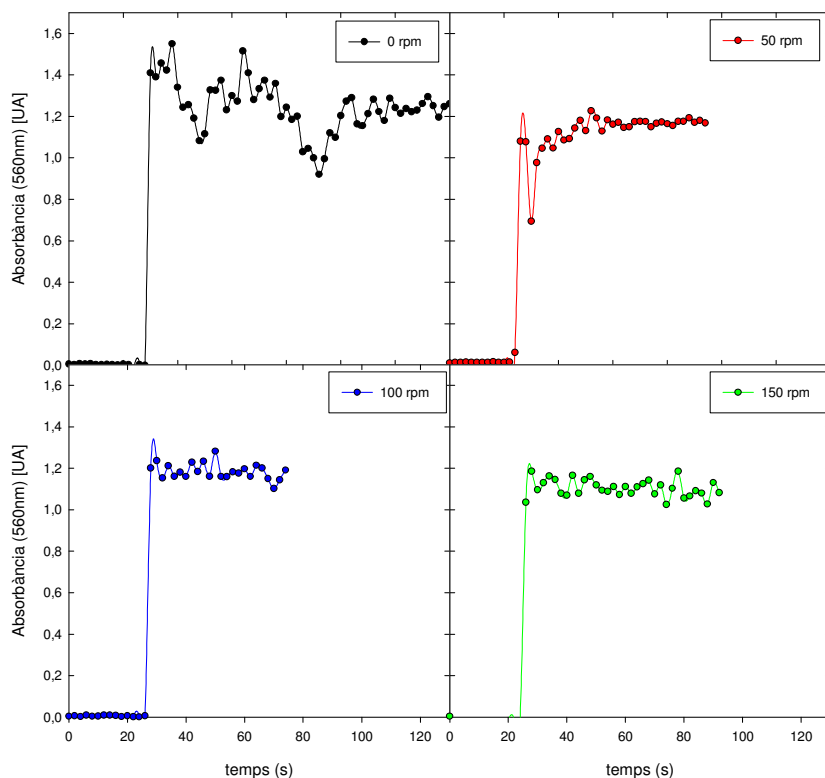
En aquest cas, el muntatge experimental emprat novament ha contemplat un minibioreactor amb 12 mL de líquid (en aquest cas aigua destil·lada), connectat al sistema de mesura d'absorbància de l'equip d'un únic minibioreactor. Gràcies a aquest sistema de mesura, al afegir un pols de traçador, s'ha pogut seguir l'evolució de l'absorbància i mesurar el temps necessari per assolir una estabilització de la mesura.

Com a traçador s'ha emprat roig de fenol (a una concentració final de 15 mg/L), que al ser un indicador de pH (amb dues formes mesurables), per tal d'assegurar que únicament es mesurava una de les dues formes (la bàsica), en tot moment el pH s'ha mantingut en valors al voltant de $\text{pH} = 11$.

Per a calcular el temps de mescla (temps necessari per assolir una distribució uniforme del colorant i, per tant, una mesura d'absorbància constant) s'ha considerat que la mescla uniforme s'assolia una vegada les variacions d'absorbància eren menors del 10 % respecte el valor mig d'estabilització de la mesura. Tot i que aquest és un valor relativament elevat, ha estat fixat degut a que al reduir el filtrat del senyal del mesurador d'absorbància (per tal d'augmentar el nombre de mesures obtingudes per unitat de temps), també augmentava el soroll de la mesura.

A la figura 5.3.7 es mostra una representació gràfica de l'evolució de l'absorbància al afegir un pols de traçador, juntament amb una taula per a tenir major detall dels valors obtinguts. Per a una millor lectura de les gràfiques, no es presenten les corbes mesurades a partir de 150 rpm, ja que són totes molt similars a aquesta. Així, les dades de temps de mescla a partir d'aquesta velocitat d'agitació es presenten únicament a la taula. Si bé la mesura d'absorbància es considera contínua respecte el temps habitual de cultiu, respecte els temps de mescla mesurats això no és així, de manera que es representa indicant els punts on s'ha realitzat les mesures puntuals (cada 2 segons),

Els resultats mostren que, sense agitació, o bé a 50 rpm, es requereix un cert temps per assolir estabilitat en la mesura, i per tant una mescla homogènia ($t_{0 \text{ rpm}} > 100 \text{ s}$; $t_{50 \text{ rpm}} = 12 \text{ s}$). D'altra banda, a 100 rpm la mescla és pràcticament instantània ja que pren valor d'aproximadament 2 segons, que és precisament la freqüència de mesura. Tot i que no es pot precisar més quins són els valors del temps de resposta degut precisament a aquest fet, es pot donar com a bo que els valors existents per sobre de 100 rpm siguin iguals o menors a 2 segons.



Agitació (rpm)	Temps de mescla (s)
0	>100
50	12
100	2
150	2
200	2
300	2

Figura 5.3.7. A l'esquerra, mesura de l'absorbància de la forma bàsica del traçador (roig de fenol), quan se n'afegeix un pols a un minibioreactor amb aigua destil·lada, emprant velocitats d'agitació de 0, 50, 100, i 150 rpm. A la dreta, dades del temps de mescla de 0 a 300 rpm.

5.3.1.2.3. Estudi de la transferència d'oxigen

En el tercer dels punts d'estudi de la hidrodinàmica del sistema, s'ha avaluat el coeficient de transferència d'oxigen (K_La) en funció de la velocitat d'agitació.

Per tal de calcular-ne els valors, s'ha emprat el sistema de sis minibioreactors, amb una placa de sis minibioreactors per cadascuna de les velocitats d'agitació estudiades. Així doncs, cadascun dels càlculs prové de la mitjana de sis minibioreactors.

El procediment experimental ha contemplat que cadascun dels minibioreactors s'ompli amb 12 mL d'aigua destil·lada (el que suposa una relació alçada líquid / àrea superficial de $0,24 \text{ cm/cm}^2$), i que el sistema s'atemperi a 37°C (per tal d'obtenir dades representatives respecte la temperatura habitual de cultiu) una vegada situada al seu interior la placa de minibioreactors. A continuació s'ha eliminat l'oxigen present a la solució mitjançant la circulació d'un cabal de nitrogen. Una vegada estabilitzada la concentració al voltant del 0% d'oxigen dissolt, s'ha passat a circular un cabal d'aire continu de 500 mL/min (mesurat a condicions normals) repartit entre els sis

minibioreactors. Les dades obtingudes del seguiment de l'evolució de la concentració d'oxigen dissolt des del moment d'aquest canvi d'aeració fins a l'estabilització de la concentració d'oxigen al voltant de valors del 100% de saturació d'aire tindran un perfil com el que es mostra a la figura 5.3.8.

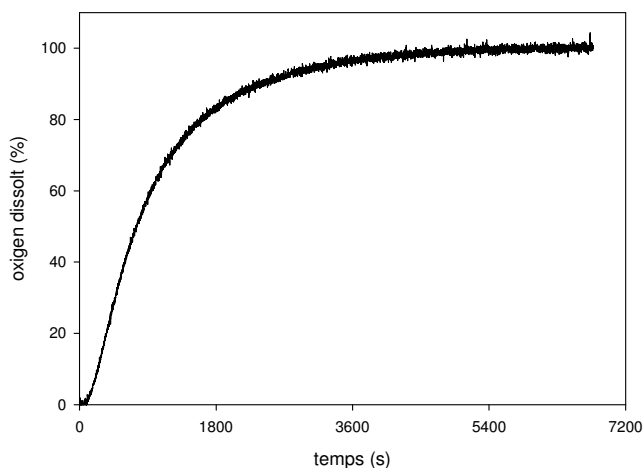


Figura 5.3.8. Exemple de l'evolució de la concentració d'oxigen dissolt des de l'instant en què el contingut del minibioreactor es troba lliure d'oxigen dissolt (0% de saturació) fins que, degut al pas d'un cabal d'aire, la concentració assoleix progressivament el valor de 100% de saturació d'aire.

Per tal de calcular el valor del coeficient de transferència ($K_L a$), cal realitzar un ajust de les dades experimentals obtingudes, que tindran un perfil similar al de la figura 5.3.8, amb l'equació que descriurà la corba, que depèn del $K_L a$.

Per obtenir l'equació que descriu aquesta corba es parteix del balanç de matèria per a l'oxigen dissolt, seguint un desenvolupament com es presenta a continuació:

Partint de l'equació inicial del balanç de matèria,

$$A = (E-S) + G \quad \text{Eq. 5.3.1}$$

Al no haver-hi consum, el terme de generació no s'aplica i l'equació es pot expressar de la següent manera:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = K_L a ([O_2^*] - [O_2]) \quad \text{Eq. 5.3.2}$$

on:

$K_L a$ és el coeficient de transferència d'oxigen dissolt (h^{-1})

$[O_2^*]$ és la concentració d'oxigen en equilibri amb l'atmosfera del capçal del minibioreactor (mmol/L).

$[O_2]$ és la concentració d'oxigen en el medi del minibioreactor (mmol/L)

Pel càlcul del coeficient de transferència de matèria , l'equació s'integra:

$$\ln\left(1 - \frac{[O_2](t)}{[O_2^*]}\right) = -K_L a t \quad \text{Eq. 5.3.3}$$

Cal tenir en compte que per aplicar directament l'equació anterior caldria tenir un sistema de mesura de la concentració d'oxigen amb una dinàmica molt ràpida. En el cas del sistema de mesura emprat, el temps de resposta (τ), es va determinar que era de menor a 1 s. Tot i que aquest temps és prou ràpid per poder considerar menyspreable la dinàmica de la sonda enfront la dinàmica de variació de l'oxigen dissolt, es pot incorporar a l'equació 5.3.3, l'equació de la dinàmica de la sonda, que es sol representar amb una equació de primer ordre, com la que es mostra a continuació:

$$\frac{d[O_{2,mes}]}{dt} = \frac{([O_2] - [O_{2,mes}])}{\tau} \quad \text{Eq 5.3.4}$$

on:

$[O_{2,mes}]$ és la concentració mesurada per la sonda
 $[O_2]$ és la concentració real.

Combinant aquesta equació amb la del balanç (5.3.3), s'arriba a la següent expressió:

$$[O_{2,mes}] = [O_2^*] + \frac{[O_2^*] - [O_{2,0}]}{1 - \tau \cdot K_L a} \left[\tau \cdot k_L a \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) - \exp(-K_L a t) \right] \quad \text{Eq. 5.3.5}$$

on $[O_{2,0}]$ és el valor de la concentració d'oxigen en el moment en què, partint d'una situació on s'havia eliminat l'oxigen dissolt present en el medi, s'inicia el pas d'un cabal d'aire comprimit pel capçal dels minibioreactors.

Per a poder treballar amb concentracions d'oxigen dissolt en % referides a la saturació d'aire (que és com s'obtenen del sistema de mesura d'oxigen) enlloc de mmols/L, a la fórmula es poden aplicar les concentracions en percentatge de saturació multiplicades per 0,00209 (constant per passar de unitats de saturació d'aire en % a mmol/L, en aigua destil·lada a 37°C).

Fent un procés iteratiu variant el valor de $K_L a$ per tal de minimitzar l'error entre la corba experimental i la definida a partir de l'equació 5.3.5, es pot trobar el valor del $K_L a$ per a cadascun dels casos experimentals avaluats.

A la figura 5.3.9 es presenten els valors de K_{La} obtinguts a partir dels ajustos de la corba definida per l'equació 5.3.5 a les corbes experimentals per a agitacions de 50, 100, 150, 200, 250 i 300 rpm.

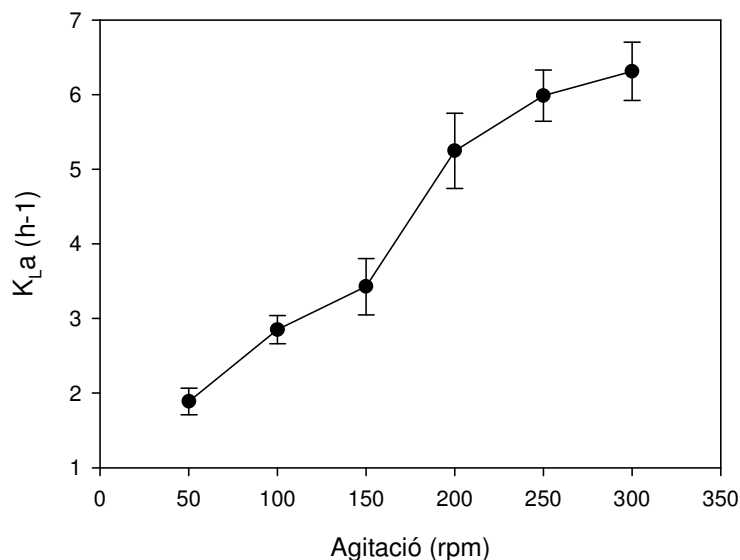


Figura 5.3.9. Coeficient de transferència d'oxigen (K_{La}) en funció de la velocitat d'agitació. El sistema d'agitació emprat és el pèndol presentat a la figura 5.3.4.

La discussió sobre els valors de K_{La} és especialment rellevant en els bioreactors, ja que l'aportació d'oxigen esdevé una de les limitacions més importants per assolir concentracions cel·lulars elevades (Ozturk i Hu, 2006) i per tant, es dóna una elevada importància a la capacitat d'aeració dels cultius cel·lulars. No obstant, cal tenir en compte que el sistema de cultiu en desenvolupament no té la finalitat d'arribar a concentracions cel·lulars elevades sinó permetre l'optimització de paràmetres i medis, establint les condicions on es pot obtenir el millor creixement. De totes maneres, és interessant poder realitzar la comparació entre els valors de K_{La} obtinguts i els valors bibliogràfics habituals i analitzar la situació del sistema desenvolupat envers altres bioreactors emprats per al cultiu de cèl·lules animals.

A la taula 5.3.1 es presenten valors de K_{La} obtinguts en diferents estudis:

Volum reactor /volum treball (L)	Velocitat agitació (rpm)	Sistema aeració	K_{La} (h^{-1})	Referència
1,0/0,5	50	Membrana silicona	4,29	Kyung i Col. 1994
0,75/0,5	60	Membrana silicona	4,58	Zhou i Col. 1995
1,0/0,5	60-100	Capçal	1,56-2,33	Sen i Col., 2001
6,0/3,0	50	Capçal	0,79	Dorresteyn i Col. 1996
0,05/0,04	100	Spinner flask aerat per capçal	2,5	Diao i Col., 2008

Taula 5.3.1. Valors de K_{La} bibliogràfics per a spinner flasks (flascons agitats), bioreactors amb aeració per capçal o bé amb membrana de silicona permeable a gasos.

Comparant els valors anteriors amb els obtinguts experimentalment dins el rang en el qual les cèl·lules es mantenen en suspensió (200-300 rpm), $5,25 \pm 0,51 < K_{La} < 6,31 \pm 0,39$, es comprova que els minibioreactors desenvolupats tenen coeficients de transferència d'oxigen de l'ordre dels presents en minibioreactors aerats per espai de caps i amb membrana de silicona permeable a gasos. Per tant, el sistema desenvolupat és, des d'aquest punt de vista, comparable als sistemes convencionals. Cal tenir en compte però, que tot i que els cultius de cèl·lules animals acostumen a sofrir estrès quan en presència de bombolleig, hi ha casos on s'empren sistemes d'aeració per bombolleig (*spargers*), per tal d'augmentar el K_{La} i les concentracions cel·lulars màximes assolibles.

Per a tenir una estimació de la concentració cel·lular que es podrà mantenir en cultiu sense limitació d'oxigen dissolt, es pot realitzar un càlcul emprant un balanç de matèria per a l'oxigen, considerant un estat on no hi ha acumulació, és a dir, on tot l'oxigen que es transfereix cap al cultiu és consumit:

$$G = (S - E) \quad \text{Eq. 5.3.6}$$

$$q_{O_2} \times Xv = 0,00194 \times K_{La} ([O_2^*] - [O_2]) \quad \text{Eq. 5.3.7}$$

on:

q_{O_2} = consum específic d'oxigen del cultiu (mmols/(L×h))

Xv = concentració de cèl·lules viables presents en el cultiu (10^6 cèl·l/mL)

0,00194 = factor de conversió per passar de unitats de saturació d'aire en % a mmols/L (per a medi de cultiu a 37°C)

K_{La} = valors del coeficient de transferència calculats (h^{-1})

$[O_2^*]$ = concentració d'oxigen amb equilibri amb el capçal (%)

$[O_2]$ = concentració d'oxigen dissolt present en el medi de cultiu (%)

Si es considera que la concentració d'oxigen haurà d'estar com a mínim al 20% per no tenir limitacions, i s'apliquen a la fórmula anterior valors de K_{La} mesurats, es poden calcular les concentracions de cèl·lules que es podran mantenir en cultiu en funció del consum específic de determinades línies cel·lulars. A continuació es mostren els valors obtinguts:

K_{La} (h^{-1})	q_{O_2} ($nmol/10^6$ Cèl·l. x h)	Concentració cel·lular possible (10^6 cèl·l. /mL)
5,25	120 (hibridoma, Gámez, 2000)	6,78
	310 (CHO, Jorjani i Ozturk, 1999)	2,63
	270 (BHK, Jorjani i Ozturk, 1999)	3,02
6,31	120 (hibridoma, Gámez 2000)	8,16
	310 (CHO, Jorjani i Ozturk, 1999)	3,16
	270 (BHK, Jorjani i Ozturk, 1999)	3,63

Taula 5.3.2. Càlcul de la concentració cel·lular que es pot mantenir en funció del coeficient de transferència d'oxigen.

Les concentracions que es poden mantenir estan entre $2,63 \times 10^6$ i $8,16 \times 10^6$ cèl·l./mL, concentracions lleugerament més elevades que les que es podria mantenir amb els bioreactors presentats a la taula 5.3.1, i més elevades també que les que es troben habitualment en ressembres emprant flascons de cultiu o plaques multipou (Sanfeliu, 1995), sistemes habitualment emprats per a realitzar optimitzacions. De totes maneres, donat un hipotètic cas on s'assolís una limitació d'oxigen, hi hauria l'opció de canviar l'aire comprimit (aire-5% CO_2) amb el qual s'alimenta el sistema a oxigen pur (oxigen-5% CO_2), que teòricament permetria incrementar fins a 5 vegades més la concentració cel·lular si no existissin altres limitacions.

5.3.1.2.4. Estudi del creixement a diferents velocitats d'agitació

En aquesta nova sèrie experimental es proposa estudiar les característiques del creixement cel·lular, emprant muntatges de minibioreactors individuals amb una agitació per pèndol flexible a diferents velocitats d'agitació (200, 250, 300 rpm). Novament els inòculs emprats han estat d'aproximadament 2×10^5 Cèl·l./mL (d'una línia cel·lular d'hibridoma), i el volum de treball per als minibioreactors, de 12 mL.

En aquest cas no s'han estudiat les velocitats d'agitació menors de 200 rpm, ja que anteriorment s'ha determinat que per sota d'aquest valor hi havia poca homogeneïtat al cultiu.

A la figura 5.3.10 es mostren les corbes de creixement obtingudes a diferents agitacions. Tal com es pot observar, no hi ha diferències significatives entre les corbes, de manera que es podrà treballar entre 200 i 300 rpm sense que existeixin problemes d'estrès que afectin les corbes de creixement dels cultius. Addicionalment, les observacions realitzades al microscopi han corroborat aquesta afirmació.

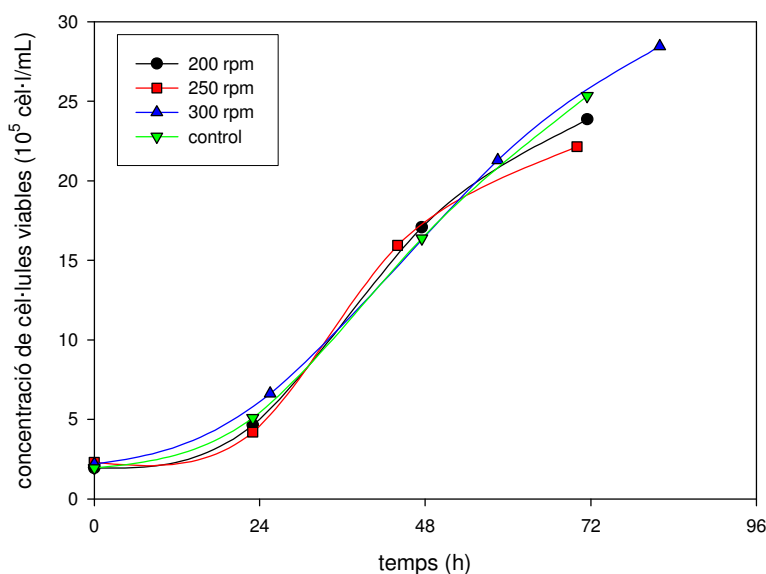


Figura 5.3.10. Creixement d'hibridomes a diferents velocitats d'agitació, en comparació amb un flascó de control. El sistema d'agitació emprat és el pèndol flexible presentat a la figura 5.3.5. Cadascuna de les corbes prové d'un duplicat.

Amb aquest experiment d'estudi de les diferències de creixement a les diferents agitacions es donen per conclusos els estudis de la hidrodinàmica del sistema. Resumint-ne els resultats, es pot comentar que per evitar sedimentació de cèl·lules animals (tot i que cal tenir en compte que només s'ha emprat una única línia cel·lular com a model d'estudi), caldrà treballar a velocitats de 200 rpm o majors. D'altra banda, els coeficients de transferència d'oxigen són suficients per mantenir concentracions cel·lulars habituals en aquest tipus de cultius, existint un marge prou ampli entre l'indòcul i les concentracions cel·lulars màximes que permetrà realitzar els estudis per als quals ha estat concebut el sistema de minibioreactors en desenvolupament. Finalment també es pot comentar que a les velocitats d'agitació amb què l'equip podrà treballar (entre 200 i 300 rpm) no s'han observat fenòmens d'estrès que afectin les corbes de

creixement (novament, cal tenir en compte que només s'ha emprat una única línia cel·lular com a model d'estudi).

5.3.2. Adaptació d'un sistema de mesura del consum d'oxigen

A banda de la mesura l'oxigen dissolt i el pH com a variables físico-químiques, i la concentració cel·lular com a mesura de creixement, és de gran interès per als productes desenvolupats la capacitat de seguir en línia l'activitat del cultiu mitjançant indicadors d'activitat biològica. Així, una variació del pH indica de forma indirecta l'activitat del metabolisme central de les cèl·lules, ja que el consum de la glucosa present en el medi provoca la producció d'àcids (en cèl·lules animals, bàsicament es produeix àcid làctic, en una proporció al voltant de 1-2 mols d'àcid làctic produïts per mol de glucosa consumida). D'altra banda, un increment en el consum d'oxigen també es pot correlacionar amb el l'activitat metabòlica del cultiu. Aquesta mesura permet, en temps real (o quasi-real, en el cas que no es puguin realitzar mesures amb una freqüència elevada), detectar qualsevol anomalia que sofreixi el cultiu, ja que al veure's afectat aquest redueix el seu consum d'oxigen de forma pràcticament immediata, a diferència del que passa amb la mesura òptica de concentració cel·lular, que acumula un retard considerable, ja que fins que els possibles canvis en el comportament del cultiu es tradueixen en una variació de la concentració cel·lular ha de transcórrer una certa finestra de temps.

L'estratègia de mesura seleccionada està basada en la tècnica dinàmica descrita prèviament (Dorresteyn i Col., 1996; Gámez, 2000). Per a la realització d'aquestes mesures de consum d'oxigen (*Oxygen Uptake Rate*, OUR), es parteix d'una determinada consigna d'oxigen dissolt a la qual estava creixent el cultiu. En el moment en què es desitja iniciar la mesura, s'atura l'aeració i a continuació s'obre el pas a un corrent de nitrogen, que seguirà fins que la concentració d'oxigen al minibioreactor baixi fins a una concentració d'oxigen dissolt reduïda (al voltant del 30%). En aquest punt es reactiva l'aeració i es realitza el càlcul de la OUR amb el perfil de l'oxigen dissolt enfront el temps, que es pot caracteritzar amb l'equació:

OUR = consum per part del cultiu – transferència d'oxigen cap al capçal

$$OUR = 0,00194 \times \left[\frac{[O_2](t_0) - [O_2](t_f)}{t_f - t_0} + \frac{\int_{t_0}^{t_f} (-K_{des} \times O_2(t)) dt}{t_f - t_0} \right] \quad \text{Eq. 5.3.8}$$

on:

$[O_2]$ = concentració d'oxigen dissolt en el bioreactor (% saturació)

t = temps (s) (subíndexs 0,f referits a temps inicial i final de càlcul de la OUR, respectivament)

OUR = velocitat de consum d'oxigen (mmols O_2 /(L·h))

0,00194 = constant per passar d'unitats de saturació d'aire a mmols/L (per a medi de cultiu a 37°C)

K_{des} = coeficient de desorció de l'oxigen en el medi del bioreactor (h^{-1}) (paràmetre anàleg al K_{La} , referit a un sentit concret de la transferència de matèria: desorció des del medi a la fase gas)

5.3.2.1. Determinació de l'estratègia de pas de nitrogen

Si bé en un bioreactor convencional on s'apliqui el mètode dinàmic per a la mesura de la OUR, el pas de nitrogen per capçal que haurà de desorbir progressivament l'oxigen present en el medi, es realitza de forma contínua, en el sistema de minibioreactors en desenvolupament aquesta estratègia presenta dificultats. Bàsicament, el principal inconvenient és la incapacitat d'assegurar el pas del mateix cabal de nitrogen pels sis minibioreactors si no es disposa de cabalímetres màssecs, i no es desitja afegir aquest component als minibioreactors per tal de no augmentar la seva complexitat i preu. Així, per assegurar la correcta funcionalitat de les mesures s'han realitzat proves en un únic minibioreactor intentant fer circular el gas de forma discontinua per a assegurar el pas del mateix cabal per cada minibioreactor en l'equip final, en base a fer circular el gas de forma alternativa pels sis minibioreactors.

Per a avaluar la viabilitat de les diferents estratègies de circulació de nitrogen emprades, s'ha calculat com a paràmetre per mesurar les caigudes de concentració d'oxigen el coeficient de desorció (K_{des}), un paràmetre anàleg al K_{La} emprat en aquest mateix capítol, però referit a corbes de caiguda d'oxigen, enlloc de corbes de reaeració on la concentració d'aquesta substància augmenta. Per a calcular K_{des} a partir de les corbes de caiguda de concentració d'oxigen es pot emprar com a equació per a descriure el sistema la Eq. 5.3.9:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = K_{des} ([O_2^*] - [O_2]) \quad \text{Eq. 5.3.9}$$

On en aquest cas O_2^* , la concentració d'equilibri amb l'atmosfera del capçal serà zero, de manera que l'expressió quedarà de la següent manera:

$$\frac{d[O_2]}{[O_2]} = K_{des} dt \quad \text{Eq. 5.3.10}$$

Que integrada, serà:

$$\ln[O_2] = \ln[O_2](t_0) - K_{des} t \quad \text{Eq. 5.3.11}$$

El primer paràmetre que s'ha determinat ha estat el cabal necessari per eliminar tot l'oxigen present a l'espai de caps del minibioreactor, necessari per tal d'aconseguir desorbir el nitrogen present al minibioreactor. Així, partint de minibioreactors amb concentracions d'oxigen entre un 50 i un 60% de saturació s'han aplicat cabals de nitrogen de 0,1, 0,3 i 0,5 slpm, obtenint-se els resultats que es mostren a la figura 5.3.11.

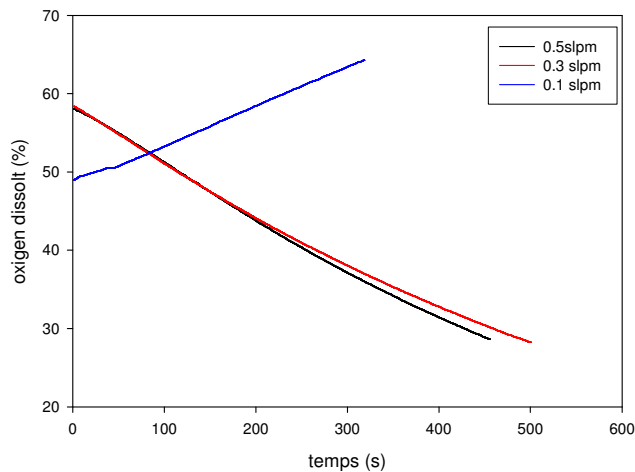
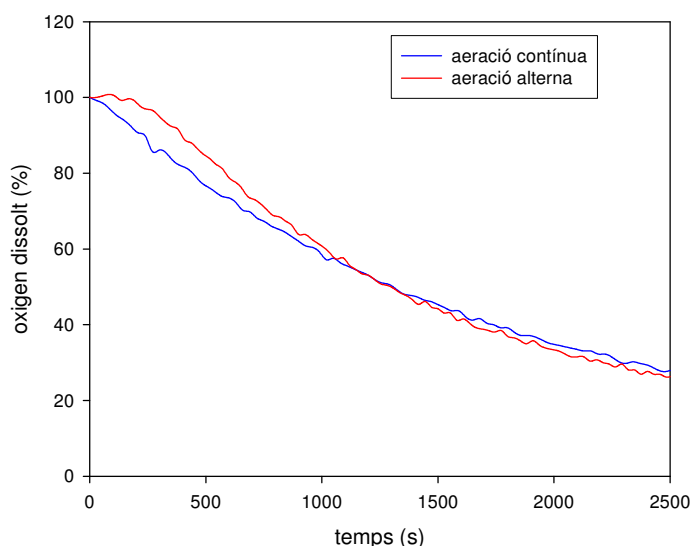


Figura 5.3.11. Comparació de les corbes de caiguda d'oxigen dissolt emprant diferents cabals de nitrogen per l'espai de caps. Proves realitzades utilitzant el sistema d'un únic minibioreactor.

La figura anterior mostra que si bé amb un cabal de 0,1 slpm no és possible eliminar l'oxigen dissolt present en la solució, amb cabals de 0,3 slpm o majors això sí que és possible. Per a tenir un major grau de seguretat, es selecciona treballar amb un cabal de 0,4 slpm, que assegura la possibilitat de realitzar caigudes de concentració d'oxigen en els trams desitjats (entre el 60 i 30% de saturació, aproximadament).

Seguidament, i donada la dificultat per garantir cabals idèntics als diferents minibioreactors si totes les electrovàlvules estan obertes simultàniament, s’ha estudiat la possibilitat d’alimentar nitrogen de forma alterna en cada minibioreactor individual. L’aproximació experimental emprada per a estudiar aquesta possibilitat ha consistit en partir d’una solució saturada d’aire, i obrir successivament les vàlvules corresponents a l’entrada de nitrogen de cada minibioreactor, tenint cadascuna 4 segons d’obertura (amb un cabal de 0,4 slpm) sobre un cicle total de 24 segons. Els cicles han estat encadenats sense cap temps d’espera entre un i el següent.

A la figura 5.3.12 es mostren les corbes de caiguda obtingudes, partint d’una solució saturada d’aire, amb totes les electrovàlvules obertes simultàniament o bé amb el mètode de circulació de nitrogen seqüencial comentat al paràgraf anterior. Per tal de quantificar les diferències entre les corbes, juntament amb la gràfica es mostra una taula on es presenten els valors de K_{des} , ajustats emprant l’equació 5.3.8.



Estratègia circulació nitrogen	$K_{des} (h^{-1})$
contínua	1,82
alterna	2,06

Figura 5.3.12. Comparació de les corbes de caiguda d’oxigen dissolt, obtingudes amb totes les electrovàlvules obertes simultàniament o bé amb circulació de nitrogen alterna (4 segons d’obertura per a cadascuna de les vàlvules sobre un cicle de 24 segons). Proves realitzades utilitzant el sistema de sis minibioreactors.

A la figura s’observen similituds elevades entre ambdues estratègies, de manera que es confirma la possibilitat d’emprar l’estratègia de circulació de nitrogen alterna, que és la serà utilitzada doncs, per a metodologia de mesura de OUR.

5.3.2.2. Repetibilitat i estabilitat de la mesura

El darrer pas realitzat per a validar la funcionalitat tant de l'estratègia seleccionada per a realitzar la metodologia aplicada tant per al càlcul del coeficient de desorció com per a la mesura de la OUR ha consistit en fer operar simultàniament els sis minibioreactors del sistema, sense cèl·lules, avaluant les diferències existents en els càlculs de K_{des} entre reactors i també l'estabilitat en el temps del càlcul de la OUR, que donarà una primera indicació de la sensibilitat de la mesura.

Per avaluar les diferències de K_{des} entre reactors s'ha emprat una placa de sis minibioreactors, cadascun d'ells contenint 12 mL d'aigua destil·lada, s'ha situat en el sistema de cultiu, s'ha atemperat a 37°C, s'ha aerat fins assolir la concentració de saturació d'aire (100%), i a partir d'un determinat instant s'ha iniciat el pas altern de nitrogen amb la metodologia i cabals prèviament establerts a l'apartat anterior.

A la figura 5.3.13 es presenten les corbes de caiguda d'oxigen dissolt dels sis minibioreactors quan s'aplica el pas altern d'un cabal de nitrogen de 0,4 slpm, juntament amb una taula que quantifica les K_{des} obtingudes. Tot i que les corbes de caiguda presenten una similitud força elevada, existeix una certa dispersió entre els canals, que quan es trasllada al càlcul del coeficient de desorció implica una desviació del 9,24% respecte el valor de K_{des} mitjà.

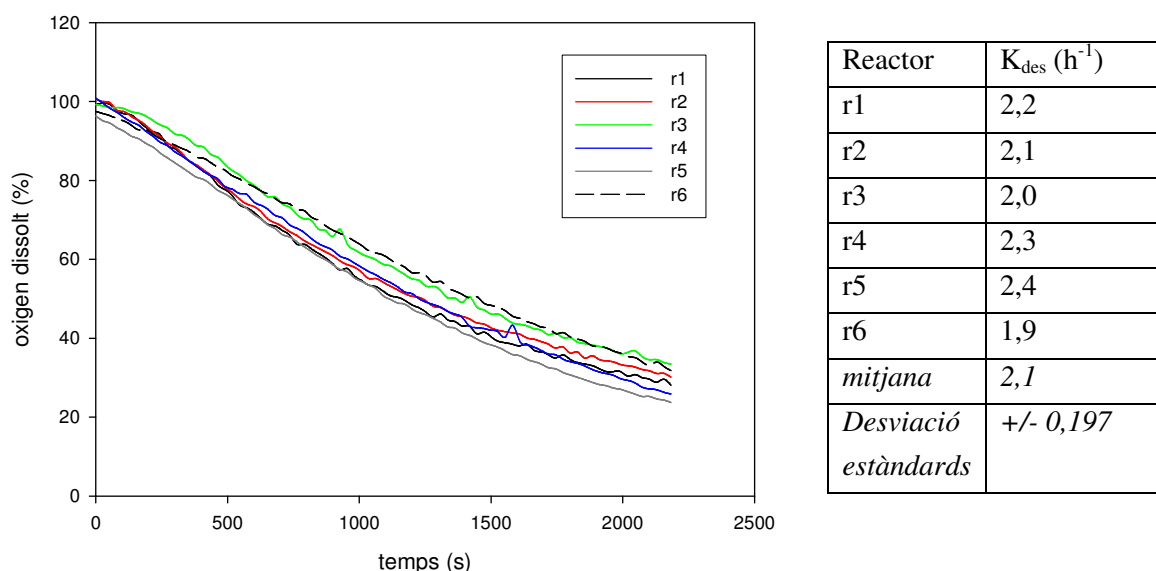
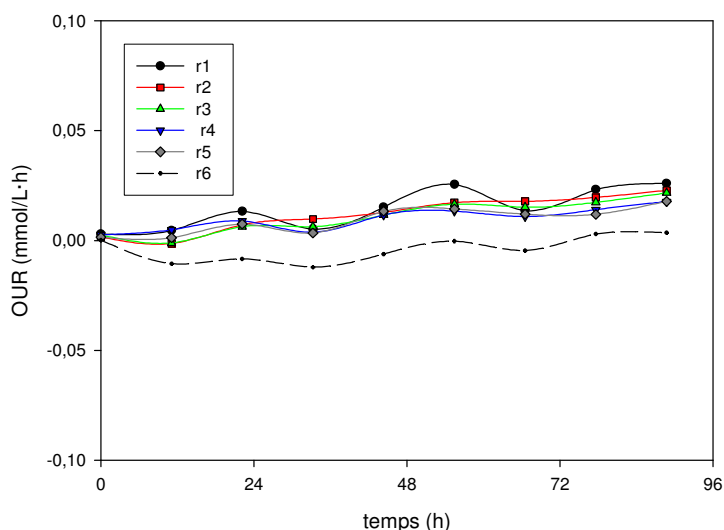


Figura 5.3.13. Esquerra, comparació de les corbes de caiguda obtingudes en cadascun dels minibioreactors del sistema de sis minibioreactors en una mateixa execució de la metodologia dinàmica per al càlcul de la K_{des} . Dreta, K_{des} calculada en cadascun dels sis minibioreactors, valor mitjà i dispersió.

Tot i que existeixi una certa dispersió entre les K_{des} de cada minibioreactor, aquesta no afectarà directament a la mesura de OUR sempre que a l'inici de cada cultiu que es desitgi realitzar es faci una mesura de K_{des} per a cadascun dels minibioreactors, que sigui emprada posteriorment per als càlculs de OUR.

A continuació, per avaluar la repetibilitat i estabilitat de la mesura de OUR s'ha realitzat un experiment, novament amb sis minibioreactors, on una vegada atemperat el sistema a 37°C, s'ha determinat la K_{des} per a cadascun dels reactors, i seguidament s'ha realitzat mesures de OUR cada 11 h, durant un total d'aproximadament quatre dies. En aquest cas els minibioreactors contenien un volum inicial de 13 mL d'aigua destil·lada (a l'augmentar el temps experimental, s'augmenta un mL per evitar problemes derivats de l'evaporació).

A la figura 5.3.14 es presenta l'evolució de la OUR durant els aproximadament quatre dies d'experimentació. Els resultats mostren un certa dispersió entre la mesura dels diferents minibioreactors, suposant de mitjana una desviació estàndard de 0,0068 mmol/(L×h). També es pot observar una deriva progressiva, que de mitjana suposa 0,0049 mmol/(L×h) per dia. Aquesta deriva es pot relacionar amb l'evaporació que s'ha observat durant el cultiu, que ha suposat 1 mL de pèrdua de volum, que correspon a un 15% de variació del coeficient de transferència i que si aquest nou coeficient de transferència és emprat per a recalcular els valors de OUR per a la mesura final s'obtenen valors molt pròxims a zero, tenint de mitjana 0,003 mmol/(L×h).



Temps (h)	Desviació estàndard (mmol/(L×h))
0	0,001
11	0,006
22	0,007
33	0,008
44	0,008
55	0,008
66	0,008
77	0,007
88	0,008

Figura 5.3.14. A l'esquerra, evolució de la mesura de OUR (mmol/(L×h)) en cadascun dels minibioreactors operant simultàniament en el sistema de sis minibioreactors. A la dreta, valors de la desviació estàndard entre minibioreactors en cada mesura.

Tot i l'existència d'una certa desviació entre minibioreactors, es pot considerar que aquesta és reduïda, ja que suposa de mitjana 0,0068 mmol/(L×h) i en un cultiu els valors obtinguts s'espera que siguin més elevats. Així, realitzant càlculs de OUR per a cultius hipotètics amb les línies cel·lulars els consums de les quals s'especifiquen a la taula 5.3.2, s'observa un rang, entre els casos més desfavorables i més favorables, entre 0,024 i 0,64 mmol/(L×h). A la taula 5.3.3 es mostren els valors calculats d'OUR (calculada com a consum específic d'oxigen multiplicat per concentració cel·lular), en funció de la concentració cel·lular, per una línia d'hibridoma amb un consum d'oxigen de 120 nmol/(10⁶ Cèl·l.×h) (referència bibliogràfica taula 5.3.2).

Concentració cel·lular (10 ⁵ Cèl·l./mL)	OUR calculada (mmol/(L×h))
2	0,024
4	0,048
8	0,096
16	0,192
20	0,240
25	0,300

Taula 5.3.3. Valors de OUR calculats en funció de la concentració cel·lular, per a una línia d'hibridoma amb un consum específic d'oxigen de 120 nmol/(10⁶ Cèl·l.×h).

5.3.3. Desenvolupament de sistemes d'humidificació

Un altre dels elements que ha estat necessari adequar per a un correcte funcionament del sistema ha estat el sistema d'humidificació de gasos. En aquest cas, entenent com a funcionament correcte aquell que permeti que no hi hagi reduccions de volum significatives: bé perquè alguna de les sondes deixa d'estar en contacte amb el líquid, bé perquè el percentatge de reducció de volum es diferent entre minibioreactors, o assoleix valors majors d'un 5%, respecte el volum inicial, en els 3 dies que s'espera durin els cultius (objectiu de disseny).

Els sistemes amb els quals s'ha treballat inicialment disposen d'un humidificador extern que condeix l'aire humidificat cap als minibioreactors plàstics, que es situa dins una carcassa que permet mantenir la seva temperatura de treball (figura 5.3.15, i amb major detall sobre el sistema, figures 8.4.5 i 8.2.11 del capítol de Materials i Mètodes).

El primer efecte que s'ha observat durant el treball del sistema d'humidificació és que donat que la part superior de la carcassa que contenia els minibioreactors tenia una

temperatura lleugerament inferior a aquests, ja que estava en contacte amb l'ambient, es formava condensació a les tapes superiors dels minibioreactors, obturant els filtres d'aeració.

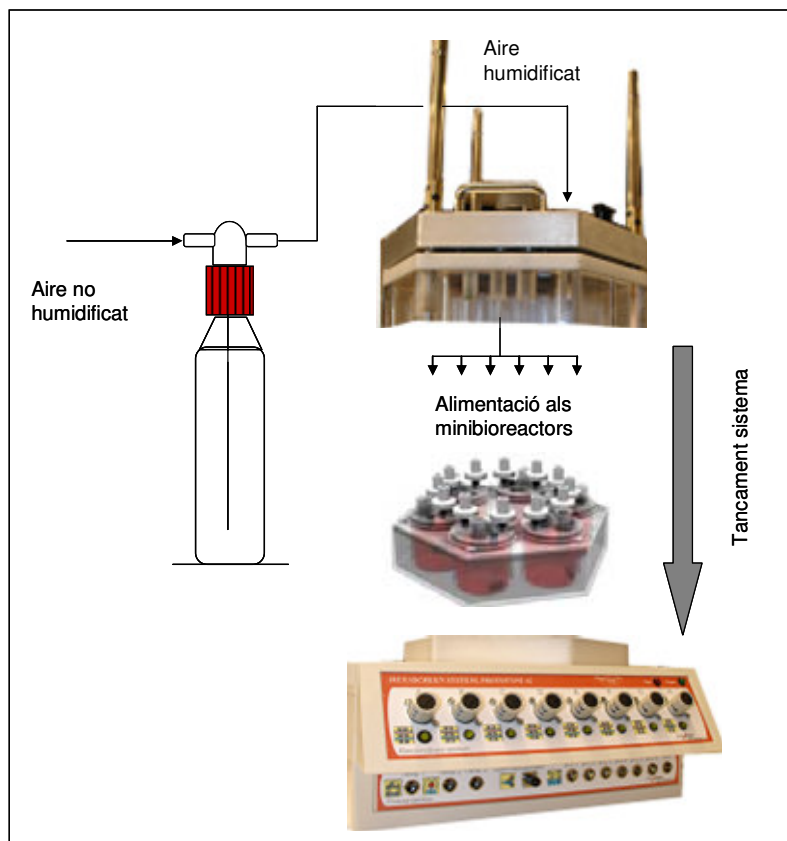


Figura 5.3.15. Esquema del sistema d'humidificació emprat inicialment per a l'equip de sis minibioreactors. A l'esquerra, humidificador a través del qual circula l'aire, que es condueix cap als minibioreactors, que es troben a l'interior d'una carcassa que manté la seva temperatura de treball. La carcassa consta d'una platina de metall i metacrilat a la part superior, i una carcassa plàstica a la part inferior que conté l'equipament electrònic associat al sistema de minibioreactors. El sistema de termostatació està a la carcassa plàstica inferior, i contacta amb els minibioreactors per la part inferior mitjançant una placa conductora. Per a major detall veure figura 8.2.11 del capítol de Materials i Mètodes.

Per tal de corregir la problemàtica de condensacions s'han col·locat resistències a la platina metàl·lica que permeten que la temperatura d'aquesta sigui uns 2°C superior a la dels minibioreactors. Introduint aquest canvi, es realitzen diferents experiments per avaluar la potencial problemàtica de l'evaporació.

Per a tots els experiments s'han omplert els minibioreactors amb 13 mL d'aigua destil·lada, atemperant-los a 37°C amb el sistema de sis minibioreactors (presentat a la figura 5.3.15) i aerant-los amb cicles de 8 s per minibioreactor cada 250 s. Les primeres proves realitzades han estat atemperant el sistema d'humidificació a 25 i 29°C. Per a més detall, el sistema d'humidificació ha constatat d'una ampolla amb 1 L d'aigua destil·lada, a través del qual bombollejava el gas que es dirigia cap al sistema de minibioreactors, tot passant a través d'un filtre difusor de 10 µm (ALCO, PSL613609) per tal de reduir la mida de les bombolles i així augmentar la humidificació.

Com a referència s'ha emprat les dades d'evaporació d'un minibioreactor individual situat a l'interior de l'incubador (>90% d'humitat) i sense aerar. Donat que en aquesta situació hi haurà menys evaporació que en cap situació de treball amb la que ens puguem trobar, marcarà la situació òptima a assolir.

A la figura 5.3.16 es mostren les dades d'evaporació en mL evaporats per dia, amb l'humidificador treballant a 25 i 29°C. Termostatant el sistema d'humidificació a 25°C l'evaporació és molt elevada, d'aproximadament 1,6 mL/dia, molt lluny dels 0,13 mL/dia del minibioreactor control (en incubador, sense aerar). Si la termostatació augmenta a 29°C, la evaporació es redueix notablement, aproximadament a 0,7 mL/dia.

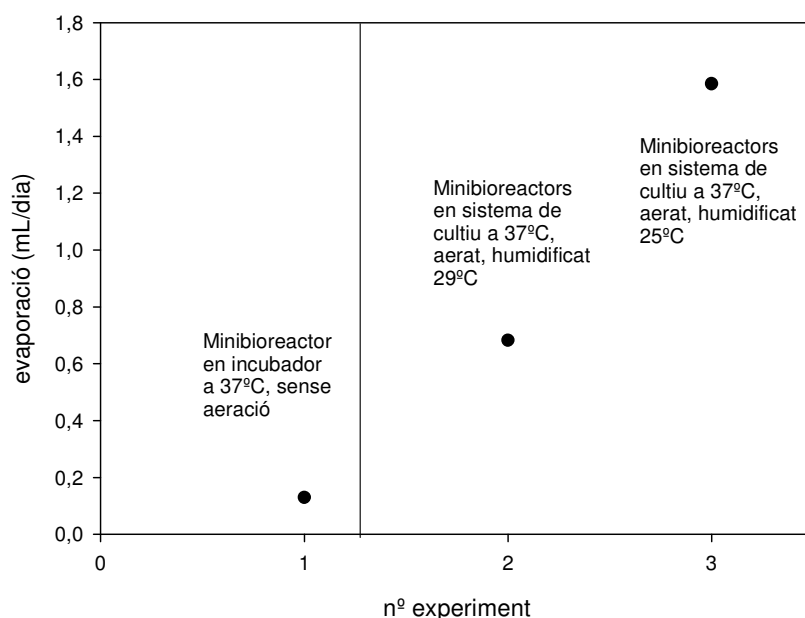


Figura 5.3.16. Esquerra, evaporacions (mL/dia) sobre un volum total de treball de 13mL, obtingudes sense humidificador i amb humidificador treballant a diferents temperatures. L'aeració emprada ha estat de 0,4 slpm (en períodes de 8 s cada 250). Per a major detall del sistema experimental emprat, consultar el capítol Materials i Mètodes.

Tot i que a la figura 5.3.16 ja es pot observar que augmentant la temperatura de l'humidificador de 25°C a 29°C es redueix notablement l'evaporació, no ha estat possible assolir una reducció suficient degut a limitacions del sistema experimental. Quan amb el sistema emprat en l'experiment anterior s'ha fixat temperatures de l'humidificador superiors a 30°C, han aparegut condensacions degudes a la diferencia de temperatura entre el gas que circula per l'interior de la conducció que va des de l'humidificador fins als minibioreactors i l'ambient que han acabat obturant els filtres d'entrada als minibioreactors. Per a resoldre aquest problema, novament s'han realitzat modificacions al sistema experimental de manera que els humidificadors fossin inclosos en una coberta situada directament sobre del sistema de minibioreactors, i evitant l'existència de punts freds en el circuit entre l'humidificador i els minibioreactors. Bàsicament s'ha inclòs una carcassa, a l'interior de la qual es situava una ampolla d'humidificació (en aquest cas un cilindre de llautó amb 80 mL d'aigua destil·lada, i novament un difusor de 10 µm). La carcassa també incorporava un ventil·lador que seguint una estratègia *on-off*, mantenia la temperatura de l'interior en funció de la consigna.

A la figura 5.3.17 es mostra un esquema del muntatge comentat:

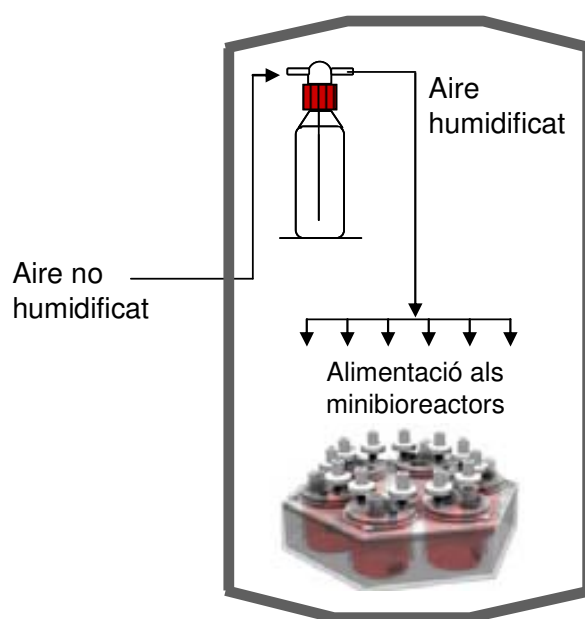


Figura 5.3.17. Esquema del muntatge del sistema de cultiu incorporant els humidificadors dins una coberta. L'aire d'entrada passa per un humidificador, situat dins la mateixa coberta tèrmica en la qual també hi ha els minibioreactors, de tal manera que al no haver-hi punts freds no hi ha condensacions des de l'humidificació fins a l'alimentació als minibioreactors.

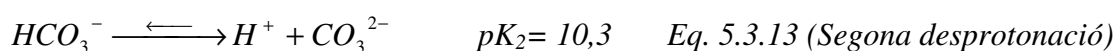
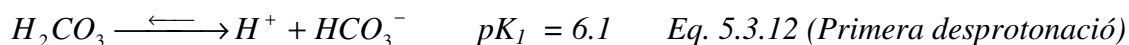
Amb aquest nou muntatge s'ha pogut completar l'experiment d'evaporació, humidificant l'aire a majors temperatures. Els resultats (veure la taula 5.3.4) mostren que a temperatures de 39°C o majors s'aconsegueix l'objectiu de disseny de tenir evaporacions iguals o inferiors al 5% del volum del reactor en 3 dies (valor equivalent a 0,22 mL/dia).

Temperatura coberta (°C)	Evaporació (mL/dia)
37	0,31
39	0,22
41	0,18

Taula 5.3.4 Evaporació mesurada en un muntatge del sistema de cultiu que incloïa els humidificadors a la coberta superior.

5.3.4. Metodologia d'operació del sistema d'aeració

En apartats anteriors s'ha presentat quina és la forma d'operar del sistema d'aeració, quina era el coeficient de transferència d'oxigen en funció de l'agitació, i quina capacitat de mantenir cèl·lules en cultiu proporcionava aquesta. A banda de la transferència d'oxigen, també cal tenir en compte la transferència de CO₂ a la suspensió cel·lular, ja que aquest gas, en combinació amb el bicarbonat present en el medi de cultiu és el que manté el pH desitjat. A continuació es presenten els equilibris químics i una forma gràfica àmpliament utilitzada en cultiu cel·lular per realitzar el càlcul del pH a partir del percentatge de CO₂ i concentració de bicarbonat en el medi.



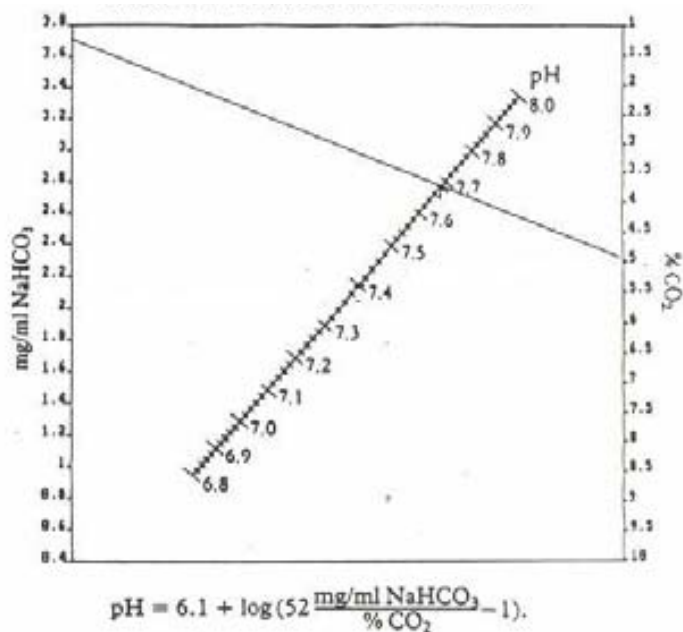


Figura 5.3.18. Relació entre el contingut de bicarbonat d'un medi de cultiu, el percentatge de CO_2 i el pH. Henderson-Hasselbach. Font: www.nalgenunc.co.jp

A partir de la figura anterior es pot calcular quin serà el pH d'equilibri donat un determinat medi de cultiu i un percentatge de CO_2 dissolt. Així, prenent com exemple un medi DMEM (Sigma D-5030), amb 3,7 g/L de bicarbonat, situat en un incubador al 5% de CO_2 , el pH que s'assolirà una vegada arribats a l'equilibri estarà aproximadament al voltant de $\text{pH} \approx 7,7$.

Un tema operatiu important a l'hora de treballar amb el sistema de cultiu serà el calibratge del pH. Si bé la sigmoïdal que defineix la relació entre l'absorbància i el pH és específica per a cada medi de cultiu, i podrà estar incorporada en una llibreria de programari, el que serà potencialment diferent a cada cultiu serà el pH inicial, donat que els medis poden haver sofert ajustos i donades les seves condicions d'emmagatzematge no estaran en equilibri amb el percentatge de CO_2 de cultiu. Per resoldre aquestes incerteses, el més recomanable serà 1) Deixar el medi de cultiu el temps suficient en contacte amb l'aire al percentatge de CO_2 desitjat per tal que s'assoleixi l'equilibri, i 2) Alimentar el programari del sistema de cultiu amb la mesura de pH inicial (que es podrà conèixer donada la concentració de bicarbonat i CO_2).

Per a conèixer el temps necessari per assolir l'equilibri entre bicarbonat i CO_2 d'una banda s'ha mesurat el pH en un vas de precipitats amb 50 mL de medi DMEM (Sigma, D-5030) situat dins un incubador a 37°C i al 8% de CO_2 , i d'altra banda s'ha mesurat l'absorbància amb el sistema de sis minibioreactors, prèviament atemperat, amb tots els

minibioreactors contenint 12 mL de medi DMEM, on s'han executat cicles d'aeració continuats (cada cicle contempla l'obertura alterna, durant 4 segons, de les vàlvules d'entrada d'aire al 5% de CO₂, de cadascun dels sis minibioreactors, amb un cabal de 0,2 slpm).

A la figura 5.3.19 es mostren els resultats de les mesures realitzades, que mostren com el temps necessari per assolir plenament l'equilibri en un vas de precipitats, no agitat, dins un incubador, és molt elevat en comparació al que s'obté amb el sistema de sis minibioreactors, que requereix d'aproximadament 2 h per assolir l'equilibri d'espècies.

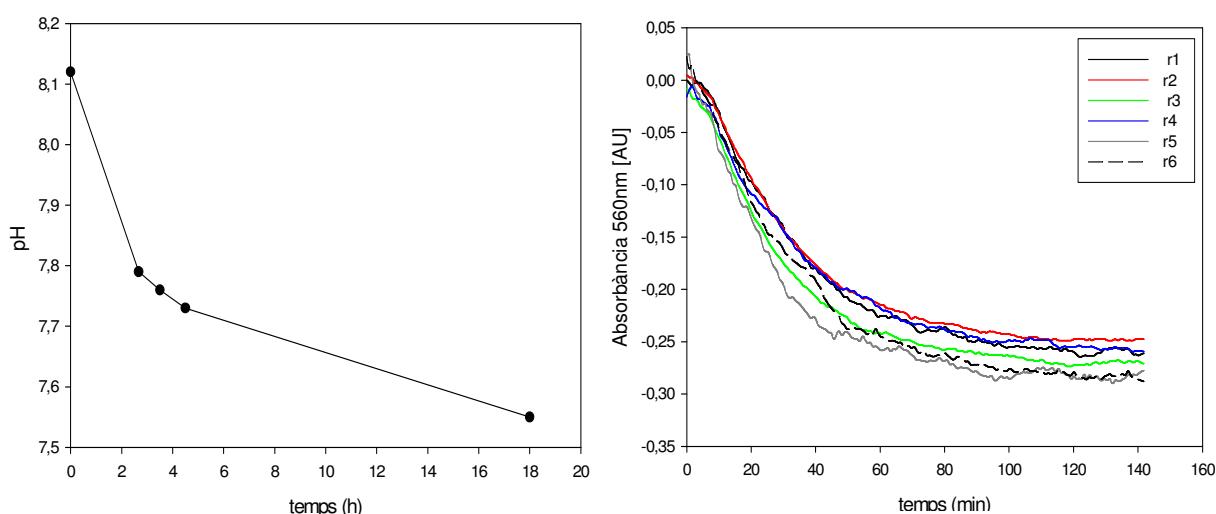


Figura 5.3.19. Temps necessari per assolir

l'equilibri entre CO₂ i bicarbonat en el medi DMEM. A l'esquerra, avaluat a partir de la mesura de pH en un incubador a 37°C i el 8% de CO₂. A la dreta, avaluat a partir de la mesura d'absorbància a 560 nm (zona d'absorció de la forma bàsica de l'indicador de pH) en un sistema de sis minibioreactors, amb tots els minibioreactors plens de medi DMEM.

Veient que el temps necessari per assolir l'equilibri en el sistema de sis minibioreactors és de l'ordre del necessari per l'atemperament, s'ha realitzat un nou experiment emprant aquest sistema, amb les mateixes condicions que l'anterior, però en aquest cas realitzant els cicles d'aeració també durant la fase d'atemperament, per estudiar la possibilitat de solapar les dues fases (atemperament i equilibri de pH) i així reduir el temps necessari per arrencar el seguiment dels cultius. Una vegada assolit l'atemperament, s'ha seguit amb els cicles d'aeració i s'ha iniciat la mesura del pH (assumint que el pH inicial es de 7,8, el marcat per l'equilibri d'espècies en aquest medi).

A la figura 5.3.20 es mostra l'evolució temporal de la mesura de pH des del punt on ja s'havia assolit l'equilibri tèrmic. Tal com s'observa a la gràfica, el pH es manté estable

durant tot el temps de mesura, de manera que una vegada aquesta s'havia iniciat (completada l'etapa d'atemperament), ja s'havia assolit l'equilibri d'espècies responsables de l'establiment del pH. Així doncs, és viable la possibilitat de solapar ambdues fases (termostatació i aeració per equilibrar pH), calibrant el pH una vegada s'assoleix l'equilibri tèrmic, i començant les mesures a partir d'aquest punt.

De totes maneres, cal tenir en compte que l'atemperament pot iniciar-se a partir de diferents temperatures i per tant la seva durada pot ser substancialment diferent. En aquest cas, la durada fins assolir l'equilibri tèrmic ha estat aproximadament de 2 h, de manera que es recomana que com a mínim s'hagi superat aquest temps prèviament a procedir a l'etapa de seguiment dels cultius.

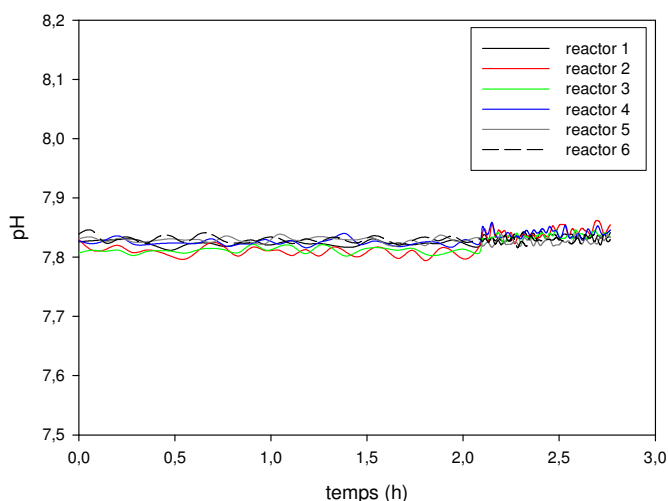


Figura 5.3.20. Mesura de pH en el sistema de sis minibioreactors, amb tots els minibioreactors plens de medi DMEM, una vegada assolit l'equilibri tèrmic del sistema. L'aeració aplicada tant durant la fase d'atemperament com durant la de mesura han estat cicles continuats (cada cicle contempla l'obertura alterna 4 s de cadascun dels sis minibioreactors, amb un cabal de 0,2 slpm d'aire-5% CO₂).

Per acabar d'establir el marc d'operació del sistema d'aeració dels equips de sis minibioreactors, manca conèixer quina és la freqüència d'aeració necessària per mantenir el pH una vegada iniciada l'etapa de mesura.

Així doncs, es planteja un experiment on, novament emprant els sis minibioreactors amb 12 mL de medi DMEM (Sigma, D5030), una vegada realitzat l'atemperament inicial (a 37°C) es realitzen ventil·lacions amb diferents freqüències (5 s cada 90 s, 5 s

cada 150 s, 5 s cada 250 s, 5 s cada 500 s) i es mesura l'evolució del pH en aquesta etapa.

A la figura 5.3.21 s'observa que amb freqüències de 5 s d'aeració per reactor cada 250 s és possible mantenir el pH, mentre que quan la freqüència es redueix a 5 s cada 500 s hi ha una certa desorció de CO_2 que provoca un increment en el pH. En conseqüència, es recomana una freqüència d'aeració de com a mínim 5 s cada 250 s.

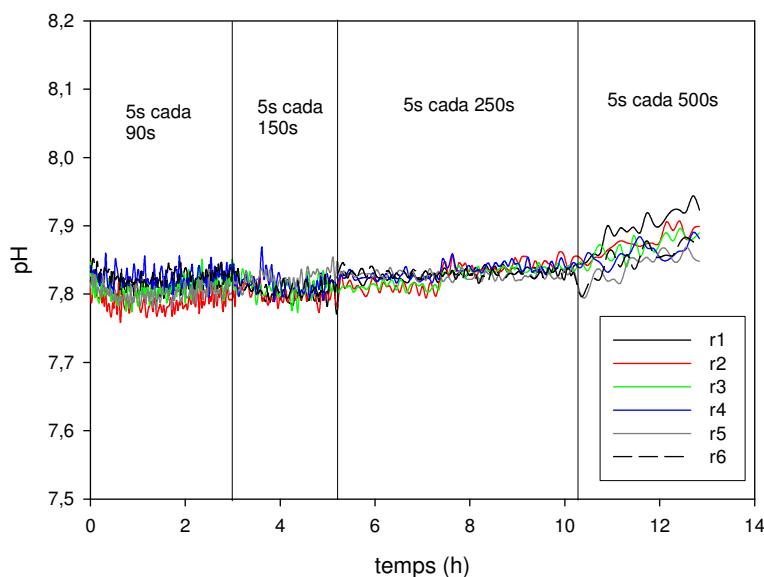


Figura 5.3.21. Aeració necessària per mantenir un determinat pH. Una vegada equilibrat un determinat pH mitjançant circulació contínua de aire-5% CO_2 ,

A la vista dels resultats anteriors es pot donar per fixat el mètode d'operació del sistema de cultiu referent al pH. Així, aquest contemplarà una etapa inicial on, havent inoculat les cèl·lules amb medi de cultiu a l'interior dels minibioreactors, els sistema s'atemperarà i tindrà cicles d'aeració continuats. Una vegada assolit l'equilibri tèrmic (o encara que s'hagi assolit, haurà d'haver passat un temps de 2 h), es prendrà una mesura de blanc òptic, es relacionarà aquesta amb el pH d'equilibri del medi (s'haurà de conèixer o en cas contrari obtenir de la figura de Henderson-Hasselbach) i s'iniciarà el seguiment del cultiu amb uns cicles d'aeració mínims de 5 s d'aire-5% CO_2 cada 250 s.

5.3.5. Possibilitat de realitzar controls de pH i d'oxigen dissolt

Tot i que la metodologia operativa del sistema es focalitza inicialment cap a la mesura dels paràmetres físico-químics (T, pH, $[\text{O}_2]$), creixement i metabolisme (novament pH, i

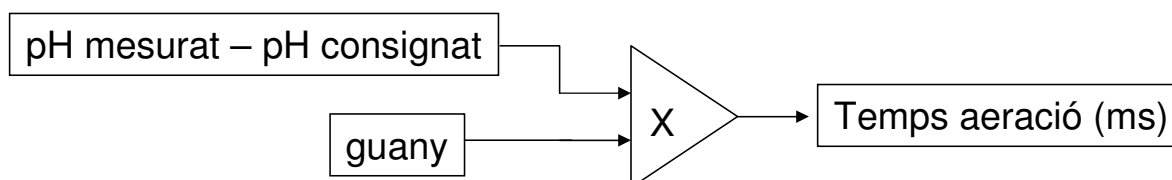
OUR), s'ha cregut interessant avaluar les possibilitats per realitzar controls sobre les variables pH i oxigen dissolt, ja que en determinades aplicacions aquestes poden ser interessants. En el cas de l'oxigen dissolt, de forma habitual es considera que concentracions entre el 20 i 80% d'oxigen dissolt no afecten el creixement dels cultius de cèl·lules animals (Ozturk i Palsson, 1991), però en el cas del pH, per mantenir la productivitat i funcionalitat de determinades proteïnes recombinants és més usual mantenir marges de pH més estrets (Ozturk i Palsson, 1991).

5.3.5.1. Control de pH

Els primer dels experiments que es planteja per tal d'avaluar les possibilitats d'implementar controladors de l'oxigen dissolt i el pH té com a finalitat avaluar la possibilitat de controlar un únic pH en els sis minibioreactors compresos en el sistema de sis minibioreactors, emprant CO₂ pur com a element per acidificar i controlar el pH.

Per a l'experimentació s'ha emprat una placa de sis minibioreactors amb un contingut de 12 mL de medi DMEM (Sigma, D5030) per reactor. Una vegada situats al sistema de sis minibioreactors, s'ha arrencat l'agitació a 200 rpm, atemperat a 37°C durant 2 h, i al final d'aquest període s'ha procedit a realitzar un calibratge òptic i del pH. Realitzat aquest s'ha aplicat una estratègia de control proporcional sobre el temps de pas d'un cabal de CO₂ pur (fixat a 0,4 slpm), amb diferents guanys (2500, 1500, 500), per tal d'intentar mantenir el pH en un valor consignat (pH = 7,00).

Per tal de poder realitzar simultàniament el pas d'aire i de CO₂ pur, el que s'ha fet és realitzar l'aeració passant 4 s d'aire (per reactor) cada 250 s, i una vegada completat el cicle d'aeració dels sis reactors, s'ha calculat el temps de pas de CO₂ pur necessari en cadascun d'ells emprant la fórmula presentada a l'equació 5.3.14. Per assegurar una major estabilitat del controlador s'ha fixat un temps màxim d'aeració (2500 ms).



Eq 5.3.14. Fórmula per al càlcul del temps de pas de CO₂ pur.

A la figura 5.3.22 es mostren els resultats aconseguits amb el controlador que ha mostrat un millor funcionament dels estudiats (amb un paràmetre proporcional $P = 500$). A la figura s'observa com el pH es manté al voltant de $\text{pH} = 7,00$ encara que amb oscil·lacions de $\pm 0,13$ unitats.

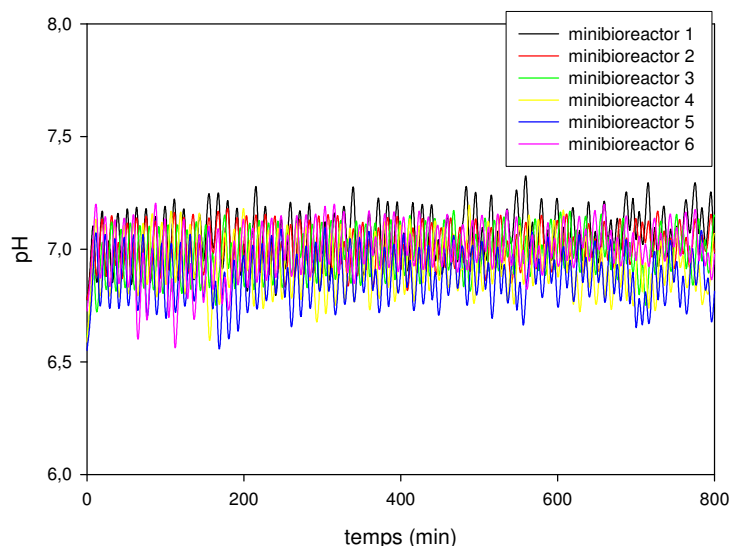


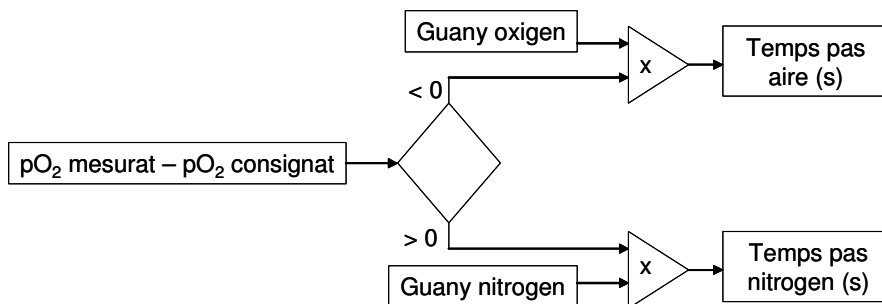
Figura 5.3.22. Seguiment del pH emprant un controlador que emprava CO_2 pur com a element de control i paràmetres proporcionals de $P=500$ i un màxim temps de pas de CO_2 pur de 2500 ms.

Amb la base d'aquests resultats s'estima que el potencial del sistema per controlar un determinat pH amb CO_2 pur és elevat, donat l'ajust de pH que s'ha obtingut amb un nombre d'experiments molt limitat. Cal tenir en compte però, que aquest potencial de control de pH serà elevat sempre i quan l'acidificació produïda pels cultius no sigui tant important com per requerir d'elements d'actuació per a basificar el pH.

5.3.5.2. Control d'oxigen dissolt

D'altra banda, per tal d'estimar la capacitat de realitzar el control de l'oxigen dissolt també s'ha realitzat proves emprant el sistema d'un únic minibioreactor. Donada la major complicació esperada per al control de l'oxigen dissolt comparada a l'existent per al control de pH, en base a l'experiència prèvia en bioreactors 2-L (Braun Biostat MCD), s'ha realitzat l'experimentació amb un únic minibioreactor i no amb el sistema de sis minibioreactors que s'havia emprat a l'apartat anterior.

Per a realitzar la sintonia del controlador s'ha emprat el minibioreactor amb 12 mL de medi DMEM (Sigma D5030), agitat a 200 rpm. Una vegada atemperat a 37°C, s'ha realitzat el calibratge de la sonda de mesura d'oxigen dissolt i a continuació s'ha realitzat la sintonia d'un controlador proporcional, intentant mantenir una consigna d'un 60% de saturació d'aire, emprant com a elements d'actuació d'aire comprimit al 5% CO₂ i Nitrogen al 5% CO₂. Per al càlcul del temps de pas, s'ha emprat la fórmula presentada a l'equació 5.3.15.



Eq 5.3.15. Fórmula per al càlcul del temps de pas de d'aire (amb un 5% CO₂) i de nitrogen (amb un 5% CO₂).

A la figura 5.3.23 es mostren els resultats obtinguts (seguiment de la concentració d'oxigen dissolt) aplicant diferents guanys proporcionals i fixant diferents temps màxims/mínims de pas dels diferents gasos. Juntament amb la informació gràfica es presenta una taula amb els paràmetres del controlador aplicats en cada tram de la gràfica (a, b, c).

Una vegada sintonitzat el controlador proporcional s'observa que el control de la concentració d'oxigen dissolt no és tant acurat com es desitjaria, ja que el fet d'emprar com a elements d'actuació gasos amb concentracions allunyades de la que es desitja (60% d'oxigen dissolt), i havent-hi dinàmiques de transferència lentes, condueix a que el millor dels controls permeti obtenir concentracions del 60% +5/-15%. De totes maneres, en el cas que es desitgés realitzar un control més acurat, es podrien emprar mescles de gasos amb concentracions més pròximes a la de consigna.

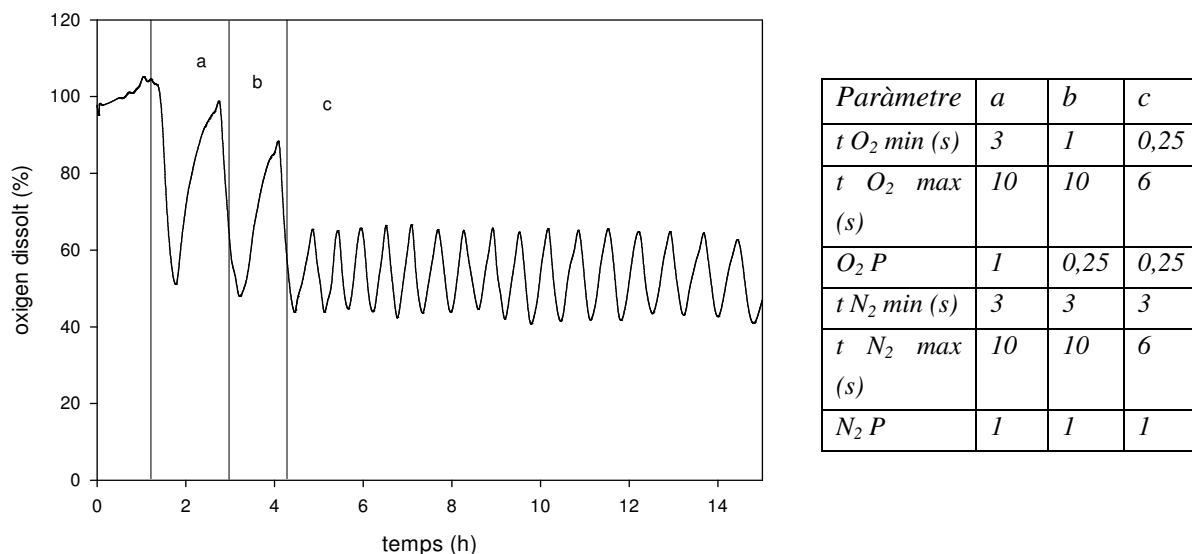


Figura 5.3.23. Resultats de la sintonia d'un controlador d'oxigen dissolt aplicant diferents paràmetres d'un controlador proporcional. A l'esquerra, seguiment de la concentració d'oxigen durant els diferents trams on, en cadascun dels quals, s'ha aplicat diferents paràmetres de control. A la dreta, paràmetres de controlador en cadascun dels trams. $t_{O_2 \text{ min}}$ (temps de pas mínim d'aire-5% CO_2 , en segons), $t_{O_2 \text{ max}}$ (temps de pas màxim d'aire-5% CO_2 , en segons), $O_2 P$ (paràmetre proporcional aplicat al per a determinar el temps de pas d'aire-5% CO_2), $t_{N_2 \text{ min}}$ (temps de pas mínim de N_2 -5% CO_2 , en segons), $t_{N_2 \text{ max}}$ (temps de pas màxim de N_2 -5% CO_2 , en segons), $N_2 P$ (paràmetre proporcional aplicat al per a determinar el temps de pas de N_2 -5% CO_2).

Amb aquests experiments per tal d'avaluar la possibilitat de controlar el pH i l'oxigen es dona per acabat el capítol de desenvolupament de sistemes de mesura i tecnologies requerides per a la correcta operació dels cultius. Així doncs, en el proper capítol ja es podrà procedir a realitzar cultius per tal d'avaluar la funcionalitat del sistema de minibioreactors en desenvolupament.

5.4. Discussió

En aquest capítol s'ha assolit el desenvolupament dels sistemes de mesura i elements auxiliar dels bioreactors que han de permetre la potencial realització d'estudis amb cultius de cèl·lules animals, a condicions no limitants en el rang d'estudi, seguint les principals variables que han de permetre avaluar diferències entre cultius i realitzar experiments d'optimització.

A banda del desenvolupament dels sistemes de mesura, el sistema d'agitació desenvolupat en aquest capítol és no estressant, i permet una transferència d'oxigen adequada que aporta la potencialitat de tenir creixements cinèticament no limitats en un rang per a permetre la realització dels estudis desitjats.

El sistema de mesura de biomassa desenvolupat, basat en un sistema òptic de mesura d'absorbància, té una potencialitat de seguiment de cèl·lules animals en suspensió en el rang habitual de treball, de 2 a 20×10^5 Cèl·l./mL, amb un error menor a $1,2 \times 10^5$ Cèl·l./mL.

Pel que fa al sistema de mesura de pH, basat en el seguiment d'un indicador present als medis de cultiu de cèl·lules animals (roig de fenol), ha emprat el mateix sistema òptic de mesura d'absorbància que l'emprat per a la mesura de biomassa. Així doncs s'ha hagut de proposar un esquema de càlcul per tal de poder tenir la contribució de l'absorbància total deguda a l'indicador de pH. Aquest sistema permet seguir el pH en el rang $6,5 < \text{pH} < 8,5$, amb un error menor al 1,6%.

El sistema de mesura d'oxigen permet el seguiment d'oxigen entre el 0 i 100% de saturació d'aire amb un temps de resposta menor a 5 s i una estabilitat elevada (desviació menor al 2,0%) durant el temps de realització dels cultius.

En el cas de la mesura del consum d'oxigen, s'ha desenvolupat un mètode per a realitzar aquestes mesures fonamentat amb les sondes d'oxigen, amb una desviació entre bioreactors menor a 0,008 mmol/L×h i una deriva de 0,0049 mmol/L×h per dia, que tenint en compte els valors potencialment presents en un cultiu exemple (hibridoma KB-26.5, Gámez, 2000), amb 10×10^5 Cèl·l./mL (0,192 mmol/L×h), són errors acceptables.

Finalment, s'ha demostrat en un sistema amb un únic minibioreactor que, amb el disseny i tecnologia emprats, hi ha la potencialitat de controlar el pH al voltant de la consigna de treball ($\text{pH} = 7,0 \pm 0,13$ unitats) i l'oxigen dissolt, també al voltant de la consigna habitual de treball ($[\text{O}_2] = 60\%, \pm 5\text{-}15\%$).

6. UTILITZACIÓ DE L'EQUIP DESENVOLUPAT: CULTIUS AMB DIFERENTS MODELS BIOLÒGICS

Una vegada completades les etapes de disseny, construcció i validació funcional de les tecnologies d'uns primers prototips de bioreactor, en aquest capítol (ubicació a figura 1.13) es completarà la validació funcional realitzant cultius amb diferents models biològics amb la finalitat de contrastar, d'entrada, la capacitat de diferents tipus cel·lulars de créixer dins el sistema sense limitacions, i demostrat això, avaluar la capacitat dels equips per a seguir el creixement i metabolisme dels organismes model, detectant també noves necessitats per a les que s'haurà de desenvolupar noves prestacions, ja fora de l'abast del present projecte de recerca i en el marc d'un potencial projecte d'explotació industrial.

Tal com es definia a l'inici del capítol 5, el desenvolupament dels sistemes de bioreactors s'ha orientat bàsicament a cèl·lules animals, de manera que la majoria dels experiments d'aquest capítol es realitzaran amb aquestes, ja siguin cèl·lules en suspensió o cèl·lules adherents.

De totes maneres, no es deixaran de banda altres models biològics com bacteris i llevats, amb els que s'estudiarà la forma de superar les limitacions observades en el capítol 4 (capacitats i limitacions dels sistemes de seguiment seleccionats), i novament s'avaluarà la capacitat dels equips per a seguir el creixement i metabolisme cel·lulars. En aquest cas, tot i que es coneix que l'equip de minibioreactors té limitacions, el que també es vol fer és identificar, i en alguns casos aplicar, les millores necessàries per tal que de poder efectuar cultius de bacteris i llevats amb una major finestra d'aplicació sense limitacions.

6.1. Cèl·lules animals

Les cèl·lules animals que s'utilitzen en cultius in vitro provenen fonamentalment de quatre tipus bàsics de teixits de mamífer: epitelial, muscular, nerviós i connectiu. També s'utilitzen cèl·lules que provenen d'altres vertebrats o fins i tot d'invertebrats com és el cas de les cèl·lules d'insecte (Kost i Col., 2005; Lynn, 2007).

Les línies cel·lulars són un tipus de cèl·lules animals que han estat transformades per tal d'adquirir la capacitat de poder ser cultivades indefinidament (Werner i Noé, 1993). Un exemple d'aquestes línies cel·lulars són les cèl·lules CHO (*Chinese Hamster Ovary*), BHK (*Baby Hamster Kidney*), HeLa (cèl·lules extretes d'un tumor del coll de l'úter d'Henrietta Lacks). Un altre tipus de línies cel·lulars són els híbridomes, que són el resultat de fusionar un limfòcit amb una cèl·lula de mieloma. Aquesta cèl·lula

cancerígena és la que els dóna la capacitat de ser cultivades indefinidament. Les cèl·lules animals es poden agrupar en dos grans grups:

- Cèl·lules anclatge-dependents (creixement adherent). Són aquelles que únicament creixen si es troben adherides a un suport sòlid. No acostumen a assolir densitats cel·lulars elevades ja que deixen de créixer un cop han format una monocapa de cèl·lules sobre la superfície a la que es troben adherides. Hi ha alguns casos però, on es dóna superconfluència i les cèl·lules segueixen creixent una vegada han arribat a confluència. Acostumen a ser cèl·lules musculars, nervioses, epitelials que s'obtenen d'òrgans com el ronyó, el fetge o fibroblasts.
- Cèl·lules no anclatge-dependents (creixement en suspensió). Poden créixer en suspensió en el medi, per aquest motiu arriben a assolir densitats cel·lulars superiors a les adherents. En aquest grup es troben les cèl·lules del sistema immunitari presents a la medul·la òssia o a la sang, o bé cèl·lules anclatge-dependents que han estat adaptades a créixer en suspensió.

En aquest treball s'utilitzaran com a model tant línies cel·lulars anclatge-dependents (Vero, HEK293), com no anclatge-dependents (hibridomes).

Abans d'estudiar amb detall cadascun dels experiments realitzats, cal tenir en compte que en el cas de les cèl·lules adherents es perd una de les mesures implementades, el seguiment del creixement per absorbància, ja que les cèl·lules creixen o bé al fons dels bioreactors, impedit el pas de llum progressivament i de forma no completament homogènia, o bé creixen en microcarriers, de manera que el pas de llum es veu impedit pels carriers i no per les cèl·lules.

Prèviament a l'inici dels diversos experiments que es desitja plantejar amb cèl·lules animals s'ha cregut convenient comprovar la toxicitat dels materials emprats. A la figura 6.1.1 es mostra la localització de cadascun dels materials en els minibioreactors. El material del qual estan fets els minibioreactors és un poliestirè cristall (GPPS) que compleix la normativa US FDA 21CFR 177.1640 sobre material apte per a estar en contacte amb aliments, els pèndols d'agitació estan elaborats amb silicona de qualitat alimentària (RHODORSIL[®]), i els imants que queden encapsulats a l'interior del pèndol estan aïllats dels medis de cultiu per silicona Wacker E43, que compleix les normatives d'aplicació biològica que el classifiquen com USP class VI. Finalment, les membranes sensores de fluorescència de Ocean Optics no disposen de certificacions referents a l'aplicabilitat en cultius de cèl·lules animals.

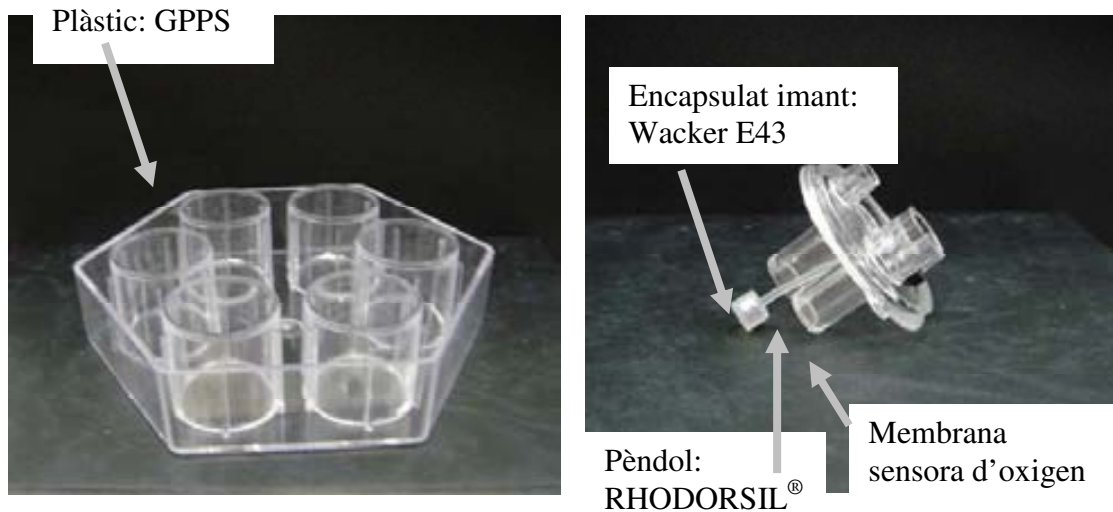


Figura 6.1.1. Localització dels diferents materials dels que estan manufacturats els minibioreactors. Esquerra, base hexagonal que comprèn els sis minibioreactors. Dreta, tapes de cadascun dels minibioreactors.

Tot i que la major part dels materials ja compleixen especificacions per no tenir efectes adversos de toxicitat, per assegurar que no han aparegut degut als processos de manufactura (injecció en el cas del plàstic, estampació en el cas del pèndol), s'ha realitzat proves de toxicitat sobre cultius de hibridoma.

En l'experiment plantejat es compara el creixement d'hibridomes en medi DMEM al 10% de FCS obtingut en flascons de 25 cm², enfront l'obtingut en tres minibioreactors individuals, agitats a 200 rpm, creixent a l'interior del mateix incubador que els flascons (a 37°C i 5% de CO₂). Els inòculs realitzats han estat de 2×10⁵ Cèl·l./mL, i el volum de treball de 12 mL en el cas dels minibioreactors, i de 10 mL en el cas dels flascons de cultiu.

A la figura 6.1.2 es mostren les mitjanes, amb barres d'error, de les corbes de creixement en flascó i en minibioreactor, observant-se que no hi ha diferències significatives entre ambdues.

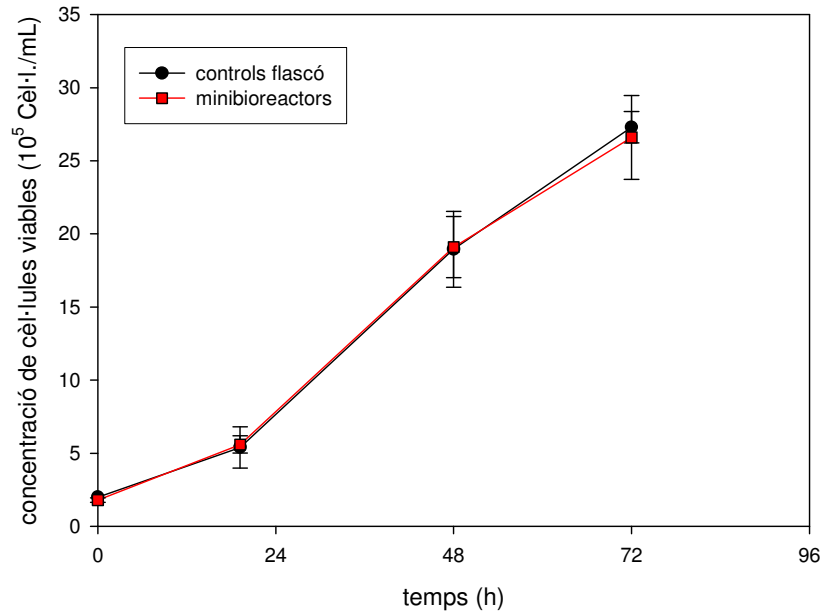


Figura 6.1.2. Corbes de creixement d'hibridomes en medi DMEM 10% FCS en flascons de control, així com en minibioreactors agitats (200 rpm, 12 mL suspensió cel·lular) creixent en un incubador a 37°C i 5% CO₂.

6.1.1. Creixement en suspensió

Per a la realització de cultius en suspensió, s'ha treballat amb hibridomes, un dels models més emprats per a la producció d'anticossos monoclonals per a ús diagnòstic.

Per a facilitar la lectura d'aquest punt en endavant, tots els experiments es presenten en el mateix format, especificant tipus cel·lular, condicions de cultiu, i discussió dels resultats obtinguts. Els resultats consten de corbes de creixement (seguiment absorbància a 635+/- 15 nm), seguiment de pH, seguiment d'oxigen dissolt i OUR.

Durant la presentació dels experiments es discutiran les corbes de creixement observades en cada cas, comparant les concentracions màximes assolides, velocitats específiques de creixement, acidificacions observades, i OUR màximes. Aquestes dades permetran comparar els creixements i comportaments metabòlics entre les diferents condicions avaluades a cada experiment.

En el cas que es desitgi caracteritzar el creixement d'una línia cel·lular a unes determinades condicions, a partir de la concentració cel·lular i les OUR en fase de creixement exponencial, es pot calcular el consum específic d'oxigen. Aquesta dada es presenta a l'experiment de creixement a condicions idèntiques en els sis

minibioreactors, mentre que en els casos on es comparen sis condicions de creixement, la discussió es centra en el creixement i en paràmetres de quantificació de l'activitat metabòlica, no per cèl·lula si no pel global del cultiu (acidificació i OUR).

Per a major informació sobre la metodologia de treball amb els sistema de cultiu de sis minibioreactors emprat veure el capítol de Materials i Mètodes (apartat 8.2.2.2).

6.1.1.1. Creixement d'hibridomes a condicions idèntiques en els sis minibioreactors

En aquest experiment s'ha realitzat un creixement d'hibridomes a condicions idèntiques als sis minibioreactors de cultiu (temperatura, inòcul, medi de cultiu, aeració) per tal comprovar la reproduïbilitat de les corbes de creixement entre reactors.

Tipus cel·lular

Cèl·lules de mamífer / suspensió

Línia cel·lular

Hibridoma BHRF1

Condicions del cultiu

- Medi: DMEM (Sigma, D5796), suplementat amb L-glutamina (Sigma, G-5763) fins arribar a una concentració de 0,877 g/L, 0,5 mL/L insulina (Solució 4 UI/mL, Actrapid Novo), 0,5 mL/L β -mercaptoetanol (Solució 0,1 M, Sigma M-6250), i 10% de *Foetal Calf Serum* (FCS) (Biological Industries, Cat. 04-001-1A, Lot 415360)
- Inòcul: $2,4 \times 10^5$ Cèl·l./mL
- Agitació: 200 rpm
- Temperatura dels bioreactors: 37 °C
- Aeració: 0,2 slpm (5s cada 250s)
- Cabal N₂ per a la OUR: 0,4 slpm

Resultats

A la figura 6.1.3 es presenten els resultats obtinguts: corbes de creixement (absorbància a 635 \pm 15 nm), seguiment del pH, seguiment de l'oxigen dissolt, i seguiment del consum d'oxigen (*Oxygen Uptake Rate*, OUR).

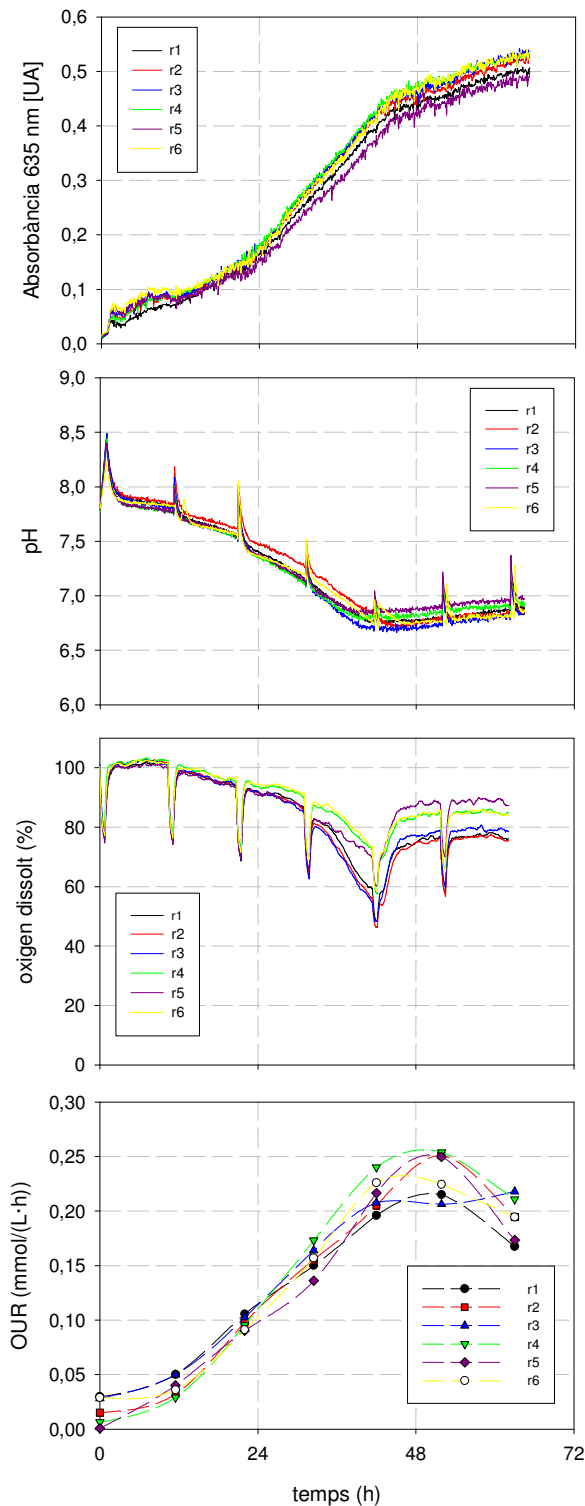


Figura 6.1.3. Perfils obtinguts en cultius d'hibridomes efectuats amb l'equip de sis minibioreactors on s'utilitzen idèntiques condicions en cadascun dels sis minibioreactors. El medi emprat fou DMEM 10% FCS per a tots els minibioreactors. OUR es refereix a Oxygen Uptake Rate. Els pics observats en els perfils de pH i oxigen dissolt corresponen als temps de monitorització de OUR, degut a la desorció de l'oxigen i el CO₂ provocada per la metodologia de mesura.

Els resultats observats a la figura 6.1.3 per a cadascun dels bioreactors són molt similars, arribant a densitats òptiques d'aproximadament 0,5 UA (equivalent aproximadament a 30×10^5 Cèl·l./mL), observant una acidificació d'unes 1,12 unitats de pH, i OUR màxims de 0,23 mmol O₂/(L·h), que considerant la concentració cel·lular present en el moment de mesura de la OUR, correspon a una q_{O₂} de 150 nmol/(10⁶ Cèl·l.·h).

El seguiment de l'absorbància a 635 nm permet monitoritzar la corba de creixement dels cultius fins que s'assoleix una estabilització del cultiu, punt on hi ha una inflexió de la corba. Tal com es pot veure a la figura, això passa aproximadament a les 44 h de cultiu. Els anàlisis fora de línia realitzats mostren que en aquest instant del cultiu, hi ha un exhauriment de la glutamina, que també es veu reflectit en els perfils de les altres mesures realitzades pel sistema de cultiu com el pH, oxigen dissolt i OUR. A partir de l'instant en què apareix aquesta limitació, tot i que la mesura d'absorbància indica que hi segueix havent un creixement, encara que amb un pendent menor, les altres mesures (pH, oxigen dissolt, OUR) indiquen que hi ha hagut una frenada del metabolisme del cultiu. En un cultiu realitzat amb el sistema d'un únic minibioreactor emulant les condicions d'aquest experiment (resultats no mostrats) s'ha pogut comprovar que aquest augment d'absorbància no corresponia a l'augment de cèl·lules viables sinó a l'inici de mort cel·lular i aparició de *debris*. Aquest fet concorda amb bibliografia prèvia, on emprant mesures turbidimètriques s'observaven efectes similars (Gàmez, 2000; Behrendt i Col., 1994). A partir del seguiment de l'absorbància a 635 nm també es pot calcular la velocitat específica màxima de creixement. Realitzant el càlcul durant la fase exponencial de creixement (10-44 h), s'obté un valor de 0,0434 +/- 0,0009 h⁻¹ (que correspon a un temps de duplicació de 15,97 +/- 0,32 h).

El seguiment del pH mostra una acidificació progressiva mentre el cultiu creix de forma exponencial, molt similar per tots els minibioreactors, assolint valors màxims de 1,12 unitats de pH. Aquesta acidificació és deguda a la producció d'àcid làctic, la concentració del qual augmenta mentre el cultiu creix exponencialment (Gàmez, 2000), mentre que una vegada s'exhaureix la glutamina (a les 44 h de cultiu), la seva producció s'atura.

Pel que fa al seguiment de l'oxigen dissolt, la figura mostra que durant el cultiu ha estat sempre en valors elevats, no limitants, i donat que la freqüència d'aeració ha estat constant, la concentració ha mostrat una tendència similar a l'observada en el cas del pH. En aquest cas, s'ha anat reduint mentre la concentració cel·lular augmentava, mentre que una vegada s'ha exhaurit la glutamina, l'activitat metabòlica de les cèl·lules es redueix, de manera que la concentració d'oxigen dissolt torna a augmentar.

Referent al seguiment de la OUR, aquest mostra una tendència exponencial mentre el cultiu també creix de la mateixa forma. I una vegada s'assoleix la limitació de nutrients, els valors de OUR mostren una caiguda, reflectint la frenada metabòlica que sofreix el cultiu.

Finalment, donat el fet que es disposa de dades de concentració cel·lular i de consum d'oxigen, es considera interessant en casos com el present, on es caracteritza el creixement d'una línia cel·lular a una determinada condició de cultiu, el càlcul del consum específic d'oxigen. Aquest càlcul s'ha realitzat en la fase exponencial del cultiu, a partir de l'equació 4.1:

$$\text{OUR} = q_{\text{O}_2} \cdot X \quad \text{Eq. 4.1.}$$

S'ha obtingut un valor de 107,1 +/- 4,5 nmol / (10⁶ Cèl·l·xh), proper a valors obtinguts a la bibliografia per la línia cel·lular KB-26.5, de la qual deriva la línia BHRF1 emprada per aquest experiment, que pren com a valor 120 nmol / (10⁶ Cèl·l·xh) (Gámez, 2000).

A continuació es presenta a la taula 6.1.1 un resum dels paràmetres obtinguts en aquest experiment:

	Valor mitjà	Desviació estàndard
μ_m (h ⁻¹)	0,0434	0,0009
Acidificació (unitats pH)	1,12	0,10
OUR _{max} (mmol / (L·xh))	0,23	0,02
q _{O₂} nmol / (10 ⁶ Cèl·l·xh),	107,1	4,5

Taula 6.1.1. Recull dels paràmetres de creixement i activitat metabòlica per a l'experiment a sis condicions de cultiu idèntiques. Es presenta tant el valor mitjà entre els sis minibioreactors, com la desviació estàndard observada entre ells.

6.1.1.2. Creixement d'hibridomes a diferents concentracions de Foetal Calf Serum

En aquest experiment es realitzen cultius a tres condicions de creixement per tal d'avaluar si el sistema de minibioreactors detecta les diferències existents entre elles. En concret, s'han emprat tres concentracions diferents de sèrum (*Foetal Calf Serum*, FCS), que s'espera que portin a diferències tant en les corbes de creixement com en els altres paràmetres mesurats (pH, oxigen dissolt, OUR).

Tipus cel·lular

Cèl·lules de mamífer / suspensió

Línia cel·lular

Hibridoma BHRF1

Condicions del cultiu

- Medi: DMEM (D5796), suplementat amb L-glutamina (Sigma, G-5763) fins arribar a una concentració de 0,877 g/L, 0,5 mL/L insulina (Solució 4 UI/mL, Actrapid Novo), 0,5 mL/L β -mercaptoetanol (Solució 0,1 M, Sigma M-6250), i amb diferents concentracions de *Foetal Calf Serum* (FCS) (bioreactors r1, r2: 10% (v/v) FCS; r3, r4: 1% (v/v) FCS; r5, r6: 0% (v/v) FCS) (Biological Industries, Cat. 04-001-1A, Lot 415360)
- Inòcul: $2,0 \times 10^5$ Cèl·l./mL
- Agitació: 200 rpm
- Temperatura dels bioreactors: 37 °C
- Aeració: 0,2 slpm (5s cada 250s)
- Cabal N₂ per a la OUR: 0,4 slpm

Resultats

Tal com es pot veure a la figura 6.1.4, hi ha diferències significatives tant en el creixement com en el metabolisme dels cultius realitzats a diferents concentracions de FCS.

Els cultius sense FCS no mostren creixement, d'acord amb el que ens mostren les mesures d'absorbància, i molt poca activitat metabòlica (hi ha una acidificació de 0,09 unitats de pH, i consums d'oxigen màxims de 0,04 mmol/(L×h)).

Els cultius que han crescut amb un 1% (v/v) FCS mostren un creixement reduït, arribant a 0,1 unitats d'absorbància (equivalent a 8×10^5 Cèl·l./mL), i assolint consums d'oxigen (OUR) màxims de 0,13 mmol O₂/ (L×h). Si bé l'aturada del creixement mesurada a partir de l'absorbància a 635 nm s'observa a partir d'aproximadament 10 h, la mesura d'OUR (i també la d'oxigen dissolt) indiquen màxims d'activitat aproximadament a les 25-35 h de cultiu. D'altra banda la mesura de pH indica una acidificació progressiva (indicant que hi ha hagut activitat metabòlica) durant tot el cultiu, assolint una acidificació total de 0,70 unitats de pH. Sigui quina sigui la dinàmica d'aturada del creixement i activitat cel·lular, es considera que el factor que fa el creixement del cultiu

no segueixi una evolució similar a la del cultiu al 10% FCS és la manca dels factors de creixement que aporta el sèrum.

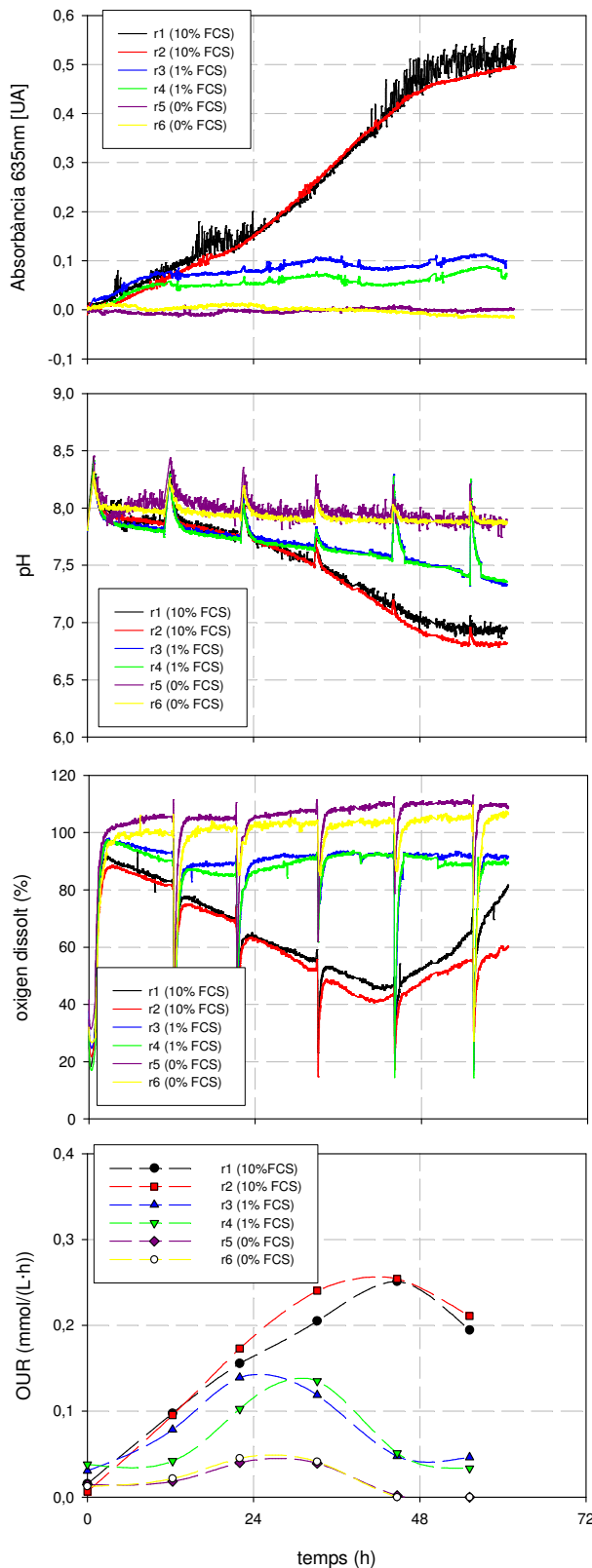


Figura 6.1.4. Perfils obtinguts en cultius d'hibridomes efectuats amb l'equip de sis minibioreactors, on s'utilitzen tres nivells de FCS, cadascun d'ells en dos minibioreactors (10% minibioreactors 1,2; 1% minibioreactors 3,4; 0% minibioreactors 5,6). OUR es refereix a Oxygen Uptake Rate. Els pics observats en els perfils de pH i oxigen dissolt corresponen als temps de monitorització de OUR, degut a la desorció de l'oxigen i el CO₂ provocades per la mesura.

Els cultius realitzats a un 10% (v/v) FCS, arriben a densitats òptiques d'aproximadament 0,5 unitats d'absorbància (equivalents a 30×10^5 Cèl·l./mL), acidificant aproximadament 1,10 unitats de pH, i assolint consums d'oxigen (OUR) màxims de 0,25 mmol O₂/(L×h). Aproximadament a les 48 h de cultiu s'arriba a una limitació en el medi de cultiu, que es veu reflectida en la reducció del consum d'oxigen (OUR) i la frenada en l'acidificació.

Així doncs, les diferents mesures realitzades (creixement, pH, oxigen dissolt i OUR) permeten observar diferències considerables entre els cultius a diferents concentracions de sèrum. El seguiment d'absorbància permet determinar les diferències en les concentracions cel·lulars màximes assolides a cada condició de cultiu. Com s'havia comentat anteriorment, a partir d'aquesta mesura es poden calcular les velocitats específiques de creixement. A continuació es presenten les principals diferències entre els cultius, que també es mostren de forma resumida a la taula 6.1.2. Prenent com a referència el tram en el qual el creixement del cultiu al 10% FCS ha estat exponencial (10-48 h), les velocitats específiques de creixement presenten valors mitjans de 0,0000 h⁻¹, 0,0104 h⁻¹, i 0,0431 h⁻¹, respectivament pels cultius al 0%, 1%, i 10% de FCS. El seguiment de pH mostra diferències d'acidificació remarcables, entre 0,18 unitats de pH per als cultius al 0% de FCS i 1,10 unitats de pH per als cultius al 10% de FCS. El seguiment d'oxigen mostra que si bé la reducció de la concentració d'oxigen respecte la saturació en aire ha estat molt reduïda en els casos de cultius al 0% i al 1% de FCS, la reducció en els casos de cultius al 10% de FCS han portat la concentració d'oxigen fins a valors mínims d'aproximadament el 40% de saturació. Finalment, la mesura de OUR també ha permès detectar les diferències de consums, essent molt propers a zero en tot moment (com a màxim 0,04 mmol O₂/(L×h)) per als cultius al 0% FCS, mentre que al 1% FCS s'assolien màxims de 0,13 mmol O₂/(L×h), i al 10% de FCS s'assolien valors màxims de 0,25 mmol O₂/(L×h).

	Percentatge FCS en el medi de cultiu		
	0%	1%	10%
μ (h ⁻¹)	0,0000	0,0104	0,0431
Acidificació (unitats pH)	0,18	0,70	1,10
OUR _{max} (mmol O ₂ /(L×h))	0,04	0,13	0,25

Taula 6.1.2. comparació dels paràmetres de creixement i metabolisme entre els cultius en el tram de creixement exponencial del cultiu al 10% FCS (10-48 h).

6.1.1.3. Comparació del creixement observat en cultius d'hibridomes amb medi DMEM amb sèrum, i amb medi sense sèrum (SFM)

En aquest experiment s'ha realitzat una comparació entre el creixement emprant un medi amb sèrum, i un medi sense sèrum, emprant tres minibioreactors per a cada condició.

L'interès per a realitzar aquesta comparació rau en el fet que si bé històricament els medis de cultiu amb sèrum havien estat àmpliament emprats per al cultiu de cèl·lules animals (Shacter, 1989), degut a que els productes obtinguts tenien aplicacions bàsicament per a diagnòstic, en els darrers anys cada vegada s'està desenvolupant un major nombre de productes per teràpia, on les regulacions existents fan que hi hagi dificultats per a que els medis a emprar continguin sèrum, de manera que s'han desenvolupat diferents medis sense sèrum (Drews i Hunt, 2010; Van der Valk i Col., 2010). Addicionalment, per a aplicacions de diagnòstic també cal tenir en compte que la presència d'albumina en el medi amb sèrum resulta problemàtica per a la purificació dels anticossos (quan aquests són el producte a recuperar).

Tipus cel·lular

Cèl·lules de mamífer / suspensió

Línia cel·lular

Hibridoma KB26.5

Condicions del cultiu

- Medi: *Serum Free Medium* (SFM GIBCO 12045) (minibioreactors 1, 2, 3), and DMEM (Sigma, D8062) suplementat amb un 10% de *Foetal Calf Serum* (FCS) (Biological Industries, Cat. 04-001-1A, Lot 415360) (minibioreactors 4, 5, 6)
- Inòcul: $1,9 \times 10^5$ Cèl·l./mL
- Agitació: 200 rpm
- Temperatura dels bioreactors: 37 °C
- Aeració: 0,2 slpm (5s cada 250s)
- Cabal N₂ per a la OUR: 0,4 slpm

Resultats

Tal com es pot veure a la figura 6.1.5, les corbes de creixement (a partir del seguiment d'absorbància) no mostren diferències significatives entre SFM i DMEM 10% FCS, si

bé si ens mirem els indicadors metabòlics (acidificació i Oxygen Uptake Rate) si que es veuen certes diferències, que es comenten a continuació.

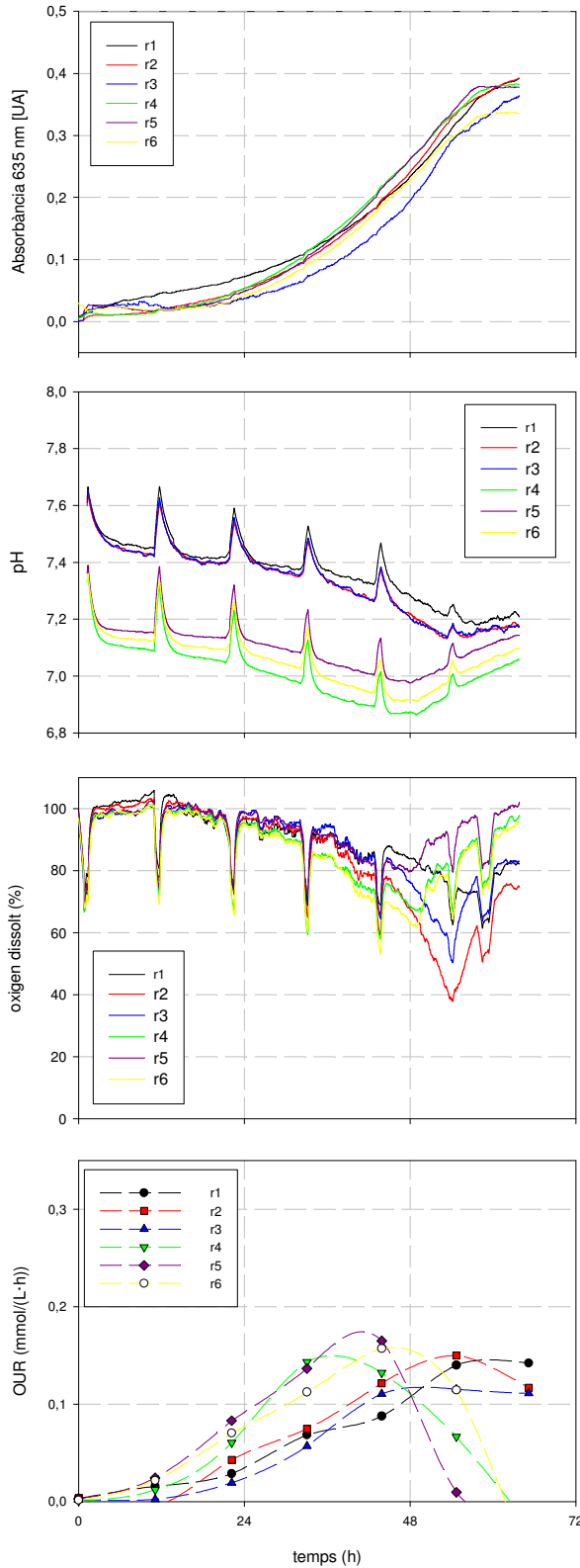


Figura 6.1.5. Perfils obtinguts en cultius d'hibridomes efectuats amb l'equip de sis minibioreactors, emprant dos medis diferents, un d'ells amb sèrum i l'altre sense. Els medis emprats foren SFM (reactors 1,2,3) i DMEM 10% FCS (reactors 4,5,6). OUR es refereix a Oxygen Uptake Rate. Els pics observats en pH i oxigen dissolt corresponen als temps de monitorització de OUR, degut a la desorció de l'oxigen i el CO_2 provocades per la mesura.

Els cultius en medi SFM permet assolir densitats òptiques d'aproximadament 0,37 UA (equivalent a 23×10^5 Cèl·l./mL), una acidificació màxima de 0,32 pH unitats, i OUR màximes al voltant de 0,13 mmol O₂/(L×h). El cultiu arriba al final del seu creixement cap a les 54 h de cultiu, tal com es veu reflectit en l'evolució del pH, concentració i consum d'oxigen.

Els cultius en medi DMEM 10% FCS permet assolir densitats òptiques d'aproximadament 0,36 UA (equivalent a 22×10^5 Cèl·l./mL), una acidificació de 0,24 unitats de pH, que a les 48 h de cultiu canvia la tendència i a partir d'aquest punt hi ha una basificació de 0,18 unitats de pH. Els valors de OUR màxims es situen a 0,15 mmol O₂/(L×h).

Per a una millor comparació de les dades obtingudes en ambdues condicions, a continuació es discutiran les dades en el tram de creixement exponencial, és a dir, entre les 12 i 55 h. Aquestes dades es troben de forma resumida a la taula 6.1.3.

Tal com s'ha comentat, les similituds observades entre les corbes de creixement (absorbància a 635 nm) dels cultius creixent en medi DMEM i SFM són elevades, i el càlcul de les velocitats específiques màximes de creixement (en el tram exponencial) també dona valors força semblants, sobretot si es té en compte la barra d'error existent. Així les velocitats específiques màximes de creixement mitjanes calculades per als cultius amb SFM i DMEM són de 0,0465 h⁻¹ i 0,0495 h⁻¹, respectivament.

D'altra banda, fent referències a les diferències observades en l'evolució del pH, cal tenir en compte que en el medi SFM el pH inicial està al voltant de pH = 7,48, mentre que en DMEM aquest valor està al voltant de pH = 7,15. L'acidificació observada en ambdós medis segueix patrons similars, essent més intensa en el medi SFM. En el tram de creixement exponencial (12-55 h), l'acidificació en medi SFM, de mitjana, és de 0,32 unitats de pH, mentre, que en DMEM el canvi de pH és de 0,24 unitats. Una altra diferència apareix en els temps d'exhauriment d'algun dels nutrients que implica una inversió de la tendència, d'acidificació a basificació. Mentre en medi DMEM aquest canvi succeeix aproximadament a les 48 h de cultiu (quan la glutamina s'exhaureix), en medi SFM aquest passa aproximadament a les 54 h de cultiu (el nutrient exhaurit no s'ha identificat, al no conèixer la composició del medi).

Referent a l'oxigen dissolt, les diferències en el canvi de tendència són similars a les observades en el cas del pH. Així, mentre en medi DMEM aquest canvi succeeix aproximadament a les 48h de cultiu, en medi SFM aquest passa aproximadament a les 54 h de cultiu.

Uns patrons similar s'observen en l'evolució del consum d'oxigen (OUR). En medi DMEM, el valor màxim de OUR s'assoleix aproximadament a les 43 h de cultiu (la propera mesura es produeix a les 54 h, de manera que una identificació acurada del punt màxim no es pot dur a terme), i d'aquest punt en endavant hi ha una reducció pronunciada del consum. En medi SFM, el valor màxim de OUR s'assoleix aproximadament a les 54 h de cultiu, però en aquest cas, a partir d'aquest punt no es produeix una reducció tant pronunciada com l'observada en medi DMEM. Els valors de OUR màxims assolits són de 0,13 i 0,15 mmol O₂/(L×h) per a SFM i DMEM, respectivament.

	medi de cultiu	
	SFM	DMEM
μ_m (h ⁻¹)	0,0465 +/- 0,0017	0,0495 +/- 0,0013
Acidificació (unitats pH)	0,32 +/- 0,03	0,24 +/- 0,03
OUR _{max} (mmol O ₂ /(L×h))	0,13 +/- 0,018	0,15 +/- 0,017

Taula 6.1.3. comparació dels paràmetres de creixement i metabolisme entre els cultius en el tram de creixement exponencial del cultiu (12-55 h). En el cas dels valors d'acidificació, es presenten els valors fins que hi ha un canvi de tendència en l'evolució del pH.

6.1.1.4. Comparació del creixement observat en cultius d'hibridomes amb medi DMEM amb sèrum, i amb medi definit per a hibridomes (CD)

En aquest experiment s'ha repetit novament una comparació entre el comportament de cultiu realitzats amb un medi amb sèrum, i amb un altre medi sense sèrum (en aquest cas emprant la referència CD de Gibco), emprant tres minibioreactors per a cada condició.

Tipus cel·lular

Cèl·lules de mamífer / suspensió

Línia cel·lular

Hibridoma KB26.5

Condicions del cultiu

- Medi: DMEM (Sigma, D8062) suplementat amb 10% de *Foetal Calf Serum* (FCS) (Biological Industries, Cat. 04-001-1A, Lot 415360) (bioreactors r1, r2, r3), CD (*chemically defined medium for hybridomas*, GIBCO cat. No.112794) (bioreactors r4, r5, r6)
- Inòcul: $1,8 \times 10^5$ Cèl·l./mL
- Agitació: 200 rpm
- Temperatura dels bioreactors: 37 °C
- Aeració: 0,2 slpm (5s cada 250s)
- Cabal N₂ per a la OUR: 0,4 slpm

Resultats

Tal com es pot veure a les gràfiques de la figura 6.1.6, hi ha diferències significatives en el creixement i metabolisme entre els cultius crescuts en medi CD i en medi DMEM 10% FCS.

Els cultius en medi DMEM 10% FCS assoleixen densitats òptiques de 0,37 UA (equivalent a 22×10^5 Cèl·l./mL) una acidificació de 0,15 pH unitats de pH, i valors màxims de consum d'oxigen (OUR) de voltant de 0,18 mmol O₂/(L×h).

Els cultius en medi CD assoleixen densitats òptiques d'aproximadament 0,17 UA (equivalent a 10×10^5 Cèl·l./mL), i valors màxims de consum d'oxigen (OUR) de 0,11 mmol O₂/(L×h). En aquest cas, la variació del pH ha estat molt reduïda i, a diferència del que s'havia vingut observant en la majoria dels cultius realitzats, no s'ha observat acidificació.

Passant a discutir de forma detallada cadascuna de les mesures realitzades, ja s'ha comentat que la mesura d'absorbància (635 nm) ha permès observar diferències notables entre les corbes de creixement en medi CD i DMEM. Quantificant aquestes diferències mitjançant el càlcul de la velocitat específica màxima de creixement en el tram en què el cultiu ha mostrat un creixement exponencial (10-48 h), les dades obtingudes són de 0,0452 i 0,0325 h⁻¹ per als cultius amb medi DMEM i CD, respectivament. Novament, el recull comparatiu de dades entre ambdues condicions de cultiu es presenten en forma de taula (6.1.4).

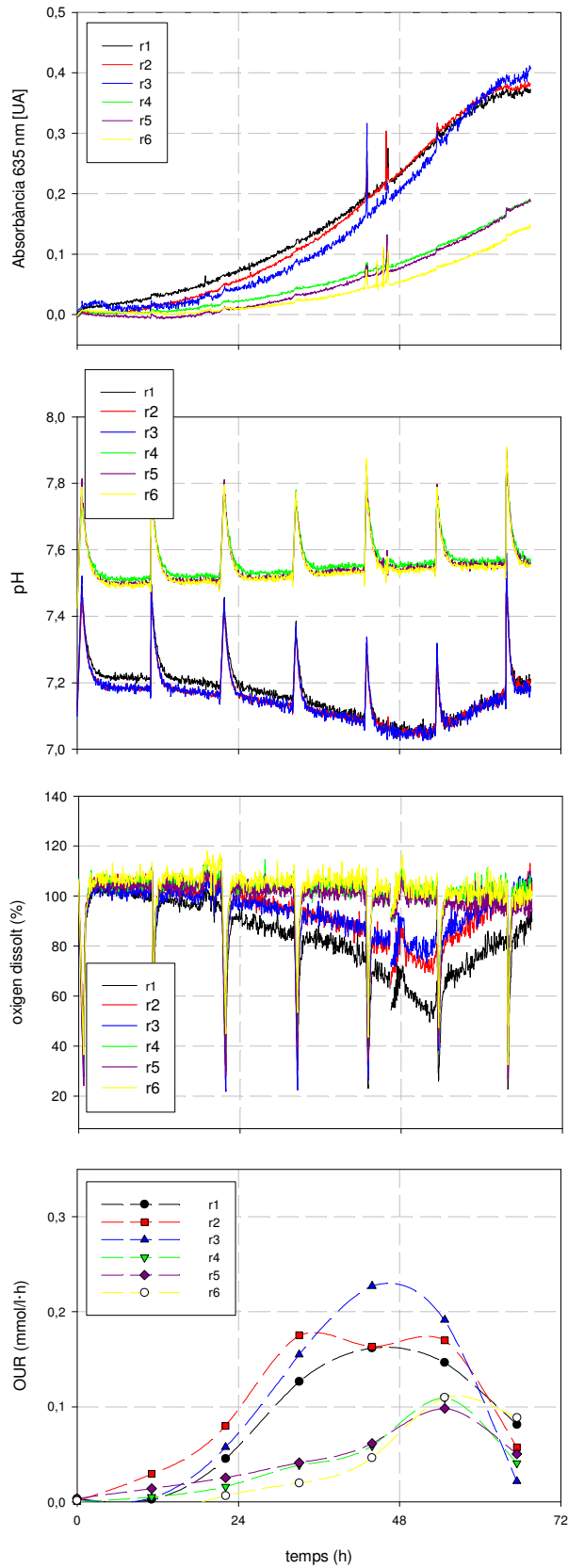


Figura 6.1.6. Perfils obtinguts en cultius d'hibridomes efectuats amb l'equip de sis minibioreactors, emprant dos medis diferents, un d'ells amb sèrum i l'altre sense. Els medis emprats foren DMEM 10% FCS (minibioreactors 1,2,3), i medi CD (minibioreactors 4, 5, 6). OUR es refereix a Oxygen Uptake Rate. Els pics observats en pH i oxigen dissolt corresponen als temps de monitorització de OUR, degut a la desorció de l'oxigen i el CO_2 provocades per la mesura.

Referent a l'evolució del pH, el seguiment d'aquesta variable permet observar diferències significatives en els comportaments en cadascun dels medis emprats. En el tram de creixement exponencial (10-48 h) en medi DMEM s'observa una acidificació (passant de $\text{pH} \approx 7,2$ a $\text{pH} \approx 7,05$), fins que aproximadament a les 48 h amb la frenada del cultiu, aquesta tendència s'inverteix. En canvi, en medi CD el menor creixement combinat amb la possible presència d'un tampó més fort ha implicat que no s'observés acidificació sinó que s'ha observat fins i tot una certa basificació, probablement deguda a la tendència del tampó a assolir el seu punt d'equilibri. Desconeixent els components del medi de cultiu CD cal remarcar que els comentaris realitzats són simplement hipòtesis, però que podrien ésser comprovades si se'n conegués la composició.

Referent a l'evolució de la mesura d'oxigen dissolt, aquest seguiment mostra que la concentració present en els cultius creixent en medi CD s'ha mantingut força estable en tot moment, de manera que els consums d'oxigen probablement també hauran estat reduïts (caldrà comprovar aquesta hipòtesi amb les dades de OUR). D'altra banda la major activitat metabòlica dels cultius en medi DMEM provoca que les concentracions d'oxigen dissolt es redueixin progressivament fins assolir valors de 60-80% de saturació. A partir d'aquest moment, la disminució del metabolisme dels cultius porta a que els valors d'oxigen dissolt observats augmentin fins aproximar-se a valors del 100% de saturació.

Relacionat amb l'oxigen dissolt, la mesura de la OUR mostra que en medi DMEM novament la tendència presenta una evolució exponencial, que s'atura i cau a partir de que el cultiu arriba a una limitació, aproximadament a les 48 h de cultiu. En medi CD, l'evolució presenta un increment molt més lent de la OUR, que assoleix els seus valors màxims a les 54 h, moment a partir del qual tornen a caure els valors de OUR mesurats.

	medi de cultiu	
	CD	DMEM
μ_m (h^{-1})	0,0325 +/- 0,0066	0,0452 +/- 0,0042
Acidificació (unitats pH)	-0,06 +/- 0,01	0,15 +/- 0,02
OUR _{max} (mmol O ₂ /(L×h))	0,11 +/- 0,007	0,18 +/- 0,04

Taula 6.1.4. comparació dels paràmetres de creixement i metabolisme entre els cultius en el tram de creixement exponencial del cultiu (10-48 h). En el cas dels valors d'acidificació, es presenten els valors fins que hi ha un canvi de tendència en l'evolució del pH.

6.1.1.5. Avaluació de la utilització de Neomicina per a la selecció de cèl·lules que no hagin incorporat un gen de protecció contra aquest antibiòtic

En aquest experiment es planteja estudiar la concentració de neomicina necessària per fer una selecció d'una línia cel·lular. La línia d'hibridoma que es vol seleccionar ha estat transformada amb un plàsmid, que integrat al material genètic de la cèl·lula, confereix resistència a neomicina, que no era present a la línia cel·lular originària. Conseqüentment, per a fer una selecció de la línia que hagi integrat el plàsmid la selecció es realitza amb neomicina. En aquest experiment s'estudia la concentració de l'antibiòtic necessària per eliminar les cèl·lules no transformades.

Tipus cel·lular

Cèl·lules de mamífer / suspensió

Línia cel·lular

Hibridoma KB-26.5

Condicions del cultiu

- Medi: DMEM (Sigma, D-5030), suplementat amb L-glutamina (Sigma, G-5763) fins arribar a una concentració de 0,877 g/L, 0,5 mL/L insulina (Solució 4 UI/mL, Actrapid Novo), 0,5 mL/L β -mercaptoetanol (Solució 0,1 M, Sigma M-6250), suplementat amb 10% de *Foetal Calf Serum* (FCS) (Biological Industries, Cat. 04-001-1A, Lot 415360), i amb diferents concentracions de neomicina (G418) (r1, r2: 3000 mg/L; r3, r4: 1000 mg/L; r5, r6: 0 mg/L (bioreactors r1, r2, r3)
- Inòcul: $1,8 \times 10^5$ Cèl·l./mL
- Agitació: 200 rpm
- Temperatura dels bioreactors: 37 °C
- Aeració: 0,2 slpm (5 s cada 250 s)
- Cabal N₂ per a la OUR: 0,4 slpm

Resultats

Tal i com s'observa a la figura 6.1.7, hi ha diferències en el creixement a diferents concentracions de neomicina. Mentre els cultius que creixen a 1000 mg/L de neomicina mostren una certa diferència, tant en creixement com en metabolisme (acidificació), les diferències més grans s'observen en els cultius que tenen 3000 mg/L de neomicina al medi, casos on el creixement és molt reduït, i l'acidificació és pràcticament inexistent.

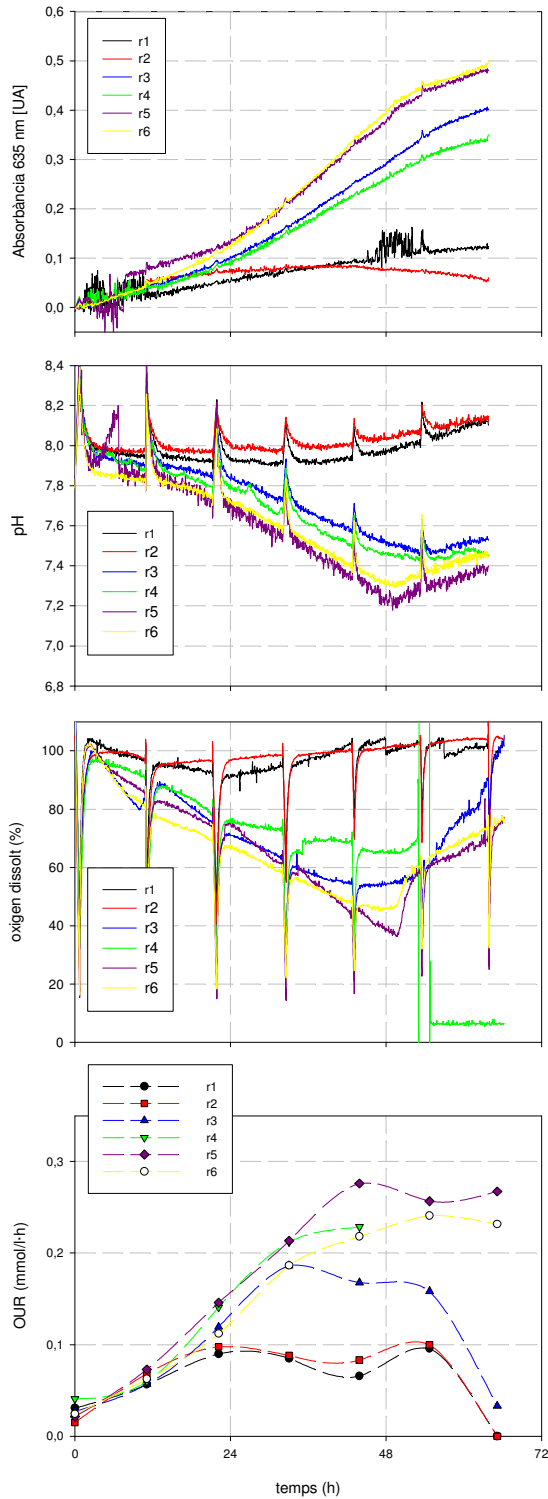


Figura 6.1.7. Perfils obtinguts en cultius d'hibridomes efectuats amb l'equip de sis minibioreactors. El medi emprat fou DMEM 10% FCS, suplementat amb diferents concentracions de neomicina (G418) (r1, r2: 3000 mg/L; r3, r4: 1000 mg/L; r5, r6: 0 mg/L). OUR es refereix a Oxygen Uptake Rate. Els pics observats en pH i oxigen dissolt corresponen als temps de monitorització de OUR, degut a la desorció de l'oxigen i el CO₂ provocades per la mesura.

Els cultius en medi sense neomicina assoleixen densitats òptiques de 0,49 UA de mitjana (equivalent a $31,5 \times 10^5$ Cèl·l./mL) una acidificació màxima de 0,63 unitats de pH, i valors màxims mitjans de consum d'oxigen (OUR) de 0,25 mmol O₂/(L×h). Comparant l'acidificació amb altres observades anteriorment (com per exemple, en els experiments 1 i 2), s'observa que és menor, però cal tenir en compte que en aquest cas es treballa amb una línia cel·lular d'hibridoma diferent.

Els cultius en medi amb 1000 mg/L de neomicina assoleixen densitats òptiques d'aproximadament 0,38 UA de mitjana (equivalent a $21,0 \times 10^5$ Cèl·l./mL). De totes maneres, cal tenir en compte que la variabilitat entre els dos reactors a aquesta concentració de neomicina ha estat elevada (respectivament, els reactors 3 i 4 assolien absorbàncies de 0,42 i 0,35 UA). Els valors màxims de consum d'oxigen (OUR) al voltant de 0,20 mmol O₂/(L×h). Cal tenir en compte però, que aproximadament a les 48 h, la membrana sensora d'oxigen del reactor 4 s'ha desenganxat del reactor, de manera que no es poden avaluar mesures més enllà d'aquest punt, i també les anteriors presenten la incertesa de l'estat de la membrana. L'acidificació ha estat de mitjana (entre els dos reactors) de 0,52 unitats de pH, avaluada fins el punt on s'atura i torna a haver-hi una certa basificació.

Els cultius en medi amb 3000 mg/L de neomicina assoleixen densitats òptiques d'aproximadament 0,09 UA de mitjana (equivalent a $6,1 \times 10^5$ Cèl·l. totals/mL, avaluades com a cèl·lules totals deguda la reduïda viabilitat). Els valors màxims de consum d'oxigen (OUR) al voltant de 0,10 mmol O₂/(L×h). En aquest cas, de forma coherent amb el creixement reduït, no s'ha mesurat una l'acidificació significativa.

Passant a discutir de forma detallada cadascuna de les mesures realitzades, novament es presenta una comparació en el tram de creixement exponencial (12-48 h), que es presenten de forma resumida a la taula 6.1.5.

Referent a la mesura d'absorbància (635 nm), aquesta ha permès observar diferències entre les corbes de creixement sense, amb 1000 mg/L, i 3000 mg/L de neomicina. Quantificant aquestes diferències mitjançant el càlcul de la velocitat específica de creixement en el tram de creixement exponencial del cultiu sense neomicina, les dades obtingudes són de 0,044 h⁻¹, 0,041 h⁻¹, 0,016 h⁻¹ per als cultius amb 0, 1000 mg/L i 3000 mg/L, respectivament.

Referent a l'evolució del pH, el seguiment d'aquesta variable permet observar diferències significatives en els comportaments en cadascun dels medis emprats. Així,

les acidificacions màximes en cada cas són de 0,63, 0,52, i -0,2 unitats de pH per als cultius amb 0, 1000 mg/L i 3000 mg/L, respectivament.

Referent a l'evolució de la mesura d'oxigen dissolt, més enllà de les diferències observades entre els cultius a diferents concentracions de neomicina, que són coherents amb les diferències observades a partir de les altres mesures, cal destacar com a incidència el desenganxament d'una de les membranes.

Relacionat amb l'oxigen dissolt, la mesura de la OUR mostra també les diferències entre les diferents condicions de cultiu. De totes maneres, si bé aquesta diferència és molt notable entre els cultius amb 3000 mg/L de neomicina i els altres casos, en els altres casos no és tant evident. Així, les diferències entre els cultius sense i amb 1000 mg/L de neomicina no són tant evidents. Entre les 0 i 33 h la diferència existent és molt reduïda (a les 33 h la diferència és del 0,3%), si bé a partir d'aquest punt la diferència augmenta, en part degut també a la dispersió entre les dades a 1000 mg/L neomicina.

	Conc. neomicina en el medi de cultiu		
	0 mg/L	1000 mg/L	3000 mg/L
μ (h^{-1})	0,044	0,041	0,016
Acidificació (unitats pH)	0,54	0,41	-0,2
OUR _{max} (mmol O ₂ /(L×h))	0,25	0,20	0,10

Taula 6.1.5. comparació dels paràmetres de creixement i metabolisme entre els cultius en el tram de creixement exponencial del cultiu al 10% FCS (12-48 h). En el cas dels valors d'acidificació, es presenten els valors fins que hi ha un canvi de tendència en l'evolució del pH.

6.1.2. Creixement en adherència

Abans de passar a descriure la realització d'experiments amb cèl·lules adherents amb el sistema de sis minibioreactors, es presenta un apartat de desenvolupament del tractament del material plàstic. Cal tenir en compte que el plàstic emprat per als minibioreactors (PE cristall) no ha rebut cap tractament per a acumular càrregues que afavoreixin l'adhesió cel·lular, mentre que tant les plaques com els flascons de cultiu comercials, es sotmeten a tractaments per tal de maximitzar l'adhesió de diferents tipus cel·lulars. Cal, per tant, fer un tractament dels minibioreactors plàstics del sistema de sis minibioreactors per tal d'afavorir l'adhesió cel·lular.

6.1.2.1. Proves d'adherència sobre els materials plàstics emprats pel sistema de sis minibioreactors

Per tal de posar a punt els minibioreactors pel cultiu amb cèl·lules adherents, cal decidir quin és el millor tractament pel plàstic perquè l'adhesió cel·lular sigui òptima. És per això que s'han realitzat una sèrie d'experiments amb minibioreactors sotmesos a diferents tractaments. L'experiment s'ha realitzat amb dos tipus cel·lulars: un que s'adhereix fàcilment sobre superfícies de cultiu (Cèl·lules Vero), i un altre de més exigent per a poder adherir-se, mostrar la morfologia adequada, i créixer (condròcits humans).

Els diferents tipus de tractaments que existeixen al mercat es presenten a continuació (taula 6.1.6):

Físics	Químics	Radiació
Adsorció <i>Langmuir-Blodgett film</i>	Oxidació amb àcids forts Tractament amb ozó <i>Chemisorption</i> <i>Flame treatment</i>	Plasma <i>Corona discharge</i> Foto-activació Laser <i>Ion-beam</i> <i>Electron beam</i> Radiació gamma

Taula 6.1.6. Tractaments de materials sintètics per tal de modificar-ne les característiques superficials i afavorir l'adhesió cel·lular. En cursiva, les paraules amb anglès que no s'ha traduït per tal de no causar confusions. Font: AST Products Technical Bulletin

D'entre aquests tractaments, els que s'han seleccionat de cara a avaluar la seva funcionalitat han estat l'activació química del plàstic (àmpliament coneguda i de fàcil realització a nivell de laboratori), i l'activació per tractament amb plasma (el més àmpliament utilitzat per a la manufactura de plàstics de cultiu, i que permet obtenir una gran versatilitat funcional amb superfícies plàstiques a tractar).

El tractament químic emprat contempla la utilització de substàncies altament oxidants (H_2O_2 i H_2SO_4) a altes temperatures per a la generació de radicals OH^\cdot a la superfície del plàstic.

El tractament de plasma utilitzat ha estat el d'oxigen, que provoca un canvi en l'angle de contacte del material, així com una major càrrega d'aquest (mitjançant radicals OH^\cdot).

La realització d'aquest tractament ha estat efectuada a les instal·lacions de Diener Electronic GmbH (Nagold, Alemanya).

Així, en l'experiment que es planteja, s'ha realitzat cultius amb els següents sistemes:

- i. 5 minibioreactors individuals amb un tractament d'activació per plasma
- ii. 6 minibioreactors individuals amb un tractament d'activació químic
- iii. 6 minibioreactors individuals sense tractament d'activació (control negatiu)
- iv. 2 plaques de 6 pous (Orange Scientific, 2030500) (control positiu)

El volum de treball ha estat de 3 mL, els minibioreactors han operat sense agitació, i els inòculs han estat de 1×10^4 Cèl·l./cm² per les cèl·lules Vero i 5×10^3 Cèl·l./cm² per als condrocits humans.

6.1.2.1.1. Cultiu amb cèl·lules Vero

Tal com s'observa a la figura 6.1.8, independentment del tractament aplicat al plàstic, en tots els cultius amb cèl·lules Vero, s'arriba a la mateixa concentració cel·lular final (aproximadament $3,2 \times 10^5$ Cèl·l./cm²).

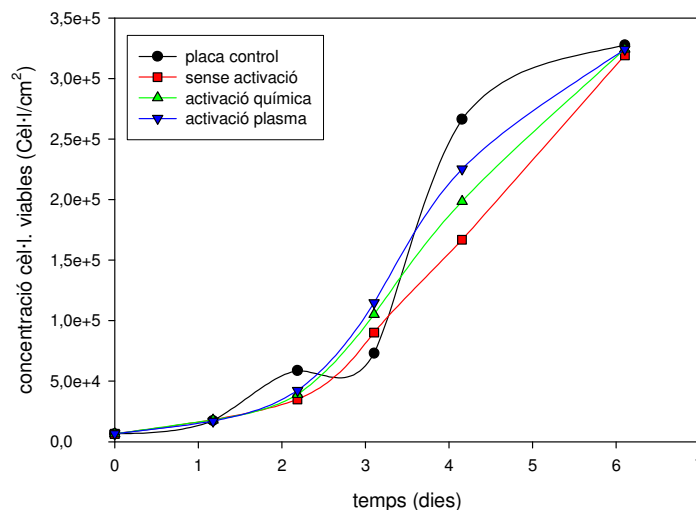


Figura 6.1.8. Creixement de cèl·lules Vero en minibioreactors individuals sotmesos a diferents tractaments superficials.

Tal com s'ha comentat, les densitats cel·lulars finals a les quals s'arriba són pràcticament idèntiques en tots els casos, hi hagi tractament amb activació química, amb plasma, o no hi hagi tractament. Veient aquests resultats, es pot concloure que aquest

model cel·lular presenta una gran facilitat per adherir-se a les superfícies. Addicionalment, el càlcul de les velocitats específiques màximes de creixement (μ_m) mostra que les diferències observades entre els cultius és reduïda, tal com es pot veure a la taula 6.1.7.

	μ_m (h^{-1})	Temps de duplicació (h)
Placa control (Orange Scientific, 2030500)	0,363	19,1
Sense tractament	0,333	20,8
Tractament químic	0,350	19,8
Tractament plasma	0,367	18,9

Taula 6.1.7. Velocitat de creixement i temps de duplicació per a les diferents condicions dels cultius realitzats amb cèl·lules Vero.

6.1.2.1.2. Cultiu amb condrocits humans

Tal com s'observa a la figura 6.1.9, en el cas de cultius amb condrocits humans, tant en els plàstics tractats per activació química com en els tractats per plasma, s'obtenen creixements comparables als del control. En aquest cas però, i a diferència de l'observat amb cèl·lules Vero, segons els resultats és imprescindible que els plàstics de cultiu tinguin un tractament de superfície per tal de que es puguin adherir, ja que tal com s'observa, quan el plàstic no ha estat sotmès a cap tractament, les cèl·lules no s'han adherit i, per tant, no han crescut.

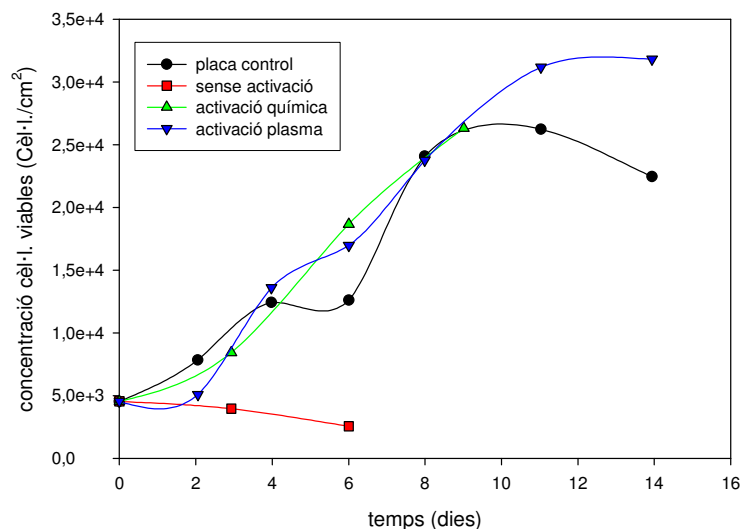


Figura 6.1.9. Creixement de condrocits humans en minibioreactors individuals sotmesos a diferents tractaments superficials.

De la mateixa manera que s'havia realitzat amb l'experiment amb cèl·lules Vero, també es presenta una taula (6.1.8) amb les velocitats específiques màximes de creixement (μ_m) calculades a partir de les corbes anteriors.

	μ_m (h^{-1})	Temps de duplicació (h)
Placa control (Orange Scientific, 2030500)	0,0079	87,6
Sense tractament	0*	0*
Tractament químic	0,0083	83,2
Tractament plasma	0,0088	79,2

Taula 6.1.8. Velocitat específica màxima de creixement i temps de duplicació per a les diferents condicions dels cultius realitzats amb condrocits humans (* No hi ha hagut creixement).

Tal com s'observa a la taula, els resultats obtinguts en la placa de control i els minibioreactors amb tractament d'activació (ja sigui química o per plasma) són molt similars.

Havent avaluat dos models cel·lulars molt diferents pel que fa als seus requeriments superficials per tal d'adherir-se i créixer, es pot concloure que els tractaments d'activació química i per plasma d'oxigen presenten una funcionalitat molt similar. Per tant, pot emprar-se qualsevol dels dos per a seguir treballant amb cèl·lules adherents.

En aquest treball s'ha escollit seguir treballant amb activació per plasma d'oxigen, ja que no requereix la utilització d'àcids forts, permet una industrialització més fàcil, i una major reproduïbilitat en el tractament dels plàstics.

6.1.2.2. Cultius adherents amb el sistema de sis minibioreactors

Havent seleccionat quin serà el tractament superficial al que es sotmetrà els plàstics de cultiu del sistema de sis minibioreactors, de cara a realitzar l'experimentació amb cèl·lules adherents, s'ha realitzat una selecció de models cel·lulars. Així, s'ha escollit dos models productius àmpliament emprats, com són les cèl·lules Vero i les cèl·lules HEK293.

Abans de passar a mostrar els resultats dels creixements en el sistema de sis minibioreactors, cal comentar que l'evolució de l'absorbància no es presenta en les figures, ja que les cèl·lules s'adhereixen al fons dels pous, i de forma no completament homogènia. Així doncs, la mesura d'absorbància es veu interferida per les cèl·lules adherides i no és representativa del creixement del cultiu.

6.1.2.2.1. Comparació de l'evolució de cultius de cèl·lules Vero partint de diferents inòculs

En aquest experiment es pretén observar la influència de l'inòcul sobre el creixement de cèl·lules Vero en medi GMEM. A nivell operatiu, cal comentar que previ inici del cultiu en l'equip de sis minibioreactors, hi ha hagut una etapa prèvia d'adhesió de les cèl·lules al plàstic de cultiu. Així, les cèl·lules es van inocular a través dels sèptums, es van deixar sedimentar i adherir al fons dels reactors durant aproximadament 14 h, i finalment es van situar a l'estació de treball del sistema de minibioreactors, on es va realitzar la monitorització de l'evolució dels cultius (temperatura, pH, oxigen dissolt, OUR).

Tipus cel·lular

Cèl·lules de mamífer / adherents

Línia cel·lular

Vero

Condicions de cultiu

- Medi: GMEM (GIBCO, 21710025) suplementat amb el 10% de sèrum fetal boví (FBS, SIGMA F9665, lot 058K336)
- Inòcul: 2 reactors s'inocularen a 10×10^4 Cèl·l./cm² (r1, r2), altres 2 s'inocularen a 5×10^4 Cèl·l./cm² (r3, r4), i els altres dos a $2,5 \times 10^4$ Cèl·l./cm² (r5, r6).
- Agitació: 200 rpm
- Temperatura dels bioreactors: 37 °C
- Aeració: 0,2 slpm (5s cada 250s)
- Cabal N₂ per a la OUR: 0,4 slpm

Resultats

Tal com mostra la figura 6.1.10, hi ha una correlació entre l'inòcul emprat i l'activitat metabòlica mesurada. Aquesta es manifesta principalment en la variació de pH, que presenta major acidificació a inòculs majors. Així, els cultius inoculats a 10×10^4 Cèl·l./cm² mostren una acidificació major (0,27 unitats de pH) comparada als altres cultius, existint un descens gradual en les tendències d'acidificació en els cultius

inoculats a 5×10^4 Cèl·l./cm² (amb una acidificació de 0,20 unitats de pH) i a $2,5 \times 10^4$ Cèl·l./cm² (amb una acidificació de 0,10 unitats de pH), respectivament. Aquestes dades d'acidificació són coherents amb les densitats cel·lulars mesurades fora de línia al final del cultiu, que mostren valors de $2,9 \times 10^5$ Cèl·l./cm², $6,3 \times 10^5$ Cèl·l./cm², i $7,4 \times 10^5$ Cèl·l./cm² respectivament, per als cultius amb inòculs $2,5 \times 10^4$ Cèl·l./cm², 5×10^4 Cèl·l./cm², i 10×10^4 Cèl·l./cm².

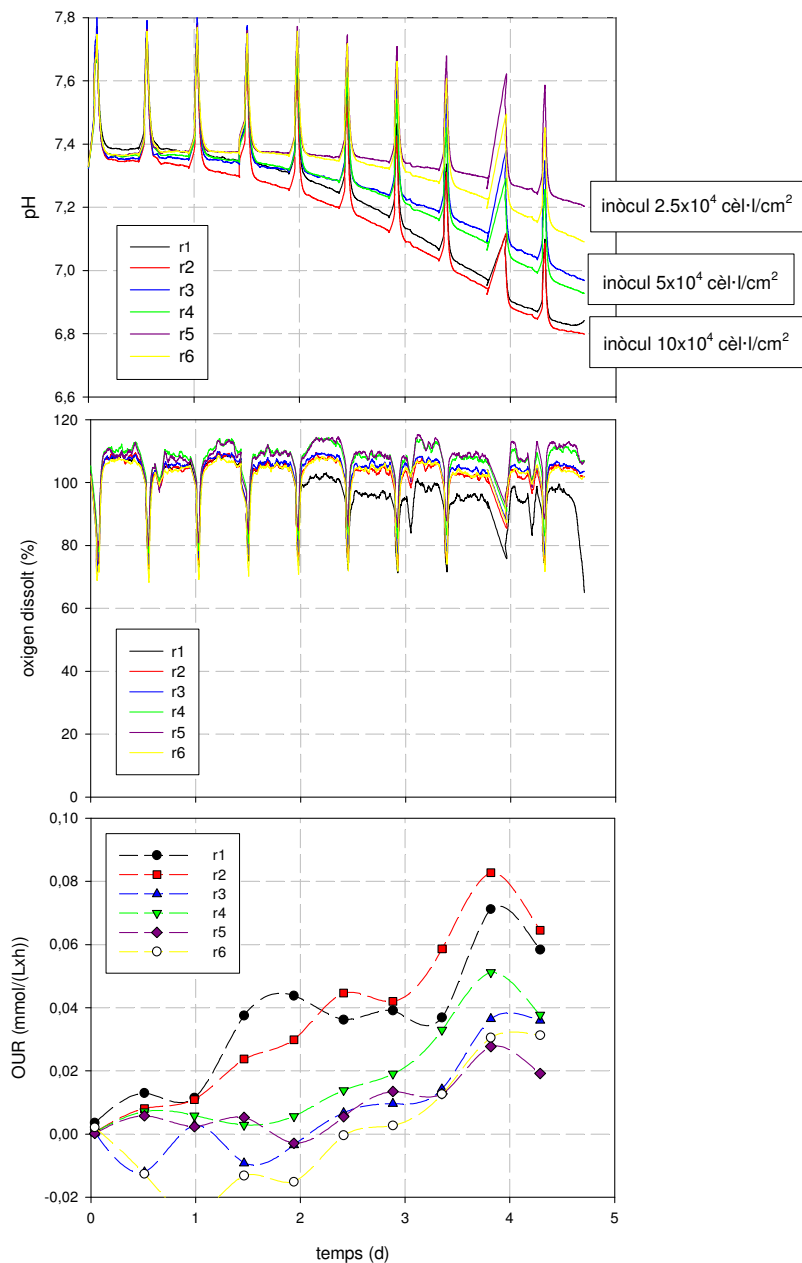


Figura 6.1.10. Perfils obtinguts en cultius de cèl·lules Vero efectuats amb l'equip de sis minibioreactors, en medi GMEM, amb diferents inòculs (10×10^4 Cèl·l./cm² reactors 1,2; 5×10^4 Cèl·l./cm² reactors 3,4; $2,5 \times 10^4$ Cèl·l./cm² reactors 5,6). OUR es refereix a Oxygen Uptake Rate. Els pics observats en pH i oxigen dissolt corresponen als temps de monitorització de OUR, degut a la desorció de l'oxigen i el CO₂ provocada per la mesura.

Les concentracions d'oxigen s'han mantingut relativament constants, de manera que els consums dels cultius han estat menors comparats amb els observats amb la majoria de cultius en suspensió realitzats. Bàsicament, aquest fet és degut a que les concentracions de cèl·lules totals han estat força més reduïdes que en els casos de cultius en suspensió amb que s'havia treballat: les concentracions de cèl·lules totals en aquest cultiu han estat com a màxim d'uns 9 milions de cèl·lules viables totals, mentre que al cultiu realitzat amb cèl·lules d'hibridoma creixent en tots els minibioreactors a les mateixes condicions s'assoleixen uns 36 milions de cèl·lules viables totals.

El seguiment del consum d'oxigen (OUR) mostra diferències metabòliques entre els cultius. De totes maneres, dos de les tres condicions de cultiu (inòculs baixos) no arriben a consums per sobre de 0,05 mmol O₂/(L×h), que estan a prop del límit de detecció per a la OUR. Conseqüentment, no s'han observat diferències significatives entre els cultius amb inòculs baixos.

6.1.2.2.2. Comparació de l'evolució de cultius de cèl·lules HEK293 creixent sobre microcarriers, partint de diferents inòculs

En aquest experiment s'han realitzat cultius de cèl·lules HEK293 en medi DMEM 10% FBS, creixent sobre microcarriers Cytodex3, emprant diferents inòculs. Novament la finalitat ha estat observar quines eren les diferències en les corbes de creixement degudes a la utilització de diferents inòculs. Degut a que s'ha treballat amb microcarriers, a nivell operatiu cal fer esment a que posteriorment a la inoculació dels minibioreactors, es va passar una etapa d'adherència (6 h) de les cèl·lules als microcarriers, en la qual s'ha activat l'agitació cada 30 min durant 30 s. Passada aquesta etapa, s'ha arrencat l'etapa de monitorització dels cultius (temperatura, pH, oxigen dissolt, OUR).

Tipus cel·lular

Cèl·lules de mamífer / adherents

Línia cel·lular

HEK293

Condicions de cultiu

- Medi: DMEM (D5796), suplementat amb L-glutamina (Sigma, G-5763) fins arribar a una concentració de 0,877 g/L, 0,5 mL/L insulina (Solució 4 UI/mL, Actrapid

Novo), 0,5 mL/L β -mercaptoetanol (Solució 0,1 M, Sigma M-6250), i 10% FBS (SIGMA F9665, lot 058K336)

- Inòcul: tres minibioreactors s'inocularen a 10×10^4 Cèl·l./mL (r1, r2, r3), i els altres tres s'inocularen a 20×10^4 Cèl·l./mL (r4, r5, r6). La concentració dels carriers Cytodex3 (GE, 17-0485-01) fou de 3 g/L ($2700 \text{ cm}^2/\text{g}$)
- Agitació: 150 rpm
- Temperatura dels bioreactors: 37°C
- Aeració: 0,2 slpm (5s cada 250s)
- Cabal N_2 per a la OUR: 0,4 slpm

Resultats

Tal com mostra la figura 6.1.11, s'observa una major acidificació en els cultius a majors inòculs, si bé les dades de consum d'oxigen no permeten establir diferències entre les dues concentracions d'inòcul emprades.

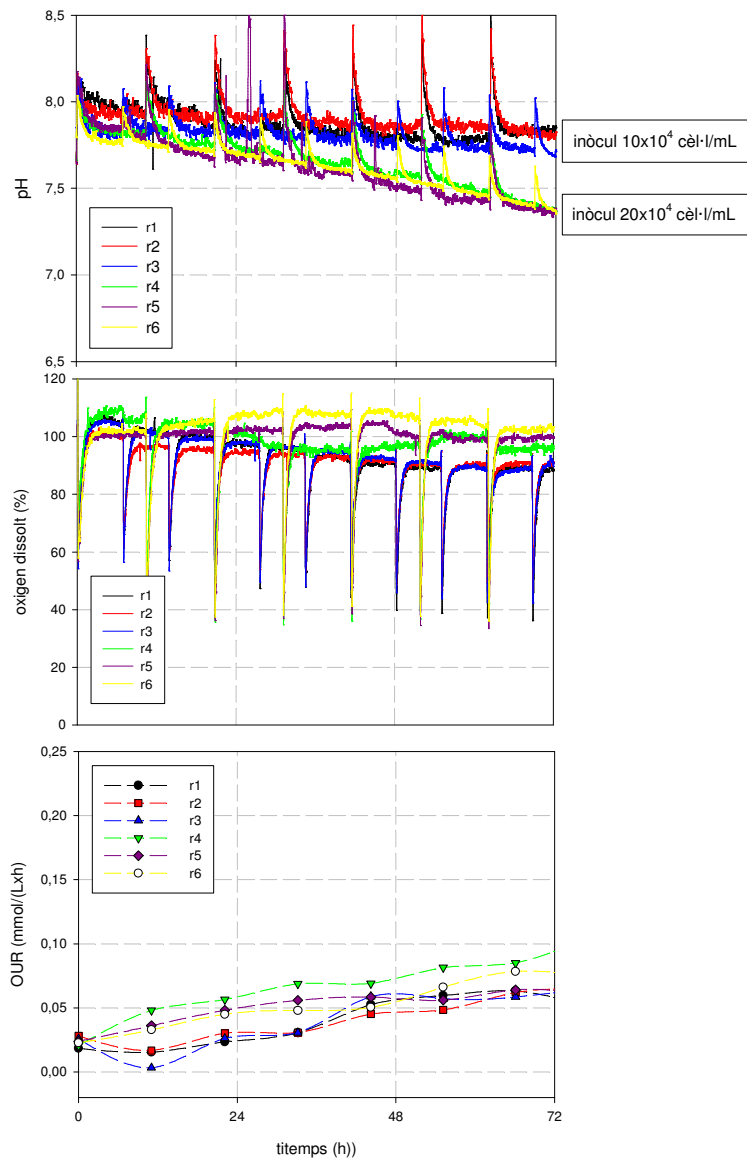


Figura 6.1.11. Perfils obtinguts en cultius de cèl·lules HEK293 efectuats amb l'equip de sis minibioreactors. Es va emprar medi DMEM 10% FCS, amb diferents inòculs (10×10^4 Cèl·l./cm² reactors 1,2,3; 20×10^4 Cèl·l./ml reactors 4,5,6). OUR es refereix a Oxygen Uptake Rate. Els pics observats en pH i oxigen dissolt corresponen als temps de monitorització de OUR, degut a la desorció de l'oxigen i el CO_2 provocada per la mesura.

Els recomptes cel·lulars realitzats fora de línia mostren una major concentració cel·lular en el cas dels cultius amb un major inòcul. Això es veu confirmat per les mesures en línia, si bé la única que ens mostra aquestes diferències és el seguiment de pH, que mostra una major acidificació en el cas dels cultius amb un inòcul elevat (acidificació 0,36 unitats pH), en comparació a l'acidificació observada en els cultius amb un inòcul menor (acidificació -0,02 unitats pH).

El consum d'oxigen, tot i que en aquest cas permet seguir el creixement, ha estat massa reduït per a permetre observar diferències entre els cultius a inòcul alt i els cultius a inòcul baix, basades en aquest indicador. Únicament és possible observar diferències en les primeres 30 h de cultiu, on els experiments a inòcul alt mostren un consum més elevat.

6.1.3. Comparació de creixements amb i sense control de pH i d'oxigen dissolt.

Avaluada la possibilitat de realitzar cultius de cèl·lules animals en suspensió i adherència on, bàsicament es segueix l'evolució de variables com el pH i l'oxigen dissolt, també s'ha desitjat realitzar cultius amb control sobre aquestes variables. A l'apartat 5.3.5 ja s'avaluava la possibilitat de realitzar-ne controls, i en aquest apartat s'han emprat les sintonies de controladors generades per comparar els comportaments dels cultius quan aquests controls són aplicats i quan no ho són.

6.1.3.1. Creixements amb i sense control de pH

Amb la finalitat de veure la possibilitat de realitzar cultius controlant el pH, i avaluar també les diferències en les corbes de creixement entre cultius amb i sense control de pH, s'ha realitzat dos cultius emprant el sistema d'un únic minibioreactor.

Per tal de controlar el pH s'ha aplicat la metodologia desenvolupada a l'apartat 5.3.5, emprant polsos de CO₂ pur i un controlador proporcional per mantenir el pH al voltant de la consigna.

En un dels casos s'ha controlat el pH al voltant de 7,02 i en l'altre dels casos s'ha deixat que evolucioni lliurement a partir del valor de pH inicial fixat bàsicament per la concentració de NaHCO₃ (3,7 g/L) en el medi i de CO₂ (5 %) en la fase gas, valor de pH que evolucionarà en funció del metabolisme del cultiu. Addicionalment a les mesures en línia proporcionades pel sistema, es realitzen recomptes cel·lulars fora de línia.

Tipus cel·lular

Cèl·lules de mamífer / suspensió

Línia cel·lular

Hibridoma KB-26.5

Condicions de cultiu

- Medis de cultiu: DMEM (Sigma, D5796), suplementat amb L-glutamina (Sigma, G-5763) fins arribar a una concentració de 0,877 g/L, 0,5 mL/L insulina (Solució 4 UI/mL, Actrapid Novo), 0,5 mL/L β -mercaptoetanol (Solució 0,1 M, Sigma M-6250), i 10% de *Foetal Calf Serum* (FCS) (Biological Industries, Cat. 04-001-1A, Lot 415360).
- Inòculs: $2,30 \times 10^5$ Cèl·l./mL (cultiu control pH), $2,55 \times 10^5$ Cèl·l./mL (cultiu sense control pH)
- Agitació: 200 rpm
- Temperatura dels bioreactors: 37°C
- Aeració: 0,2 slpm (5 s cada 250 s) en el cas de pH no controlat. En el cas de pH controlat, actuació cada 120 s, temps mínim d'aeració = 500 ms, paràmetre proporcional 2500, consigna = 7,02.
- Cabal N₂ per a la OUR: 0,4 slpm

Resultats

L'evolució dels recomptes cel·lulars fora de línia, la densitat òptica (650 nm), així com el consum d'oxigen (OUR) (veure figura 6.1.12) mostren elevats paral·lelismes entre els cultius amb control i sense control de pH. Hi ha una certa variació en les cinètiques de les corbes (temps de duplicació), però aquesta també fou observada en els flascons de control realitzats per cadascun dels cultius.

Comparant l'evolució del pH, en el cultiu on es controla aquesta variable, el seu valor es manté al voltant de 7,02. En contrast amb això, en el cultiu sense control de pH, la presència d'una atmosfera amb el 5% de CO₂ conduí a un pH inicial de 7,8 (calculable a partir del percentatge de CO₂ i concentració de NaHCO₃), i presenta una acidificació, deguda al metabolisme del cultiu, que produeix àcids (bàsicament àcid làctic). Aquesta tendència es manté fins a la frenada del creixement i metabolisme del cultiu, que es produeix a les 55 h de cultiu en el cas del cultiu sense control de pH, i cap a les 72 h en el cas del cultiu amb pH controlat.

Mancant avaluar els efectes sobre la productivitat i funcionalitat dels anticossos produïts, cal tenir en compte que la realització de cultius sense control de pH aporta la possibilitat que aquesta variable es comporti com un indicador metabòlic addicional.

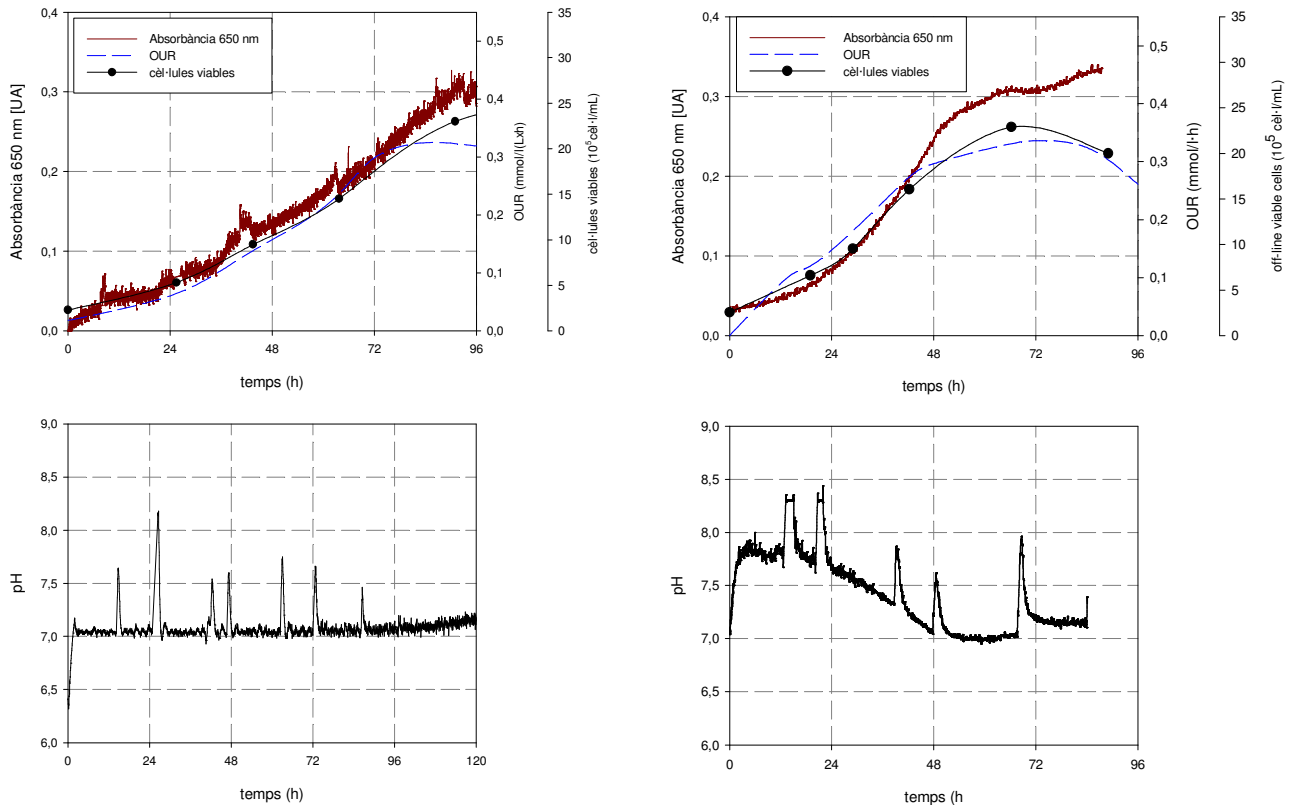


Figura 6.1.12. Evolució de la densitat òptica, consum d'oxigen (OUR), pH i recomptes de cèl·lules viables fora de línia. A l'esquerra, cultiu amb el pH controlat; a la dreta, cultiu amb una atmosfera constant amb un 5% de CO₂. consideració: els increments sobtats de pH observats són deguts a les mesures de consum d'oxigen, que utilitzen nitrogen i aquest desorbeix tant l'oxigen com el CO₂.

6.1.3.2. Creixements amb i sense control d'oxigen dissolt

En aquest cas, s'han realitzat dos cultius amb el sistema d'un únic minibioreactor, en un dels casos controlant l'oxigen dissolt al voltant del 60% i en l'altre cas s'ha fixat una aeració del reactor amb un cabal de 0,4 slpm, activada 5 s cada 250 s, i s'ha deixat que l'oxigen dissolt evolucioni lliurement.

A diferència del grau de control que s'havia assolit en el cas del pH, on les desviacions respecte la consigna eren molt reduïdes, en el cas de l'oxigen dissolt, com s'ha discutit a l'apartat 5.3.5, no s'ha assolit un control tant acurat. De totes maneres s'ha aplicat el control que s'havia aconseguit i s'han emprat els resultats per generar la discussió possible amb les capacitats actuals del sistema de cultiu.

Tipus cel·lular

Cèl·lules de mamífer / suspensió

Línia cel·lular

Hibridoma BHRF1

Condicions de cultiu

- Medis de cultiu: DMEM (Sigma, D5796), suplementat amb L-glutamina (Sigma, G-5763) fins arribar a una concentració de 0,877 g/L, 0,5 mL/L insulina (Solució 4 UI/mL, Actrapid Novo), 0,5 mL/L β -mercaptoetanol (Solució 0,1 M, Sigma M-6250), i 10% de *Foetal Calf Serum* (FCS) (Biological Industries, Cat. 04-001-1A, Lot 415360).
- Inòculs: $2,50 \times 10^5$ Cèl·l./mL (cas amb control d'oxigen dissolt), $2,55 \times 10^5$ Cèl·l./mL (cas sense control d'oxigen dissolt)
- Agitació: 200 rpm
- Temperatura dels bioreactors: 37°C
- Aeració: 0,2 slpm (5 s cada 250 s) en el cultiu sense control d'oxigen dissolt. En el cas del cultiu amb control d'oxigen dissolt, s'han aplicat els paràmetres determinats a l'apartat 5.3.5: $t_{O_2 \text{ min}} (s) = 0,25$, $t_{O_2 \text{ max}} (s) = 6$, $O_2 P = 0,25$, $t_{N_2 \text{ min}} (s) = 3$, $t_{N_2 \text{ max}} (s) = 6$, $N_2 P = 1$.
- Cabal N_2 per a la OUR: 0,4 slpm

Resultats

Tal com s'observa a les gràfiques de la figura 6.1.13, el seguiment del creixement (absorbància a 650nm i recomptes cel·lulars fora de línia) així com l'evolució del pH mostren similituds elevades entre ambdós cultius, amb i sense control de la concentració d'oxigen dissolt.

La diferència que es fa més evident entre ambdós cultius és un pH més elevat en el cultiu amb control d'oxigen dissolt durant les primeres hores de cultiu, probablement induït per les dinàmiques del controlador, que porta a una certa latència en els estadis inicials. Fins a les 46 h les corbes de creixement presenten diferències: en aquest punt mentre la concentració de cèl·lules viables en el cultiu amb control d'oxigen dissolt és aproximadament de 9×10^5 Cèl·l./mL, en el cultiu sense control la concentració és de

16×10^5 Cèl·l./mL. A partir d'aquest punt però, el cultiu amb control d'oxigen dissolt arrenca fins assolir pràcticament la mateixa densitat cel·lular que l'altre. Aquesta mateixa dinàmica també s'observa en la mesura de consum d'oxigen, ja que durant els estadis inicials en el cultiu amb control d'oxigen dissolt els valors de consum d'oxigen són menors, mentre que al arribar a la fase on el cultiu arrenca fins a pràcticament igualar la densitat cel·lular amb l'altre, els valors de consum d'oxigen sofreixen un increment sobtat, que els situa per sobre dels observats en l'altre cultiu.

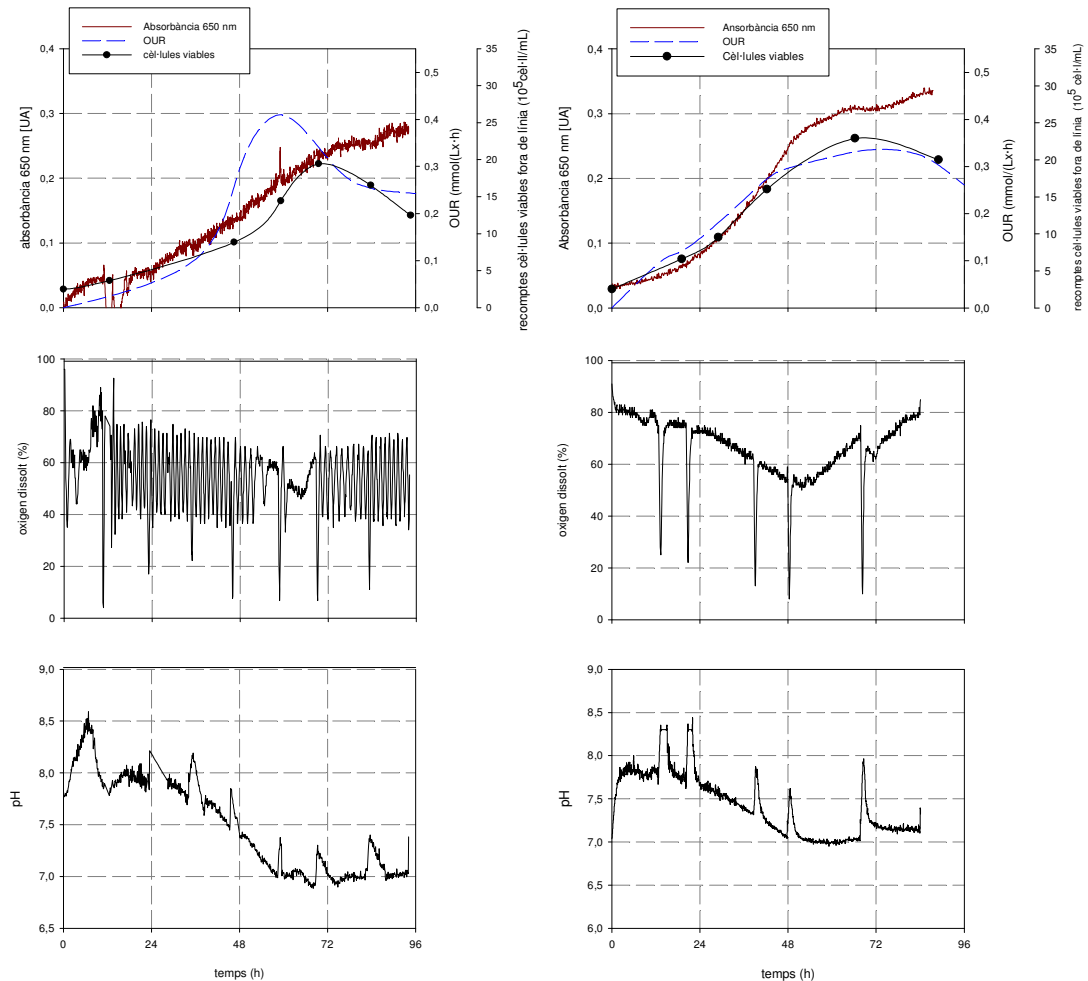


Figura 6.1.13. Evolució de la densitat òptica, consum d'oxigen (OUR), pH, oxigen dissolt i recomptes de cèl·lules viables. A l'esquerra, cultiu amb control d'oxigen dissolt; a la dreta, cultiu amb una taxa de ventilació constant. Consideració: els increments sobtats de pH observats són deguts a les mesures de OUR, que utilitzen nitrogen i aquest desorbeix tant l'oxigen com el CO_2 .

Un altre element destacable, però no referent a comparacions entre cultiu sinó referent al controlador d'oxigen dissolt, és la millor capacitat de control observada entre les 60 i 70 h, on el major consum mostrat pel cultiu ha portat al controlador a deixar d'emprar

nitrogen. Això és coherent amb les hipòtesis realitzades a l'apartat 5.3.5: si s'empren com a elements de regulació gasos amb valors de 0 i 100 quan la consigna pren un valor allunyat d'aquests extrems (60), el control serà potencialment inestable. Així, en cas que es desitgi realitzar un control més acurat, caldria emprar gasos amb concentracions més properes a la de consigna, o bé una estació de mescla de gasos de la qual el sistema de cultiu no està dotat.

6.2. Comparació entre diferents sistemes de cultiu

Per a finalitzar aquest capítol es desitja realitzar una comparació dels creixements obtinguts, amb una línia cel·lular model (hibridoma KB 26.5), emprant diferents sistemes de cultiu.

En concret es presenten dades de cultius obtinguts amb els sistemes desenvolupats d'un únic minibioreactor i de sis minibioreactors, així com de bioreactors de 2 L (MCD Sartorius).

Cal tenir present però, que la comparabilitat de les dades té moltes limitacions, ja que s'ha emprat dades històriques obtingudes amb la línia cel·lular de referència, i en cada cultiu el comportament de les cèl·lules tindrà diferències. Aquestes seran degudes a que el nombre de ressembres que portava la línia cel·lular en cultiu era diferent, els medis de cultiu provenien de diferents lots, l'inòcul ha tingut una concentració i història diferents, entre altres.

Es considera però, que tant en els sistemes de minibioreactors (1 únic minibioreactor, 6 minibioreactors), com en bioreactors convencionals de 2 L, durant el tram en què no hi ha hagut limitació de nutrients i acumulació de subproductes perjudicials pel cultiu, el creixement haurà estat no limitat (considerant agitació no estressant en tots els sistemes, i oxigen no limitant), de manera que la velocitat específica màxima de creixement haurà de ser propera.

A la taula 6.2.1 es presenten dades de velocitats específiques màximes de creixement històriques, obtingudes amb la línia cel·lular d'hibridoma KB 26.5, amb els diferents sistemes de cultiu comparats, i la desviació respecte la velocitat mitjana calculada a partir de tots els valors ($0,0434 \text{ h}^{-1}$).

Referència experiment	Equip	μ_m (h^{-1})	Desviació (%)
Fig 6.1.13. treball present	1 minibioreactor	0,0435	0,29
Fig 3.51. Gàlvez (2006)	1 minibioreactor	0,0395	-8,93
Fig. 6.1.5. treball present	6 minibioreactors	0,0495 +/- 0,0013	14,12
Fig 6.1.6. treball present	6 minibioreactors	0,0452 +/- 0,0042	4,21
Fig 6.4. Gàmez (2000)	Bioreactor 2 L	0,0440	1,44
Fig 6.17 Gàmez (2000)	Bioreactor 2 L	0,0400	-7,78
Fig 6.19 Gàmez (2000)	Bioreactor 2 L	0,0414	-4,55
Fig 6.22 Gàmez (2000)	Bioreactor 2 L	0,0439	1,21

Taula 6.2.1. Velocitats específiques màximes de creixement en cultius emprant diferents sistemes de cultiu, amb la línia cel·lular KB26.5.

Les desviacions observades són menors del 10% en tots, excepte en un dels casos, i aquest valor es pot considerar bastant reduït, tenint en compte que és un sistema biològic i les diferències existents entre els cultius. No obstant, es pot observar que els valors més alts es troben entre els calculats amb el sistema de sis minibioreactors. La diferència existent en el càlcul de la velocitat de creixement entre aquest sistema i els altres és que en els altres casos, s'ha partit de dades de cèl·lules viables mesurades off-line (amb mesures aproximadament cada 24 h), i en el cas dels sistema de sis minibioreactors, s'ha partit de les dades d'absorbància. En els cas dels dos cultius presentats per al càlcul realitzats amb aquest sistema durant les 10-12 primeres hores s'ha pogut observar una latència que s'ha pogut excloure de forma molt precisa del càlcul. En el cas d'incloure aquestes dades al càlcul, les velocitats específiques màximes de creixement que es calculen són:

$$\text{Fig 6.1.5. treball presentat} \rightarrow 0,0426 \pm 0,008 \text{ h}^{-1}$$

$$\text{Fig 6.1.6. treball presentat} \rightarrow 0,0403 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$$

A mode d'exemple es presenten en forma de gràfica cultius realitzats en aquest i en altres treballs, anclant l'inici de la representació dels cultius en l'eix temporal per tal de superposar els inòculs. Tal com es veu a la figura 6.2.1, els cultius en tots els sistemes presenten una similitud cinètica, si bé les corbes presenten diferències, degut a les raons comentades anteriorment.

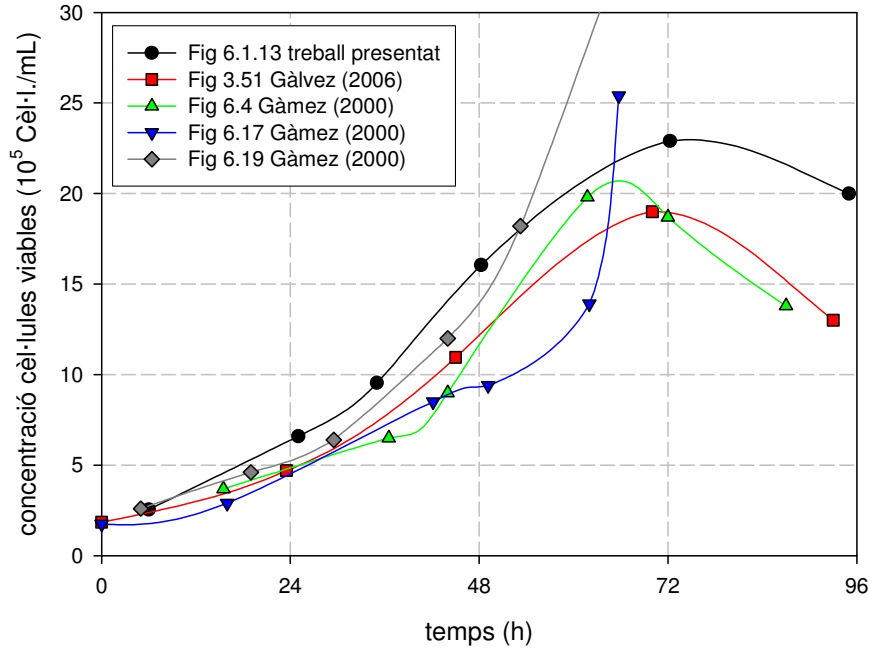


Figura 6.2.1. Corbes de creixement de hibridoma KB26.5 en diferents sistemes de cultiu. Les corbes extrems de les figures 6.1.13 del treball presentat i 3.51 del treball de Gàlvez (2006) estan realitzades amb el sistema d'un únic minibioreactor. La figura 6.4 del treball de Gàmez (2000) correspon a un cultiu discontinu en bioreactor de 2 L, mentre que les figures 6.17 i 6.19 del treball de Gàmez (2000) corresponen a cultius en discontinu alimentat en bioreactor de 2 L.

Resumint, la comparació realitzada entre sistemes de cultiu presenta similituds elevades, si bé cal tenir en compte que les diferències entre els inòculs no permet un major aprofundiment en aquesta afirmació.

6.3. Adequacions per altres sistemes: bacteris i llevats

Tot i que el cos central d'aquest treball el constitueix el desenvolupament d'un sistema de minibioreactors per al cultiu de cèl·lules animals, també s'ha cregut interessant iniciar l'exploració de les adequacions tecnològiques necessàries per adaptar el sistema al cultiu d'altres models cel·lulars, com són el cas de bacteris i llevats.

6.3.1. Adequació dels sistemes d'agitació i aeració

A diferència dels cultius amb cèl·lules animals, en els que es treballa amb agitació pendular, en el cas dels bacteris i dels llevats, donada la menor sensibilitat a l'estrès per

cisalla, s'opta per utilitzar varetes magnètiques per tal d'incrementar la capacitat de transferència d'oxigen.

Pel què fa a l'aeració, també difereix dels cultius amb cèl·lules animals ja que amb bacteris i llevats l'aeració no es realitzarà per capçal, ja que tal com s'ha observat al capítol 4, l'aportació d'oxigen que permet aquest mètode és insuficient i des dels instants inicials dels cultius, les concentracions d'oxigen dissolt són molt pròximes a zero. Després d'estudiar diferents alternatives per a millorar la capacitat d'aeració, s'ha escollit com a difusor una agulla (0,8 mm diàmetre), de manera que l'aire injectat provoqui un bombolleig en el medi (veure capítol de Materials i Mètodes).

Prèviament a procedir a la realització de cultius, s'ha realitzat un experiment per veure si la presència de bombolles en el medi i d'una vareta magnètica movent-se a les proximitats del port òptic interferien a la mesura. Aquest experiment ha consistit en veure si la mesura d'absorbància es manté constant al llarg d'aproximadament 2 hores amb el sistema airejat mitjançant bombolleig (0,2 slpm) i agitat (vareta imantada a 400 rpm). Els resultats es mostren a la figura 6.3.1, on es presenten les dades d'absorbància en una escala com la que s'obté quan es realitzen cultius, i s'observa que l'absorbància mesurada s'ha mantingut molt estable al voltant del zero. No obstant, aproximadament a les 1,7 h hi ha una desviació de 0,05 UA que sobrepassa el que es considera com a precisió del sistema de mesura (+/- 0,03 UA). De totes maneres, cal considerar que aquestes desviacions seran menors en el cas de realitzar cultius, ja que aquests tindran la tendència a consumir les possibles bombolles acumulades sota el port òptic. D'altra banda, també cal tenir en compte que l'impacte d'aquestes desviacions serà més reduït com major sigui l'absorbància dels cultius. Així si sobre una absorbància de 0,2 UA la desviació màxima observada suposaria un 25%, sobre una absorbància de 0,8 UA, aquesta mateixa desviació suposaria solament un 6,4% d'error.

Resumint els resultats observats, s'observa risc reduït que l'aeració per bombolleig afecti la mesura d'absorbància en valors sensibles donades les absorbàncies que es mesuraran durant els cultius. De totes maneres, donat que ja s'ha detectat una petita interferència, i que el període de temps de validació ha estat reduït, caldrà estar atent a aquest possible efecte en els cultius que es realitzaran en els apartats següents.

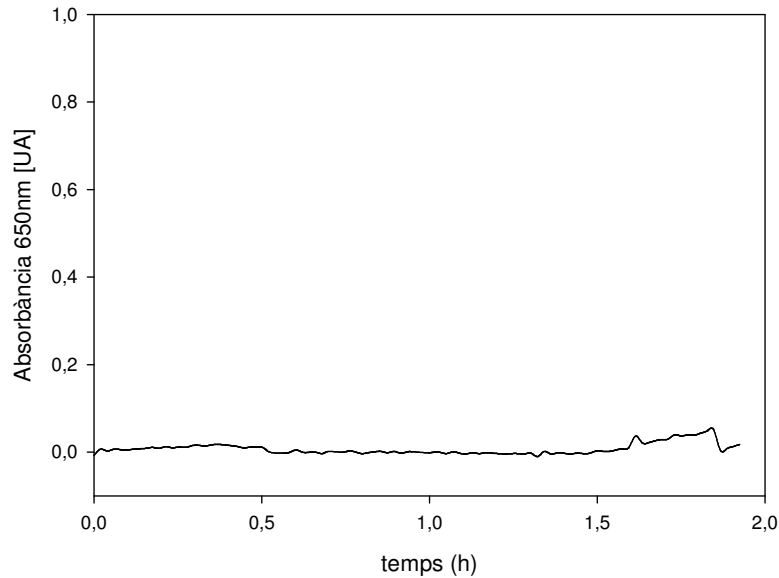


Figura 6.3.1. Avaluació de la interferència en la mesura d'absorbància d'un sistema d'agitació basat en el moviment d'una vareta magnètica i un sistema d'aeració amb bombolleg.

6.3.2. Adequació del sistema de mesura de pH

Fins aquest punt, els desenvolupaments realitzats per a seguir el pH s'han basat en un colorant concret, el roig de fenol, que és aquell que cobreix el rang de mesura desitjat per a cèl·lules animals. De totes maneres, com que el fonament de mesura és el seguiment d'absorbància a una determinada longitud d'ona específica del colorant, o que com a mínim pugui ser independitzada de la concentració de cèl·lules, hi ha un ventall d'indicadors que, donat el seu rang de mesura, permetran treballar amb diferents organismes.

En funció del rang pH en què treballi cadascun dels organismes amb què es desitgi treballar es pot emprar un o altre indicador de pH. Per a cadascun dels casos caldrà definir la concentració òptima del colorant, i calibrar la relació entre l'absorbància i pH.

A la taula 6.3.1 es mostra una llista amb alguns dels indicadors existents i els rangs de mesura que tenen.

Indicador	Rang d'aplicació
<i>Metacresol purple</i>	7,6-9,2
<i>Phenol red</i>	6,8-8,0
<i>Litmus</i>	5,0-8,0
<i>Alizarin red</i>	4,6-6,0
<i>Bromocresol green</i>	3,8-5,4
<i>Bromophenol blue</i>	3,0-4,6

Taula 6.3.1. Indicadors per al seguiment de pH, rang de seguiment potencial recomanat pels proveïdors.

6.3.3. Cultiu de *Escherichia coli*

En aquest punt s'avalua la capacitat del sistema per a monitoritzar un model bacterià (*E. coli*) en l'equip d'un únic minibioreactor.

Prèviament a la realització dels cultius, ha calgut seleccionar l'indicador a emprar. Amb aquesta finalitat, s'ha observat les variacions de pH que s'havien obtingut en els cultius en medi LB i M9 no limitats per oxigen dissolt, efectuats al capítol 4. En el cas del creixement en medi LB, el pH inicial d'aproximadament 6,5 ascendeix progressivament fins a valors d'aproximadament pH = 8. En el cas del creixement en medi mínim (M9), el pH presenta variacions molt reduïdes al voltant del pH inicial, aproximadament pH = 7,0. Així doncs, el rang de pH es acceptable per tal de seguir emprant roig de fenol, que és l'indicador que havia estat emprat per als cultius de cèl·lules animals.

Una vegada seleccionat l'indicador, s'han realitzat calibratges amb els medis que s'empraran: LB i medi mínim M9. La concentració de roig de fenol emprada ha estat de 15 mg/L en el qual inicialment s'afegeix àcid (H_2SO_4) fins que no hi ha absorció de la forma bàsica de l'indicador, i després s'afegeix progressivament base (NaOH). En cada addició s'anoten les mesures d'absorbància i les de pH. Les dades mesurades es presenten a la figura 6.3.2:

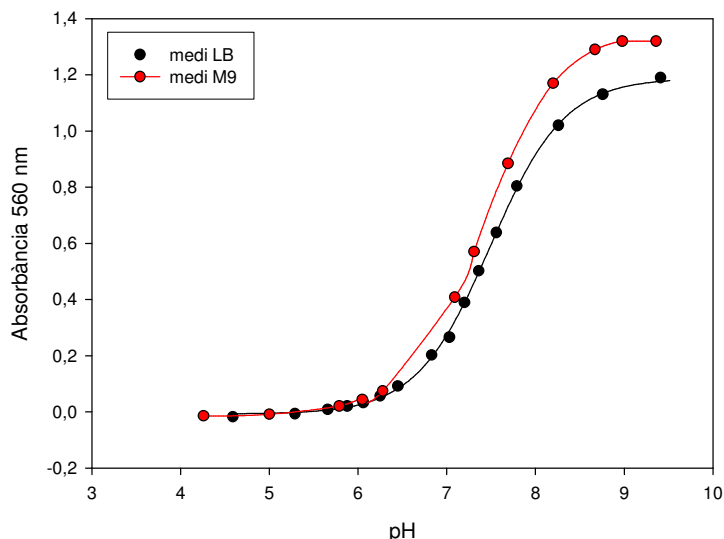


Figura 6.3.2. Calibratge de l'absorbància de la forma bàsica del roig de fenol (560nm), en medi LB i medi M9.

Els paràmetres per aquestes dues sigmoïdals es presenten a continuació, d'acord amb l'equació 5.1.2:

$$\text{absorbància}(560\text{nm}) = y_0 + \frac{a}{1 + \exp(-(x - x_0)/b)}$$

	Medi LB	Medi M9
a	1,3510	1,1966
b	0,4073	0,4167
x0	7,4219	7,4919
y0	-7,5357e-3	-7,9057e-3

Taula 6.3.2. Paràmetres de les sigmoïdals de calibratge de pH per a 15 mg/L de roig de fenol en medi LB i M9.

Una vegada realitzats els calibratges de pH, s'ha realitzat dos cultius, un emprant medi LB i l'altre emprant medi M9. En ambdós casos s'ha treballat a 37°C, amb 13 mL de volum de treball, 200 rpm d'agitació (amb varetes imantades), i aeració mitjançant entrada constant d'aire a un cabal de 0,2 L/min. Els inòculs realitzats tenien absorbància 0,2 UA (650 nm). També en ambdós casos, els paràmetres que s'han seguit han estat la concentració cel·lular (absorbància a 650 nm), el pH i oxigen dissolt, esperant poder obtenir d'aquestes dues darreres variables indicadors de l'activitat metabòlica dels cultius. Cal esmentar que no s'ha incorporat la tecnologia de mesura de fluorescència a l'equip d'un únic minibioreactor emprat, de manera que s'ha seguit utilitzant el sistema de mesura d'oxigen polarogràfic.

A la figura 6.3.3 es mostren els resultats del cultiu realitzat en medi LB. En aquesta es pot observar que el creixement cel·lular ha estat correcte ja que la mesura d'absorbància a 650 nm dibuixa un creixement exponencial típic, amb una velocitat específica màxima de creixement de $0,70 \text{ h}^{-1}$ (temps de duplicació de 0,99 h). Pel que fa al pH, inicialment es dona una davallada molt lleugera (de 6,6 a 6,3), però a les 2-3 hores de cultiu aquesta tendència s'inverteix donant lloc a una forta pujada, tal com s'havia observat a l'apartat 4.3. Tal com ja s'havia raonat en aquest apartat, les hipòtesis que podien explicar aquestes variacions de pH eren el consum de determinats nutrients. D'entre els components del medi LB, cal recordar que per una banda, el consum de sucres dona lloc a una acidificació del medi. Per altra banda, el consum de pèptids i d'aminoàcids lliures es caracteritza per provocar una basificació del medi. Amb això es pot concloure que si durant les dues primeres hores de cultiu el pH ha baixat, això probablement sigui degut a la generació d'àcids, subproductes del metabolisme dels sucres presents al medi. Durant aquest període del cultiu (0-2 h), la concentració d'oxigen mostra una davallada del 100% fins al 20%. Donat que el cabal de bombolleg era fixe, aquesta disminució indica l'augment de consum per part del cultiu, de forma coherent amb les dades d'absorbància de les quals es disposa. A les tres hores i mitja de cultiu el percentatge d'oxigen dissolt puja fins a valors pròxims al 60%, coincidint amb l'inici de l'acidificació del brou (el metabolisme passa a ser de consum d'aminoàcids i pèptids). Durant aquest estadi del cultiu, el consum d'oxigen és menor, de manera que l'aeració existent permet mantenir el percentatge d'oxigen dissolt en valors més elevats.

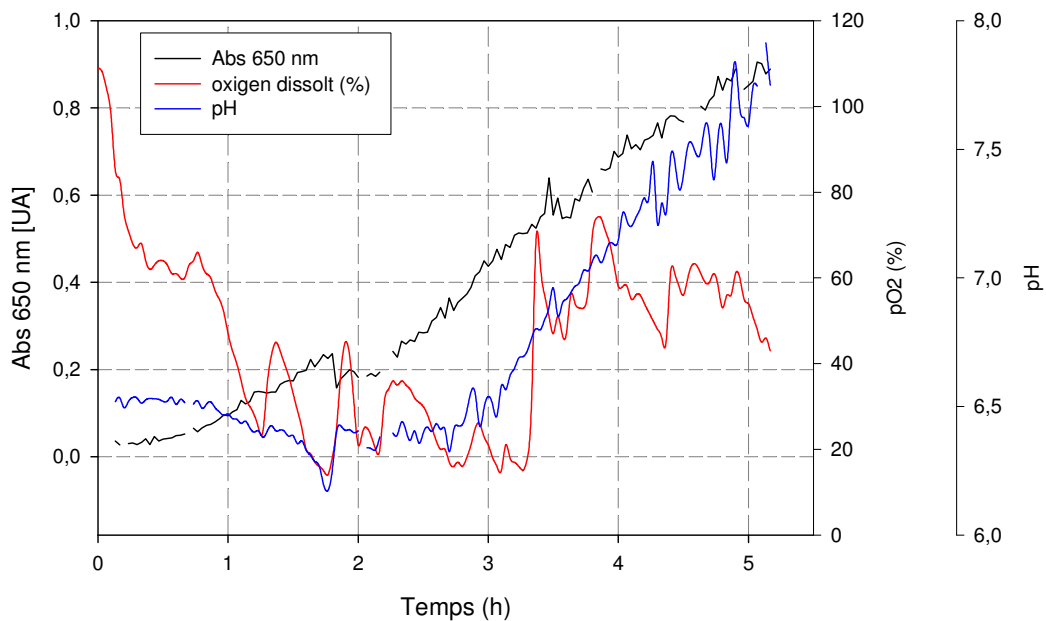


Figura 6.3.3. Evolució de la biomassa, el pH i el percentatge d'oxigen dissolt en un cultiu de E.coli (medi LB) monitoritzat amb el sistema d'un únic minibioreactor.

Un element que cal comentar de les dades de l'experiment anterior és que degut a que el sistema òptic del sistema de cultiu d'un únic minibioreactor emprat no disposava de les adequacions del sistema òptic per evitar l'existència de fenòmens de dispersions, de manera que les dades obtingudes no eren directament comparables amb les obtingudes amb un espectrofotòmetre convencional. Per a obtenir dades comparables a les d'un espectrofotòmetre convencional cal aplicar el següent calibratge:

$$Abs(\text{espectrof. convencional}) = 2.526 \times Abs(\text{sistema cultiu}) - 0.102 \quad \text{Eq. 6.3.1}$$

Així, aplicant aquest calibratge, es pot calcular que les dades finals d'absorbància obtingudes amb el sistema d'un únic minibioreactor (0,90 UA a 650 nm), corresponen a 2,17 UA (a 650 nm) mesurades amb un espectrofotòmetre convencional, valors més comparables als que s'havien obtingut en els cultius en Erlenmeyer al capítol 4.

Havent realitzat un cultiu emprant el sistema d'un únic minibioreactor en medi LB, s'ha repetit el cultiu en aquest cas en medi M9 per tal d'avaluar quines eren les diferències que es podien observar, tant pel que fa al creixement, com les altres dades adquirides pel sistema de cultiu emprat (pH i oxigen dissolt).

A la figura 6.3.4 es mostren els resultats obtinguts (seguiment creixement, pH, i oxigen dissolt), i seguidament es presentarà una discussió d'aquests, de forma comparada amb el cultiu realitzat en medi M9:

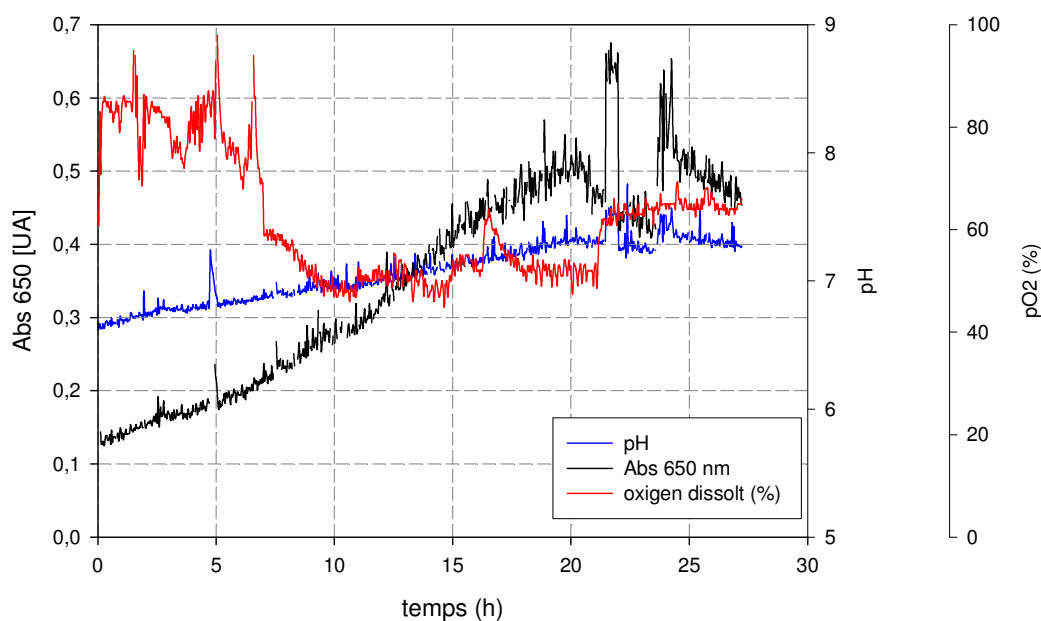


Figura 6.3.4. Evolució de la concentració cel·lular (Absorbància a 650 nm), el pH i el percentatge d'oxigen dissolt en un cultiu de *E.coli* (medi M9) monitoritzat amb el sistema d'un únic minibioreactor.

Discutint les diferències entre aquest cultiu i el realitzat anteriorment en medi LB, la principal variació es troba en la corba de creixement, que presenta una cinètica molt més lenta, i la concentració cel·lular final assolida, que és la meitat que en el cultiu amb LB. Així, la velocitat específica màxima de creixement calculada a partir de les dades del cultiu en medi M9 és de $0,07 \text{ h}^{-1}$, 10 vegades menor que les $0,70 \text{ h}^{-1}$ observades en el cultiu en medi LB.

Referent al seguiment de la concentració d'oxigen dissolt, la reducció de la concentració deguda al consum cel·lular és menor que en el cultiu en medi LB. Així, en aquest cas s'està en tot moment per sobre del 50%, mentre que en el cultiu en medi LB la concentració arribava a baixar fins al 20%. Aquest fet un indicador de que el consum d'oxigen per al cultiu en medi M9 ha estat menor, ja que l'aeració ha estat idèntica que en cas anterior.

Pel que fa a la mesura del pH, en aquest cas el pH es basifica progressivament al llarg de les 27 hores de cultiu, tal com ja s'havia observat a l'apartat 4.3 (on s'havia emprat també *E. coli* i medi M9). A diferència del cultiu en medi LB, doncs, no hi ha un canvi metabòlic que es vegi reflectit per variacions en la tendència de canvi del pH.

Finalment, de les dades de la figura 6.3.4 també es pot destacar que, probablement degut a la interferència de la mosca en el port òptic, en alguns moments apareix un cert soroll en la mesura de biomassa (absorbància 650 nm), i també en la mesura de pH. En cas que s'hagués de seguir treballant emprant aquest disseny seria recomanable la implementació d'un filtre en el programa d'adquisició de dades.

6.2.4. Cultiu de *Pichia pastoris*

En aquest punt s'avalua la capacitat del sistema per a monitoritzar un llevat (*P. pastoris*) en el sistema d'un únic minibioreactor.

En primer lloc, i abans de procedir al cultiu en el sistema d'un únic minibioreactor, s'ha dut a terme un experiment per tal de determinar en quin rang de pH s'ha de treballar ja que això condicionarà l'indicador de pH a utilitzar.

Aquest experiment consisteix en un cultiu de *P. pastoris* en medi YPD en 4 Erlenmeyers amb pH fixats inicialment de 4, 5, 6 i 7 respectivament. L'ajust del pH s'ha realitzat mitjançant l'addició de H_2SO_4 i NaOH. Posteriorment s'han inoculat les cèl·lules a una absorbància inicial d'aproximadament 0,2 UA (a 650 nm), i a partir

d'aquest moment s'ha iniciat el cultiu a 30°C en un incubador orbital. Per tal de seguir el creixement durant el cultiu, s'ha realitzat mesures d'absorbància (a 650 nm) aproximadament cada hora. Addicionalment, s'ha realitzat mesures de pH al punt mig i al punt final del cultiu.

A la figura 6.3.5 es presenten les mesures realitzades en els cultius a diferents pH, podent-se observar que les cinètiques de creixement en tot el rang de pH estudiat ($4 < \text{pH} < 7$) són molt similars.

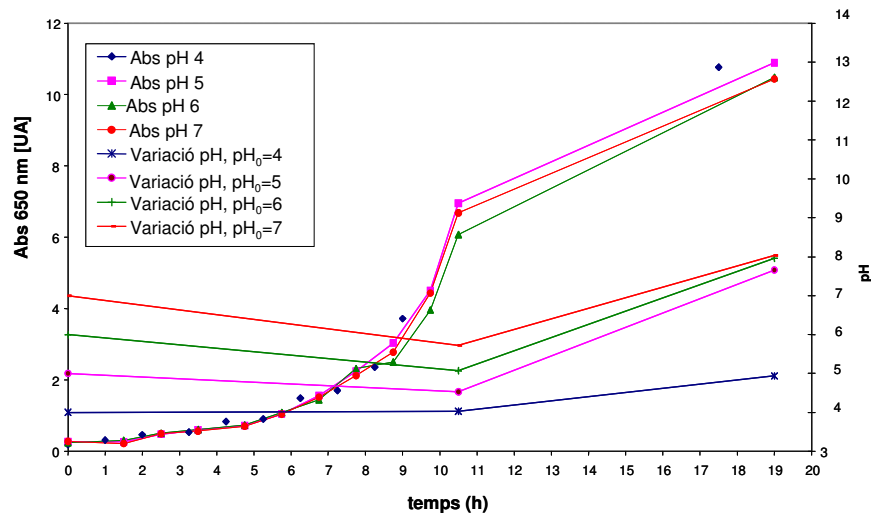


Figura 6.3.5. Creixement de *P. pastoris* a diferents pH i seguiment de pH.

A partir dels resultats obtinguts es pot concloure que *P. pastoris* segueix el mateix creixement en qualsevol dels pH de 4 a 7. A més, en cadascun dels casos, no s'observa que hi hagi hagut una variació accentuada entre el pH inicial i el final. Per tant, com que sembla que el pH del medi no és determinant pel creixement, els posteriors cultius s'iniciaran al pH natural del medi YPD (6,5 aprox.) i s'escull com a indicador de pH el roig de fenol.

A continuació s'ha realitzat el calibratge de pH, en un minibioreactor amb medi de cultiu YPD i roig de fenol a una concentració de 15 mg/L en el qual inicialment s'afegeix àcid (H_2SO_4) fins que no hi ha absorció de la forma bàsica de l'indicador, i després s'afegeix progressivament base (NaOH). En cada addició s'anoten les mesures d'absorbància i les de pH. Les dades mesurades es presenten a la figura 6.3.6:

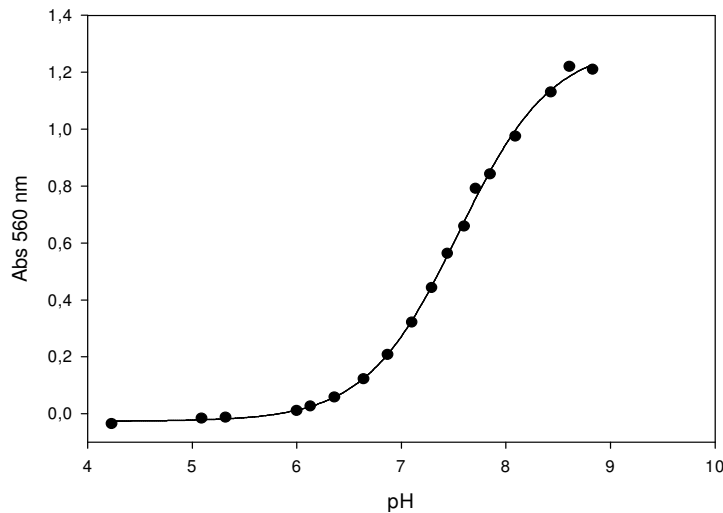


Figura 6.3.6. Calibratge de l'absorbància de la forma bàsica del roig de fenol (560nm), en medi YPD.

Els paràmetres de la sigmoïdal es presenten a la taula següent:

	Medi YPD
a	1,3221
b	0,4424
x0	7,5468
y0	-0,0266

Taula 6.3.3. Paràmetres del calibratge sigmoïdal de la forma àcida de l'indicador de pH, per a una solució de 15 mg/L de roig de fenol en medi YPD.

A continuació s'ha realitzat el cultiu en el sistema d'un únic minibioreactor amb la monitorització de la biomassa i del pH. Paral·lelament, s'ha realitzat un cultiu control en un erlenmeyer. Les condicions de cultiu han estat les següents: medi YPD, aeració mitjançant entrada constant d'aire a un cabal de 0,2 L/min (l'aire es fa entrar a través d'una agulla clavada pel sèptum amb un filtre en el capçal), agitació mitjançant una mosca a 200 rpm, volum de treball de 12 mL.

A la figura 6.3.7 es mostren els resultats del cultiu realitzat en medi YPD, que es discutiran a continuació.

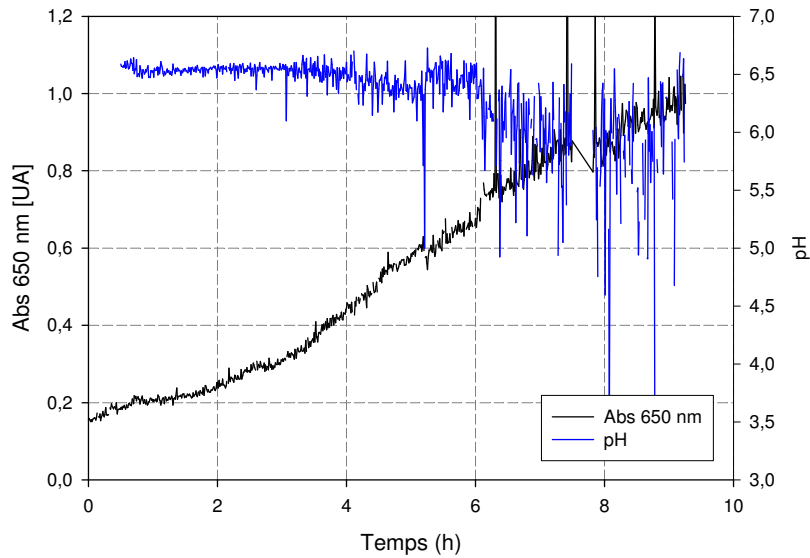


Figura 6.3.7. Evolució de la biomassa i el pH en un cultiu de *P. pastoris* (medi YPD) monitoritzat amb el sistema d'un únic minibioreactor.

Tal i com s'observa a la gràfica (figura 6.3.7), es segueix un típic creixement exponencial amb una velocitat específica màxima de creixement $0,26 \text{ h}^{-1}$. Els valors d'absorbància assolits a les 10 h de cultiu novament no són comparables als que s'havia assolit anteriorment (veure apartat 4.3) si no s'aplica un calibratge per a que les dades siguin equivalent a les d'un espectrofotòmetre convencional.

A diferència dels cultius amb *E. coli*, el calibratge de biomassa (absorbància 650 nm) amb *P. pastoris* no s'ajusta a una equació de primer grau, sinó que l'ajust es realitza amb una equació de segon grau (Eq 6.3.2)

$$Abs(\text{convencional}) = 3.300 \times Abs(\text{sistema cultiu})^2 + 2.304 \times Abs(\text{sistema cultiu}) + 0,175$$

Eq 6.3.2

Aplicant aquest, s'obtenen valors d'absorbància (a 650 nm) de 5,78 UA, comparables als que s'havien obtingut a l'apartat 4.3 a les 10 h de cultiu.

Referent a l'evolució de pH, si bé inicialment aquest es manté força estable, a partir de les 3-4 hores hi comença a haver una tendència a l'acidificació. Aquesta petita davallada, ja és suficient com perquè hi hagi una pèrdua de sensibilitat de la mesura, degut al rang de viratge de l'indicador de pH (roig de fenol). Caldria doncs, utilitzar un altre indicador de pH amb el rang més ampli en futurs experiments. Es proposa el Litmus, el qual vira de 5 a 8.

6.4. Discussió

En aquest apartat s'ha pogut demostrar la possibilitat de realitzar cultius de cèl·lules animals en suspensió, en un sistema d'un únic minibioreactor i de sis minibioreactors. En les durades habituals de subcultius (48-72 h) s'ha mantingut les cèl·lules en suspensió, evitant la formació de gradients, mantenint concentracions d'oxigen no limitants, i en el cas d'hidridomes KB-26.5 s'ha pogut comprovar que no hi havia limitació en les velocitats de creixement observades.

Per a cèl·lules animals en suspensió, els sistemes de múltiples minibioreactors desenvolupats han demostrat la capacitat de realitzar cultius reproduïbles, donat que a una mateixa condició experimental s'han observat els mateixos resultats en tots els minibioreactors.

També per a cèl·lules en suspensió, s'ha demostrat la capacitat dels sistemes emprats per a veure diferències de creixement i metabolisme quan s'experimenta amb diferents condicions de cultiu. Així, la mesura de biomassa ha seguit de forma eficient el creixement del cultiu en els trams de creixement exponencial; la mesura de pH ha estat un bon indicador metabòlic, mostrant una acidificació proporcional al creixement, i indicant els punts on hi havia exhauriment de nutrients; l'oxigen dissolt ha permès monitoritzar que les concentracions d'oxigen no esdevenien limitants en cap instant del cultiu; i, finalment, el consum d'oxigen dissolt, tot i tenir una dispersió més elevada, també s'ha pogut seguir, mostrant una evolució proporcional a l'activitat metabòlica dels cultius.

En el cas de cèl·lules animals anclatge-dependents, també s'ha aconseguit un creixement eficient en els minibioreactors, havent-hi la possibilitat de realitzar tractaments sobre els plàstics per tal d'incrementar la capacitat de diferents models cel·lulars d'adherir-se al plàstics.

Pel que fa a la funcionalitat de les mesures, en el cas de les cèl·lules adherents model (Vero, HEK293) no és possible realitzar mesures d'absorbància per a mesurar directament la biomassa, i els consums d'oxigen són menors, de manera que ni la mesura d'oxigen dissolt ni la del consum d'oxigen permeten un seguiment dels cultius. La mesura que permet seguir l'evolució dels cultius, a partir del seu metabolisme, és el pH, que permet seguir les diferències d'activitat entre els cultius.

En els cultius sobre microcarriers, els comportaments han estat similars als experimentats en els cultius de cèl·lules adherents creixent sobre els plàstics, podent-se realitzar seguiments en base a l'evolució del pH.

Pel que fa a la possibilitat de controlar la concentració d'oxigen dissolt, s'ha pogut realitzar un cultiu amb un únic minibioreactor controlant la concentració al 60% (amb un error del +10/-20%), si bé s'ha pogut veure que a mesura que el consum del cultiu era major, augmentava la precisió del control fins el punt que s'ha deixat d'emprar nitrogen per al control (suplint el consum de les cèl·lules l'efecte de l'aplicació d'un cabal de nitrogen) i pràcticament ha desaparegut l'oscil·lació. Aquest fet obre la possibilitat de millorar el control substituint el nitrogen per mescles de gasos que no provoquin el control inestable que provoca el fet d'intentar controlar una concentració del 60% amb gasos contenint concentracions molt llunyanes a aquesta (0 i 100%). La millor opció seria disposar d'una estació de mescla de gasos per tal que operés juntament amb el controlador, encara que cal tenir en compte el cost i complicació dels sistemes de minibioreactors que aquesta comportaria.

Referent a la possibilitat de controlar el pH, s'ha pogut realitzar un cultiu amb un control acurat del pH al voltant de $\text{pH} = 7,02$, observant-se certes diferències cinètiques entre els casos amb i sense control de pH. De totes maneres, cal tenir en compte que les diferències també han estat observades en els controls de creixement respectius realitzats en flascons.

Pel que fa a la comparació realitzada entre sistemes de cultiu, comparant els creixement obtinguts emprant una línia cel·lular d'hibridoma amb els minibioreactors desenvolupats en el present treball i amb bioreactors de major volum (2 L). És important esmentar que conceptualment ha d'existir una diferència entre les corbes de creixement que es comparen, ja que cada cultiu té un històric diferent (nº ressembres, història inòcul, entre d'altres), però tot i això, en el tram on les condicions no són limitants, les velocitats de creixement mesurades han de ser properes, com s'ha pogut comprovar en l'estudi realitzat.

Finalment, per al possible cultiu de bacteris i llevats, tot i que no aquest no era l'objectiu de disseny del sistema de minibioreactors desenvolupat, per a permetre l'exploració d'aquest models s'ha realitzat adequacions el sistema de seguiment de pH, i també en els d'agitació i aeració per augmentar la capacitat de transferència d'oxigen. D'aquesta manera s'ha pogut realitzar la prova de concepte del sistema en sistemes d'un únic minibioreactor, obtenint-se resultats satisfactoris que demostren la potencialitat del sistema de múltiples minibioreactors per a ser emprat en cultius de bacteris i llevats.

7. CONCLUSIONS

En aquest treball s'ha assolit el desenvolupament d'un sistema de minibioreactors de petita escala (10-15 mL), que permet la realització de sis experiments de cultiu en paral·lel, mantenint condicions de cultiu no limitants en el rang d'estudi (agitació, temperatura, pH, oxigen dissolt), i disposant del seguiment de variables de creixement i activitat metabòlica dels cultius.

En els diferents apartats d'aquest treball s'han dissenyat i desenvolupat els diferents elements tecnològics per assolir aquesta funcionalitat global del sistema de cultiu, que s'ha centrat en aplicacions per a cèl·lules animals, si bé també s'ha explorat les adequacions necessàries per a bacteris i llevats.

Pel que fa als elements tecnològics, els sistemes desenvolupats permeten realitzar cultius amb sistemes d'agitació no estressants, amb un grau de mescla elevat per evitar la presència de gradients, una transferència d'oxigen que permet el creixement sense limitacions de cultius de cèl·lules animals en els rangs de concentració cel·lular desitjats, i una elevada reproduïbilitat entre els diferents minibioreactors.

Pel que fa al desenvolupament dels sistemes de mesura, les tecnologies desenvolupades permeten realitzar un seguiment de l'evolució de les variables físico-químiques principals (pH, oxigen dissolt) en els rangs de cultiu de cèl·lules animals, aportant informació d'interès relativa al creixement i metabolisme del cultiu.

En tots els cultius realitzats, les dades emprades per a la posterior discussió dels experiments han estat les mesures de concentració cel·lular (per absorbància), que combinades amb el coneixement de l'ambient físico-químic on s'han realitzat els cultius (temperatura, pH, oxigen dissolt, composició del medi) ens permeten explicar els comportaments dels organismes estudiats.

El coneixement de la concentració cel·lular (per absorbància), ha esdevingut una base de disseny ja que és la mesura més directa del creixement dels cultius, i més universalment emprada pels potencials usuaris de la tecnologia a desenvolupar. El sistema de mesura desenvolupat, basat en un sistema òptic de mesura d'absorbància, té una potencialitat de seguiment de cèl·lules en suspensió en el rang habitual de treball, de 2 a 20×10^5 Cèl·l./mL, amb un error menor a $1,2 \times 10^5$ Cèl·l./mL. De totes maneres, els resultats obtinguts han mostrat que aquesta mesura no és suficient per conèixer si existeixen limitacions en els cultius que puguin explicar diferències metabòliques i, addicionalment també s'ha observat que mentre el cultiu creix exponencialment l'absorbància és una bona mesura del creixement, però cal tenir en compte que quan això no és així i augmenta el percentatge de cèl·lules no viables, l'absorbància segueix

les cèl·lules totals i no permet distingir entre viables i no viables. Així doncs, esdevenen d'elevada rellevància altres indicadors que puguin completar la mesura de concentració cel·lular, mostrant les limitacions existents i les diferències en els comportaments metabòlics.

Referent al sistema de mesura de pH, basat en el seguiment d'un indicador present als medis de cultiu de cèl·lules animals (roig de fenol), ha emprat el mateix sistema òptic de mesura d'absorbància que l'emprat per a la mesura de concentració cel·lular. A partir d'un esquema de càlcul per a determinar la contribució de l'absorbància total deguda a l'indicador de pH, s'ha aconseguit un realitzar el seguiment de pH en el rang $6,5 < \text{pH} < 8,5$, amb un error menor al 1,6%. En relació a la informació aportada per aquesta variable, en els casos d'estudi es mostra com un indicador de l'activitat metabòlica del cultiu. Durant l'estudi de les potencialitats d'aquesta variable s'observava que depenent de l'aerobiosi del cultiu variaven les tendències d'evolució del pH durant el cultiu. Addicionalment, en el cas que les condicions d'aeració estiguin controlades i ni hi hagi limitacions, el pH possibilita el seguiment del creixement del cultiu, sempre i quan les formulacions del medi siguin les adequades i no hi hagi exhauriments de nutrients que impliquin canvis metabòlics. En el cas que apareguin limitacions en els medis de cultiu, el pH també ha mostrat la seva funcionalitat com a indicador, ja que la seva evolució varia una vegada s'exhaureixen determinats components del medi de cultiu. També cal tenir en compte que és d'especial interès disposar d'un seguiment del pH per tal de conèixer si el pH ha estat en tot moments dins de rangs òptims de creixement/productió dels cultius, i per saber si aquesta variable pot explicar diferències de creixement/productivitat experimentades respecte altres sistemes de cultiu. Addicionalment, emprant un sistema amb un únic minibioreactor, s'ha demostrat que, amb el disseny i tecnologia emprats, hi ha la potencialitat de controlar el pH al voltant de la consigna de treball ($\text{pH} = 7,0 \pm 0,13$ unitats).

El sistema de mesura d'oxigen desenvolupat permet realitzar un seguiment d'aquesta variable i identificar la possible existència de limitacions. El rang de seguiment es situa entre el 0 i 100% de saturació d'aire amb un temps de resposta menor a 5 s i una estabilitat elevada (desviació menor al 2,0%) durant el temps de realització dels cultius. A part de permetre la identificació de potencials limitacions, emprant un sistema d'un únic minibioreactor s'ha demostrat la possibilitat de controlar l'oxigen dissolt al voltant de la consigna habitual de treball ($[\text{O}_2] = 60\%, +10/-20\%$), i addicionalment aquesta tecnologia permet disposar d'un indicador metabòlic a partir de les mesures de consum d'oxigen (OUR), que presenta una desviació entre bioreactors menor a 0,008 mmol/Lxh i una deriva de 0,0049 mmol/Lxh per dia, dades que donen la possibilitat de realitzar un seguiment de l'activitat dels cultius, sempre i quan les concentracions cel·lulars siguin

suficientment elevades per tal que els valors de OUR esperats estiguin significativament per sobre dels errors de la mesura.

Profunditzant en les observacions realitzades en els cultius de cèl·lules animals en suspensió, s'ha demostrat la possibilitat de realitzar cultius en sistemes d'un únic minibioreactor i de múltiples minibioreactors en les durades habituals de subcultius (48-72 h), mantenint les cèl·lules en suspensió, evitant la formació de gradients, mantenint concentracions d'oxigen no limitants, i en el cas d'hidridomes KB-26.5 s'ha pogut comprovar que no hi ha limitació en les velocitats de creixement observades. També per a cèl·lules en suspensió, s'ha demostrat la capacitat dels sistemes emprats per a detectar diferències de creixement i metabolisme quan s'experimenta amb diferents condicions de cultiu. La mesura de concentració cel·lular ha seguit de forma eficient el creixement del cultiu en els trams de creixement exponencial; la mesura de pH ha estat un bon indicador metabòlic, mostrant una acidificació proporcional al creixement, i indicant els punts on hi havia exhauriment de nutrients; l'oxigen dissolt ha permès monitoritzar que les concentracions d'oxigen no esdevenien limitants en cap instant del cultiu; i, finalment, el consum d'oxigen dissolt, tot i tenir una dispersió més elevada, també s'ha pogut seguir, mostrant una evolució proporcional a l'activitat metabòlica dels cultius.

En el cas de cèl·lules animals anclatge-dependents, també s'ha aconseguit aconseguir un creixement eficient en els minibioreactors, havent-hi la possibilitat de realitzar tractaments sobre els plàstics per tal d'incrementar la capacitat de diferents models cel·lulars d'adherir-se al plàstics. Pel que fa a la funcionalitat de les mesures, en el cas de les cèl·lules adherents model (Vero, HEK293) no és possible realitzar mesures d'absorbància per a mesurar directament la concentració cel·lular, i els consums d'oxigen són menors, de manera que ni la mesura d'oxigen dissolt ni la del consum d'oxigen permeten un seguiment dels cultius. La mesura que permet seguir l'evolució dels cultius, a partir del seu metabolisme, és el pH, que permet seguir les diferències d'activitat entre els cultius. En els cultius sobre microcarriers, els comportaments han estat similars als experimentats en els cultius de cèl·lules adherents creixent sobre els plàstics, podent-se realitzar seguiments en base a l'evolució del pH.

Pel que fa al cultiu de bacteris i llevats, tot i que no aquest no era l'objectiu de disseny del sistema de minibioreactors desenvolupat, per a permetre l'exploració d'aquest models s'ha realitzat adequacions el sistema de seguiment de pH, i també en els d'agitació i aeració per augmentar la capacitat de transferència d'oxigen. D'aquesta manera s'ha pogut realitzar la prova de concepte del sistema en sistemes d'un únic minibioreactor, obtenint-se resultats satisfactoris que demostren la potencialitat del sistema de múltiples minibioreactors per a ser emprat en cultius de bacteris i llevats.

Finalment, es creu necessari destacar com a fites assolides pel projecte les patents concedides (ES2208127, US7442538, JP4394005, EP1580261), i el procés de transferència tecnològica completat cap a una empresa que ha portat les tecnologies presentades fins a una fase d'exploració industrial.

8. MATERIALS I MÈTODES

8.1. Línies cel·lulars i soques emprades

En aquest treball s'han emprat per una banda línies cel·lulars i cultius primaris de cèl·lules animals, i per l'altra, soques de bacteris i llevats.

Els diferents models cel·lulars s'han emprat bàsicament en el capítol de validació de les estratègies de seguiment seleccionades (capítol 4), i en el capítol de realització de cultius amb diferents models biològics (capítol 6), on es valida la funcionalitat del sistema de cultiu desenvolupat.

8.1.1. Cèl·lules animals

Pel que fa a les cèl·lules animals, en diferents apartats del present treball s'han utilitzat dues línies cel·lulars d'hibridomes (KB26.5, BHRF1), una línia de cèl·lules Vero i una altra de cèl·lules HEK293, i cultius primaris de condrocits humans.

8.1.1.1. Hibridomes

S'ha emprat dues línies cel·lulars. La primera és la línia d'hibridoma KB-26.5 (cedida pels laboratoris Knickerbocker, Barcelona), prové de la fusió de cèl·lules de mieloma murines NS1 i limfòcits B murins Balb C. Aquest hibridoma produeix una immunoglobulina del tipus IgG₃ contra l'antigen A1 d'eritròcits, anticòs que s'utilitza per al tipatge dels grups sanguinis. La segona de les línies cel·lulars emprades és la mateixa KB-26.5, sotmesa a una transfecció addicional per integrar al genoma el gen responsable de l'expressió de la proteïna (BHRF1) derivada Epstein-Barr virus, que està relacionat amb la inhibició del programa de mort cel·lular programada (apoptosis).

8.1.1.2. Cèl·lules Vero

La línia cel·lular Vero es va derivar del fetge del mono verd Africà (*Cercopithecus*) per primer cop al 1962 (Yasumura i Kawakita, 1963) i és una línia cel·lular adherent establerta (creix indefinidament en cultiu), lliure d'agents adversos i que no forma tumors durant el nombre de ressembres en els períodes habituals de treball. Les seves característiques de creixement in vitro: una elevada robustesa i una velocitat de creixement de les més ràpides entre les cèl·lules animals adherents, fan que sigui la línia cel·lular òptima per a la realització dels desenvolupaments duts a terme en aquest treball.

8.1.1.3. Cèl·lules HEK293

Les línies cel·lulars de HEK293 van ser generades mitjançant la transformació de cultius de cèl·lules embrionàries de ronyó humà amb DNA d'adenovirus als laboratoris d'Alex Van der Eb a Leiden, Holanda, a principi de la dècada de 1970. La línia emprada és una línia comercial, emprada per les seves facilitats de transfecció per a la producció de proteïnes recombinants, així com la facilitat per ser infectada, també amb finalitats productives.

8.1.1.4. Condròcits humans

Aquest cultiu primari ha estat aïllat durant la realització d'una artroscòpia, en el marc d'un projecte en el qual participava el grup de recerca on s'ha realitzat aquest treball. Concretament, es tractà d'un projecte del Plan Nacional de Biotecnologia, amb el títol "Transplante autólogo de condrocitos cultivados *in vitro* en una matriz biocompatible, usando como técnica quirúrgica la artroscopia".

8.1.2. Bacteris i llevats

En quant a les cèl·lules bacterianes, s'ha utilitzat una soca d'*Escherichia coli* (DH5 α), i en quant a cèl·lules de llevats s'ha emprat una soca de *Pichia pastoris* (GS115). Aquestes dues espècies són àmpliament utilitzats entre els bacteris i llevats per a finalitats de producció de proteïnes recombinants (Baneyx i Mujacic, 2004; Vidal, 2006; Cereghino i Cregg, 2000; Solà i Col. 2004).

8.1.3. Congelació i descongelació

Per a congelar les soques tant de bacteris com de llevats es va emprar el protocol següent:

1. Preparar stock glicerol al 55% (V/V) en aigua destil·lada, esterilitzar a 121°C 15 min.
2. Afegir 0,5 mL de solució de glicerol al vial de congelació (estèril).
3. Afegir 0,5 mL de cultiu creixent exponencialment al criotub.
4. Agitar (manualment o amb el vòrtex, de forma el més suau possible).
5. Mantenir a -80°C.

Cada vegada que ha hagut de descongelar-se alguna de les soques de bacteris o llevats s'ha procedit a descongelar un dels vials de congelació contenint la soca desitjada, i emprant una nansa de sembra, s'ha transferit una alíquota del vial a una placa de medi sòlid, des de la qual, una vegada hi ha hagut creixement, s'ha emprat el seu contingut per als experiments en medi líquid desitjats.

En el cas de cèl·lules Vero, HEK293 i condròcits, no s'han emprat procediments de congelació ni descongelació, ja que han estat subministrades pel grup de recerca on s'ha dut a terme aquest treball, i els protocols de congelació estan descrits, respectivament en els treballs de Sarró (2009), Gálvez (2010), i Rodríguez (2006).

En el cas de les cèl·lules d'hibridoma, per a la congelació (preparació estoc de 10 criotubs) s'ha seguit el següent protocol:

1. Fer créixer 160 mL (4 flascons amb 40 mL cadascun) d'un cultiu de cèl·lules fins que es trobin a la meitat de la fase exponencial (aproximadament a les 48 hores de cultiu, cosa que amb un inòcul de 2×10^5 cèl·l viables/mL correspon a una concentració aproximada de $6-8 \times 10^5$ cèl·l viables/mL). És de gran importància que les cèl·lules es trobin en aquest punt del seu creixement, ja que la seva viabilitat ha de ser alta (> 90%).
2. Preparació dels medis de congelació:
 - MEDI A: 50 mL de Medi DMEM base amb 10% de FCS. Mantenir a temperatura ambient.
 - MEDI B: 10 mL Medi DMEM base amb 10% de FCS i 20% de dimetilsulfòxid (DMSO) (Sigma, D-2650). Mantenir a 4 °C.
3. Centrifugar el volum de cultiu a 500 g durant 5 minuts. Descartar el sobrenedant i ressuspènere les cèl·lules (sediment) en un total de 40 mL de MEDI A. Agafar una petita alíquota de 75 µL d'aquesta suspensió i recomptar-ne les concentracions de cèl·lules viables i no viables.

Tornar a centrifugar la suspensió cel·lular a 500 g durant 5 minuts. Descartar el sobrenedant i ressuspènere el sediment amb un volum de MEDI A equivalent a la meitat del necessari per a tenir una concentració de cèl·lules viables de 8×10^6 cèl·lules viables/mL. Mantenir les cèl·lules 10 minuts a 4 °C.

Afegir l'altra meitat del volum calculat, en aquest cas de MEDI B (amb DMSO). El DMSO és un crioprotector que pot penetrar a l'interior de la cèl·lula, però que és altament tòxic per aquesta. Per aquest motiu, és important que en el moment d'afegir el MEDI B la cèl·lula estigui a 4 °C, i que l'addició es faci lentament per tal d'evitar un xoc.

4. Transferir ràpidament la suspensió de cèl·lules als criotubs, prèviament preparats en una gradeta amb gel. A cada criotub posar 1 mL de la suspensió cel·lular. La solució final en què les cèl·lules es mantindran congelades té un 10% (v/v) de FCS i un 10% (v/v) de DMSO (0.5 mL de medi A i 0.5 mL de medi B). Portar ràpidament els criotubs a un congelador de -80 °C. A les 24 hores transferir els criotubs a un contenidor de nitrogen líquid.

Per a la descongelació d'hibridomes el procés emprat ha estat el següent:

1. Preparació dels medis de descongelació:
 - MEDI C: 20 mL de Medi DMEM base amb 20% (v/v) de FCS (4 mL de FCS + 16 mL de DMEM). Repartir els 20 mL del medi C entre 2 tubs de centrífuga estèrils (10 mL + 10 mL) (Nunc, 339497) i posar-los a 37 °C.
 - MEDI D: Medi DMEM base al 4% (v/v) de FCS. Mantenir a 37 °C.
2. Agafar un criotub del congelador de nitrogen líquid i posar-lo a l'incubador de CO₂ a 37 °C. És important que la suspensió cel·lular no es deixi més temps del necessari per descongelar-se, ja que el medi de congelació porta DMSO i aquest és tòxic per a les cèl·lules. Quan el contingut del criotub s'ha descongelat, afegir unes gotes dels 10 mL de MEDI C escalfat a 37 °C, homogeneïtzar la suspensió cel·lular amb una pipeta *Pasteur* estèril i passar tota la suspensió al tub de centrífuga que conté la resta dels 10 mL de MEDI C.
3. Centrifugar a 500 g durant 5 minuts. Per tal d'eliminar el DMSO que porta el medi de congelació, eliminar el sobrenedant i realitzar un segon rentat ressuspenent el sediment amb els 10 mL de MEDI C restants, traient-ne una mostra de 75 µL per recomptar-ne les cèl·lules viables i mortes, i centrifugant-lo novament a 500 g durant 5 min. Amb el recompte de cèl·lules realitzat es pot calcular el volum de MEDI D que cal afegir per ressuspendre el sediment i tenir una concentració de cèl·lules viables de 5×10^5 cèl·l/mL. Transferir a un flascó de cultiu i mantenir a 37 °C a l'incubador de CO₂.

4. Els primers dos dies és normal que el cultiu tingui una viabilitat baixa, de manera que es realitzaran ressembres a les 24 i 48 h (amb un inòcul com a mínim de 2×10^5 cèl·l viables/mL) per tal d'eliminar les possibles restes de DMSO.

8.1.4. Medis de cultiu

8.1.4.1. Medis de cultiu per a hibridomes

Per al cultiu dels hibridomes s'han emprat diferents medis. Com a base s'ha emprat el medi *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), del qual s'ha emprat diferents referències (Sigma D-5030, Sigma D-5796, Sigma D-8062). També en determinats casos s'ha emprat medis sense sèrum (SFM GIBCO 12045, CD GIBCO 112794) per tal de comparar les diferències de comportament dels cultius entre uns i altres medis.

En el cas dels medis DMEM, s'han emprat suplementes per tal d'ajustar la concentració de glutamina (que era l'element limitant del medi), dotar al medi de factors de creixement (mitjançant l'addició de sèrum), entre altres. A continuació es presenten quins han estat els suplementes emprats en cada cas:

- Sigma, D-5796. Suplementat amb L-glutamina (Sigma, G-5763) fins arribar a una concentració de 0,877 g/L, 0,5 mL/L insulina (Solució 4 UI/mL, Actrapid Novo), 0,5 mL/L β -mercaptoetanol (Solució 0,1 M, Sigma M-6250), i un 10% de *Foetal Calf Serum* (FCS) (Biological Industries, Cat. 04-001-1A, Lot 415360).
- Sigma, D-5030. Suplementat amb L-glutamina (Sigma, G-5763) fins arribar a una concentració de 0,877 g/L, 0,5 mL/L insulina (Solució 4 UI/mL, Actrapid Novo), 0,5 mL/L β -mercaptoetanol (Solució 0,1 M, Sigma M-6250), suplementat amb 10% *Foetal Calf Serum* (FCS) (Biological Industries, Cat. 04-001-1A, Lot 415360)
- Sigma, D-8062. Suplementat amb un 10% de *Foetal Calf Serum* (FCS) (Biological Industries, Cat. 04-001-1A, Lot 415360).

A continuació es presenta en forma de taula (8.1.1) la composició detallada de cadascuna de les referències de medi DMEM emprades. En els casos de medis definits sense sèrum, els proveïdors no subministren la composició dels medis.

Component	Concentració compostos (g/L)		
	Sigma D-5030	Sigma D-5796	Sigma D-8062
SALS INORGÀNIQUES			
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,265	0,265	0,1166
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,0001	0,0001	0,00005
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	0,000417
MgSO ₄	0,09767	0,09767	0,04884
MgCl ₂ ·6H ₂ O	-	-	0,0612
KCl	0,4	0,4	0,3118
NaHCO ₃	3,7 ¹	3,7	1,2
NaCl	6,4	6,4	6,996
Na ₂ HPO ₄			0,07102
NaH ₂ PO ₄	0,109	0,109	0,0543
CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	-	0,0000013
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	0,000432
AMINOÀCIDS			
L-Alanina	-	-	0,00445
L-Arginina·HCl	0,084	0,084	0,1475
L-Asparagina·H ₂ O	-	-	0,0075
L-Àcid aspàrtic	-	-	0,00665
L-Cisteïna·2HCl	-	-	0,03129
L-Cistina·2HCl	0,0626	0,0626	0,01756 ²
L-Glutamina	-	0,584	0,365
L-àcid glutàmic	-	-	0,00735
Glicina	0,030	0,030	0,01875
L-Histidina·HCl·H ₂ O	0,042	0,042	0,03148
L-Isoleucina	0,105	0,105	0,05447
L-Leucina	0,105	0,105	0,05905
L-Lisina·HCl	0,146	0,146	0,09125
L-Metionina	0,030	0,030	0,01724
L-Fenilalanina	0,066	0,066	0,03548

Component	Concentració compostos (g/L)		
	Sigma D-5030	Sigma D-5796	Sigma D-8062
L-prolina	-	-	0,01725
L-Serina	0,042	0,042	0,02625
L-Treonina	0,095	0,095	0,05345
L-Triptòfan	0,016	0,016	0,00902
L-Tirosina (sal disòdica)	0,10379	0,10379	0,05579
L-Valina	0,094	0,094	0,05285
VITAMINES			
D-Biotina	-	-	0,0000035
D-Àcid pantotènic (sal	0,004	0,004	0,00224
Colina, clorur	0,004	0,004	0,00898
Àcid fòlic	0,004	0,004	0,00266
Myo-Inositol	0,0072	0,0072	0,0126
Niacinamida	0,004	0,004	0,00202
Piridoxal·HCl	0,004	-	0,002
Piridoxina.HCl	-	-	0,002031
Riboflavina	0,0004	0,0004	0,000219
Tiamina·HCl	0,004	0,004	0,00217
Vitamina B ₁₂	-	-	0,00068
ALTRES COMPONENTS			
Glucosa	4,5 ¹	4,5	3,15
Roig de fenol	0,015 ¹	0,0159	0,00863
Hipoxantina	-	-	0,0021
Linoleic acid	-	-	0,000042
Putrescina.HCl	-	-	0,000081
Àcid pirúvic	-	-	0,055
Àcid DL-Thioctic	-	-	0,00105
Timidina	-	-	0,00365

¹ A afegir posteriorment

² Sal monoclorídrica. Monohidratat.

Taula 8.1.1. Composició dels medis DMEM emprats.

8.1.4.2. Medi de cultiu per a cèl·lules Vero

El medi emprat pel cultiu de cèl·lules Vero ha estat el *Glasgow Minimum Essential Medium* (GMEM) (GIBCO 21710), suplementat amb el 10% de sèrum fetal boví (FBS, SIGMA F9665, lot 058K336). Aquest medi líquid comercial conté sals inorgàniques, aminoàcids i vitamines imprescindibles pel creixement d'aquest tipus cel·lular. La seva composició es detalla a la Taula 8.1.2:

Component	Concentració compostos (g/L)	Component	Concentració compostos (g/L)
Sals inorgàniques		Vitamines	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,265	Choline Chloride	0,002
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,0001	Àcid Fòlic	0,002
MgSO ₄ (anhidre)	0,09767	myo-Inositol	0,0036
KCl	0,4	Niacinamide	0,002
NaHCO ₃	2,75	D-Pantothenic àcid·½Ca	0,002
NaCl	6,4	Pyridoxal·HCl	0,002
NaH ₂ PO ₄ (anhidre)	0,1078	Riboflavin	0,0002
Aminoàcids		Thiamine·HCl	0,002
L-Arginine·HC	0,042	Altres	
L-Cystine·2HCl	0,03129	Glucosa	4,5
L-Glutamine	0,292	Roig de fenol	0,016
L-Histidine·HCl·H ₂ O	0,021		
L-Isoleucine	0,0524		
L-Leucine	0,0524		
L-Lysine·HCl	0,0731		
L-Methionine	0,015		
L-Phenylalanine	0,033		
L-Threonine	0,0476		
L-Tryptophan	0,008		
L-Tyrosine·2Na·H ₂ O	0,05219		
L-Valine	0,0468		

Figura 8.1.2. Composició del medi de cultiu GMEM.

8.1.4.3. Medi de cultiu per a cèl·lules HEK293

Per al cultiu de cèl·lules HEK293 s'ha emprat un medi DMEM (D5796) (veure composició a l'apartat 8.1.4.1), suplementat amb L-glutamina (Sigma, G-5763) fins arribar a una concentració de 0,877 g/L, 0,5 mL/L insulina (Solució 4 UI/mL, Actrapid Novo), 0,5 mL/L β-mercaptoetanol (Solució 0,1 M, Sigma M-6250), i 10% FBS (SIGMA F9665, lot 058K336).

8.1.4.4. Medis de cultiu per a *Escherichia coli*

Medi complex LB (Luria-Bertani)

Aquest és un medi ric en nutrients útil pel creixement d'un gran nombre de bacteris. La seva composició s'especifica en la taula 8.1.3:

Component	g/L
Peptona	10
Extracte de llevat	5
NaCl	10
H ₂ O ultrapura (18,2 MΩ)	Fins a 1 litre

Taula 8.1.3. Composició del medi de cultiu LB.

Un cop dissolts els components del medi, s'esterilitza per calor humit en un cicle de 30 minuts a 121 °C.

Per a preparar plaques de cultiu amb medi sòlid s'hi afegeix 15 g/L d'agar abans d'autoclavar, i un cop estèril es deixa refredar fins a uns 50 °C per tal de preparar les plaques en una cabina de flux.

Medi mínim M9

El medi M9 és un medi mineral salí que empra la glucosa com a font de carboni. Els seus components són els que es presenten a la taula 8.1.4:

Component	g/L
NH ₄ Cl	1,0
NaCl	0,5
KH ₂ PO ₄	3,0
Na ₂ HPO ₄	6,0
Glucosa	2,0
H ₂ O ultrapura (18,2 MΩ)	Fins a 1 L

Taula 8.1.4. Composició del medi de cultiu M9.

Independentment es preparen solucions de CaCl₂ (0,1 M) i de MgSO₄·7H₂O (1 M), i s'autoclaven el medi base i les solucions en un cicle de 30 minuts a 121 °C. Una vegada s'ha esterilitzat, s'addicionen les dues solucions salines corresponents tal com s'indica a la taula 8.1.5:

CaCl ₂ (0,1 M)	1 mL/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O (1 M)	1,5 mL/L

Taula 8.1.5. Addicions al medi base M9

8.1.4.5. Medis de cultiu per a *Pichia pastoris*

Medi ric YPD

El medi de cultiu YPD és un medi ric que utilitza la glucosa com a font de carboni. A la taula 8.6 se'n presenta la composició:

Component	g/L
Extracte de llevat	10
Peptona	10
Glucosa	20
H ₂ O ultrapura	Fins a 1 L

Figura 8.1.6. Composició del medi de cultiu YPD.

Per una banda es dissolen l'extracte de llevat i la peptona i s'esterilitzen per calor a 121°C durant 30 minuts. Per altra banda, es prepara una solució de glucosa, la qual s'esterilitza per calor a 121°C durant 15 minuts, de forma independent respecte els altres components per evitar caramelitzacions. Una vegada ambdues solucions estan per sota de 50 °C es mesclen, constituint aquesta mescla el medi YPD complet.

Medi mínim

El medi mínim emprat per al cultiu de *P. pastoris* contenia com a base *Yeast Nitrogen Base* (YNB), amb les concentracions i suplementes que es presenten a la taula 8.1.7:

Component	g/L
YNB (Difco, 239210)	6,7
Glucosa	2,0

Taula 8.1.7. Composició del medi mínim per a *P. pastoris*.

8.1.5. Manteniment en cultiu

El manteniment en cultiu presenta tres metodologies amb diferències importants: bacteris/llevats, cèl·lules animals en suspensió i cèl·lules animals adherents.

Per a bacteris i llevats, cada vegada que es comença una sèrie experimental s'ha descongelat els microorganismes corresponents. De totes maneres, mentre s'ha treballat en diferents experiments de curta durada (menor a 2 mesos), la soca s'ha guardat a la

nevera en plaques de medis solidificats amb agar (entre 15 i 20 g/L). Els cultius s'han mantingut en nevera aproximadament durant unes dues setmanes. A partir d'aquest moment s'han ressebrat en una nova placa, s'han incubat a la temperatura de creixement de l'organisme fins que hi ha hagut creixement i, assolit aquest, s'han tornat a guardar a la nevera.

En el cas de cèl·lules animals amb creixement en suspensió, una vegada es disposa de la línia cel·lular descongelada, les cèl·lules es cultiven en flascons de 25 cm² en incubadors a 37 °C, 95-99% d'humitat relativa i 5% de CO₂, durant un període màxim de 3 mesos. L'inòcul utilitzat és de 2-3×10⁵ cèl·l/mL, i es realitzen ressembres una vegada s'assoleixen concentracions de 8-15×10⁵ cèl·l/mL, aproximadament cada 2-3 dies (depenent de la línia cel·lular i el medi de cultiu emprats).

Per a la ressebra, es treu mostra del flascó de cultiu amb una pipeta, en un ambient estèril, i es realitza un recompte de cèl·lules vives en suspensió mitjançant un microscopi invertit de contrast de fases. A continuació es calcula el volum del cultiu vell que cal per obtenir l'inòcul desitjat en el cultiu nou. Aquest càlcul es du a terme aplicant la següent expressió:

$$V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1} \quad [mL] \quad \text{Eq. 8.1.1}$$

on V_1 és el volum del cultiu vell necessari per a l'inòcul en mL, V_2 el volum final desitjat del nou cultiu en mL (en aquest cas 10 mL), C_1 la concentració de cèl·lules viables que s'ha comptat prèviament al cultiu vell ($n \times 10^5$ cèl·lules viables/mL) i C_2 la concentració desitjada en el nou cultiu (en aquest cas 2×10^5 cèl·lules viables/mL). Així doncs, en el cas d'aquesta ressebra, l'expressió es pot simplificar de la següent manera:

$$V_1 = \frac{20}{n} \quad [mL] \quad \text{Eq. 8.1.2}$$

Afegir el medi fresc necessari per a la ressebra ($V_2 - V_1$) en un nou flascó de cultiu i incubar a 37 °C i en una atmosfera al 5% en CO₂.

Finalment, en el cas de cèl·lules animals anclatge-dependents, que creixen de forma adherent, la metodologia de manteniment en cultiu és similar que en el cas de les cèl·lules que creixen en suspensió, si bé en aquests casos els inòculs dels flascons són d'aproximadament $1-2 \times 10^4$ cèl·l/cm², es realitzen ressembres una vegada s'assoleix

confluència, aproximadament cada 3-4 dies, i en la metodologia de ressebra es requereixen passos de tripsinització i eliminació de la tripsina que es defineixen a continuació:

- Retirar el sobrenedant.
- Afegir 2 mL de PBS (en el cas de treballar amb flascons de 25 cm²) per a rentar el flascó de restes de sèrum (inactiva l'efecte de la tripsina).
- Afegir entre 0,5 i 1 mL de solució de tripsina (0,05% de tripsina en EDTA) i incubar a 37°C durant uns 5 minuts. S'ha d'anar comprovant visualment si les cèl·lules es desenganxen, per no allargar aquest pas més temps del necessari i evitar que els efectes de la tripsina puguin degradar la membrana de la cèl·lula.
- Un cop desenganxades, afegir el triple de volum de medi amb 10% de sèrum que de solució de tripsina i homogeneïtzar. El sèrum degut al seu alt contingut proteic inhibeix l'efecte de la tripsina sobre les cèl·lules.
- Una vegada calculat el volum de medi amb les cèl·lules desenganxades (a partir de l'equació 8.1.1), aquest es centrifuga a 500g durant 5 minuts, s'elimina el sobrenedant i es ressuspenen les cèl·lules amb el corresponent volum de medi fresc prèviament atemperat segons el flascó de cultiu nou i es posa al seu interior. El nou cultiu ja es pot posar a incubar a 37°C, 95% d'humitat i 5% de CO₂.

8.2. Sistemes de cultiu

8.2.1. Sistemes de cultiu control

Per a bacteris i llevats, els cultius control dels experiments s'han realitzat en Erlenmeyers, de 100 mL de volum total, i 25 mL de volum utilitzat. Una vegada inoculats, la seva incubació s'ha dut a terme en agitador orbital, a 150 rpm.

Per a cèl·lules animals (tant per a suspensió com per a adherència), tant per al manteniment dels cultius com per a emprar-los com a control dels experiments en minibioreactors s'utilitzen flascons de cultiu de poliestirè. Aquests s'adquireixen estèrils, emprant-ne de diferents àrees de cultiu (25, 75 i 150 cm²) en funció de la quantitat de cèl·lules desitjada. La presència d'un filtre de 0,22 µm de diàmetre de porus en el tap dels flascons permet el control del pH mitjançant l'intercanvi de gasos amb l'atmosfera controlada de CO₂ de l'incubador. Aquests flascons s'han utilitzat bàsicament per mantenir les ressembres de les línies cel·lulars, i realitzar els escalats de les cèl·lules a partir de què es preparen els inòculs per als diferents experiments.

8.2.2. Sistemes de cultiu amb minibioreactors

8.2.2.1. Minibioreactors individuals

A continuació es presenten els diferents sistemes amb un únic minibioreactor emprats en els diferents capítols del present treball.

8.2.2.1.1. Minibioreactors mecanitzats en metacrilat i poliestirè cristall

Per a la validació de les estratègies de seguiment seleccionades (capítol 4), s'ha mecanitzat minibioreactors en metacrilat (PMMA) i poliestirè (PS) cristall, d'una mida similar als que es pretenien desenvolupar, i amb ports de mesura que permetessin la connexió de les sondes convencionals (temperatura, pH, oxigen dissolt) de les quals es disposava al laboratori.

Concretament s'ha mecanitzat en PMMA cilindres de 32,5 mm de diàmetre i 32,5 mm. d'alçada, constant d'una base mecanitzada a partir de làmines de PS cristall, adherida al cilindre. Pel que fa a la coberta superior, aquesta es descriu a continuació, juntament amb la descripció global del prototip, amb l'ajut d'una figura.

A la figura 8.2.1 es mostra una representació esquemàtica del prototip de minibioreactor que s'ha emprat per a la realització dels experiments inicials. Per a agitar, s'ha col·locat una vareta imantada (12×6 mm) al fons del minibioreactor (1), que havia de situar-se sobre una placa d'agitació magnètica. Per a aerar (per capçal) i ventejar s'han deixat dos orificis a la tapa del minibioreactor, on s'encasten tubs de silicona, a un extrem dels quals es situen filtres per a gasos de 0,45 µm de diàmetre de porus (membranes Millipore SLFH) (2). Per a l'inòcul, s'ha deixat un altre orifici a la tapa, que es cobreix amb un cilindre de cautxú (4 mm) (3). Finalment, per a poder realitzar mesures de pH i oxigen dissolt, s'han deixat dos orificis de 12 mm a través dels quals es poden entrar les sondes de forma invasiva (4).

Pel que fa a les sondes emprades, aquestes han estat:

- Temperatura. Sonda de temperatura tipus PT-100.
- pH. Sonda HAMILTON Polyclave 200 (Bonaduz, Suïssa).
- Oxigen dissolt. Sonda d'oxigen Ingold 12 mm, Mettler-Toledo (Greifensee, Suïssa).

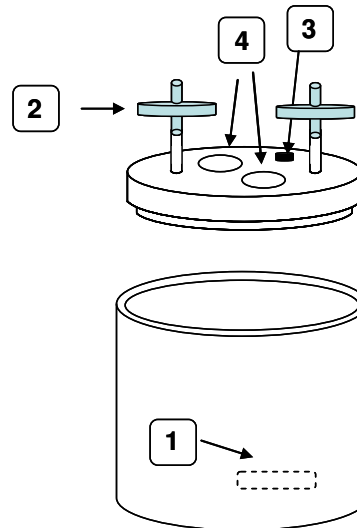


Figura 8.2.1. Representació minibioreactor mecanitzat en PMMA i PS cristall.

8.2.2.1.2. Minibioreactors injectats en poliestirè cristall

Els minibioreactors individuals d'un sol ús, tenen un volum de treball entre 10-15 mL, estan manufacturats mitjançant injecció de plàstic en motlle, es reben esterilitzats mitjançant radiació γ amb dosis de 15-25 KGy. A l'esquema de la figura 8.2.2 es mostren els principals elements que componen els minibioreactors:

- Port òptic per al seguiment de biomassa i pH a partir de mesures d'absorbància. El final del port és cec i la mesura d'absorbància es realitza mitjançant una fibra òptica situada a l'interior del port que transmet la llum que travessa el minibioreactor i la transmet cap a elements de mesura posteriors.
- Port per a la mesura d'oxigen. Al sistema de cultiu amb un únic minibioreactor el sistema de mesura era polarogràfic, de manera que al final del port era obert, havent-se de col·locar una membrana prèviament a l'esterilització dels minibioreactors.
- Sèptum. Utilitzat per al procés d'inoculació i presa de mostra off-line.
- Entrada de gasos. A les posicions indicades es situen filtres per a gasos de 0,45 μm de diàmetre de porus (membranes Millipore SLFH), per tal de permetre aeració i venteig per capçal.

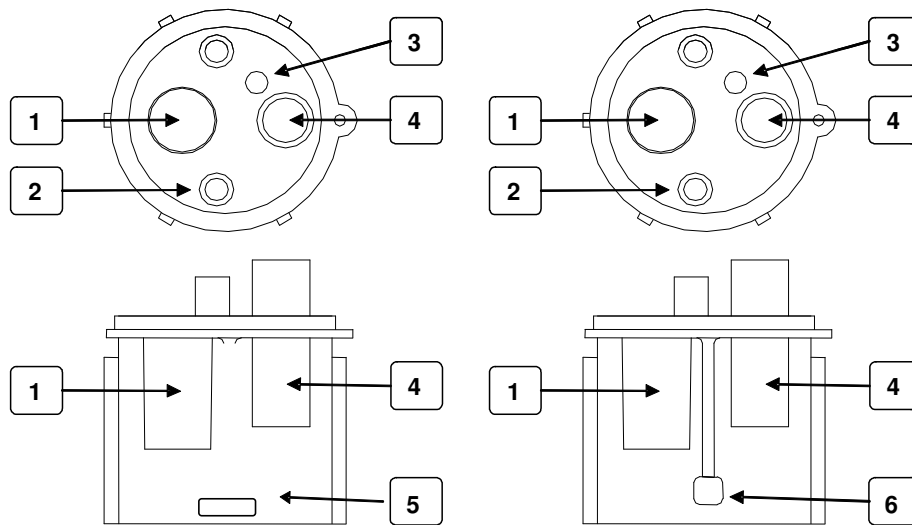


Figura 8.2.2. Esquema dels principals elements del minibioreactor. A l'esquerra, versió amb agitació mitjançant una vareta imantada i a la dreta, versió amb agitador pendular. 1) Port òptic, 2) Entrada/sortida de gasos, 3) Sèptum, 4) Port polarogràfic, 5) Agitador (vareta imantada), i 6) Agitador pendular.

El minibioreactor es troba conformat per dues unitats que encaixen per evitar fugites i contaminacions: la tapa i la base. A la figura 8.2.3 es mostren fotografies de cadascuna de les peces.

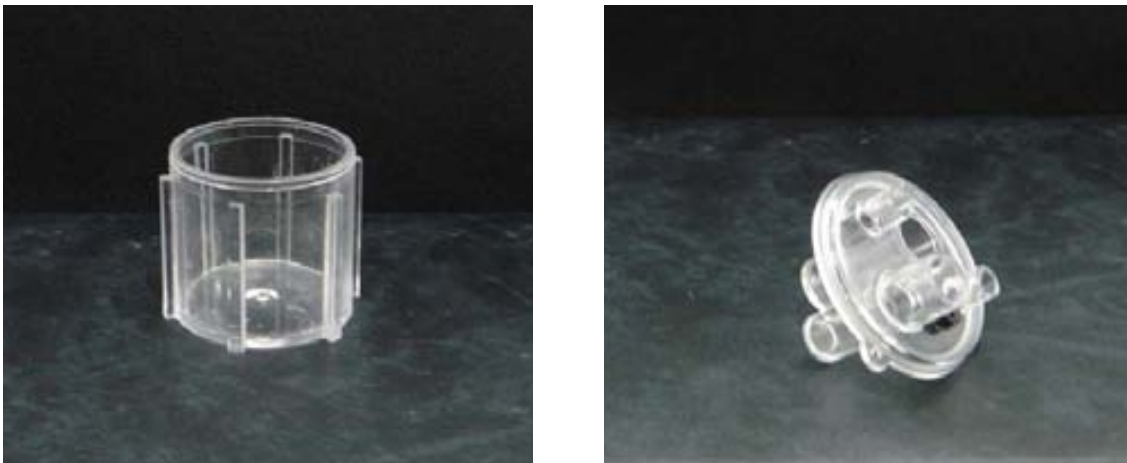


Figura 8.2.3. Fotografies de cadascuna de les peces que integren el minibioreactor (base i tapa).

Referent al port per a la mesura d'oxigen dissolt, a continuació es presenta el protocol seguit per a la manufactura i enganxament de les membranes permeables a gasos:

- i. Manufactura de les membranes. S'utilitza com a material de base una malla d'acer inoxidable AISI314 de 160 micròmetres de llum de pas i 75 μm de gruix de fil. Aquesta es talla i es submergeix en una solució de silicona Wacker E43 diluïda amb cloroform (15 mL cloroform / 10 g silicona). A continuador es posiciona en un bastidor (veure figura 8.1.4) i es deixa escórrer i assecar. Per tallar cercles de 6,3 mm de diàmetre s'utilitza una premsa amb una matriu de doble efecte construïda a mida (Perez de Tudela S.L., Palau de Plegamans), que es presenta a la figura 8.1.4.



Figura 8.1.4. Esquerra, bastidor amb la membrana d'acer inoxidable. Dreta, premsa amb la matriu per a tallar cercles de 6,3 mm de diàmetre.

- ii. Adhesió de les membranes. A continuació es presenten els passos per a l'adhesió de les membranes sobre el port corresponent, amb el suport gràfic de les imatges de la figura 8.1.5: preparar uns 10 mL de solució de silicona Wacker E43 en cloroform (6 mL silicona + 4 mL cloroform) en un tub Falcon de 15 mL. Amb l'ajut d'una punta de pipeta, escampar una gota de la solució a la superfície on posteriorment s'haurà de posicionar la membrana. A continuació, posicionar la membrana, i posar una nova capa de solució de silicona per la part exterior.



Pas 1. Escampar gota de solució de silicona amb l'ajut d'una punta de pipeta



Pas 2. Posicionar la membrana sobre el port polarogràfic



Pas 3. Escampar una gota de solució de silicona per a segellar la membrana des de l'exterior del port polarogràfic

Figura 8.1.5. Passos adhesió membrana silicona sobre el port polarogràfic del minibioreactor.

Pel que fa al sistema d'agitació, es presenta a l'apartat 8.4.1, d'equipament auxiliar.

En els casos en que s'ha aplicat tractaments per tal de millorar l'adhesió de cèl·lules anclatge-dependents, els tractaments emprats han estat:

Tractament d'activació química

Es basa en una modificació, menys agressiva, del tractament de neteja i activació d'Abtech (Abtech Scientific). El procediment és el següent:

- Escalfar a 50°C una solució 4:1 d' H_2SO_4 : H_2O_2 (al 30% en solució aquosa).
- Afegir 1 ml de la solució a la base del minibioreactor a tractar, esperar 30 segons i retirar-la.
- Rentar amb un flux d'aigua destil·lada durant un mínim de 3 minuts.
- Assecar amb un corrent de nitrogen filtrat.

Tractament d'activació per plasma

L'activació per plasma és un procés en el que la superfície a tractar (en aquest cas la superfície de creixement dels minibioreactors) es situa a l'interior d'un recipient al que se li aplica el buit i, seguidament, es reomple amb un gas a poca pressió (en aquest cas oxigen). Aquest gas, s'excita energèticament per a que les seves molècules creïn grups hidroxils a la base dels minibioreactors en el moment de xocar-hi. Així, al necessitar un sistema complex per a l'activació per plasma dels minibioreactors utilitzats, aquesta es realitza a Diener Electronic GmbH (Nagold, Alemanya).

8.2.2.1.3. Maquinari associat al sistema de cultiu d'un únic minibioreactor

Si bé en els experiments del capítol 4 s'ha emprat únicament els prototips de la figura 8.2.1, amb sistemes d'agitació externs i sondes convencionals, a partir del capítol 5, en el desenvolupament dels sistemes de mesura, s'ha començat a fer prototips de maquinari per a donar servei als minibioreactors.

Sistemes per al desenvolupament components òptics

Per al desenvolupament inicial del sistema òptic que s'havia d'integrar en els minibioreactors, s'ha emprat els prototips mecanitzats en metacrilat i PS, juntament amb una estructura per a suportar-lo a una altura suficient per tal de poder situar un sistema òptic amb una fibra d'irradiació a l'inferior del minibioreactor i les fibres de recepció a la part superior del reactor, on s'ha inserit en un dels orificis de la tapa, un cilindre de PMMA i el fons de PS cristall, de 12 mm de diàmetre extern i 9 mm de diàmetre intern, per tal d'utilitzar-lo com a port òptic. A la figura 8.2.6 es presenta el muntatge emprat, els components del qual s'expliquen a continuació.

La font de llum i la recepció de la llum recollida a la fibra situada al port òptic del minibioreactor estaven integrades en un espectrofotòmetre comercial (UV/VIS Spectrometer system, Steag Microparts, Dortmund, Alemanya).

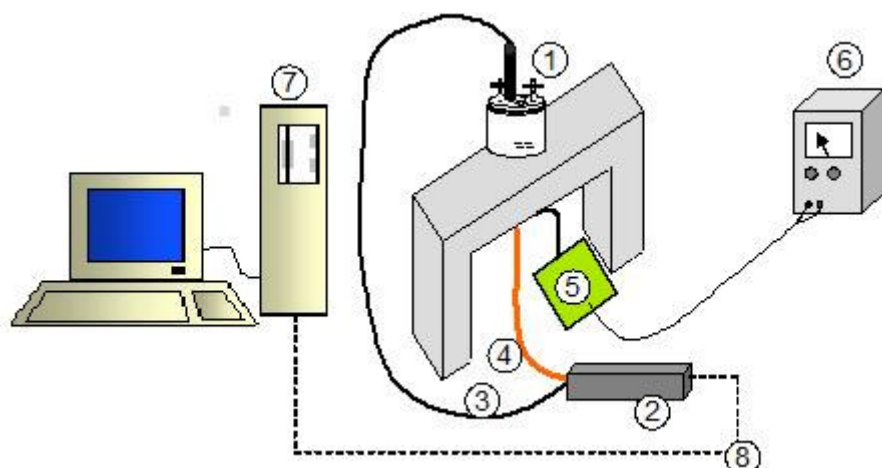


Figura 8.2.6. Representació simplificada del muntatge per al desenvolupament del sistema de mesura òptica, que incorpora els següents elements: 1) un prototip de minibioreactor mecanitzat amb metacrilat, 2) un espectrofotòmetre comercial de Steag Microparts amb 3) una fibra òptica que rep la llum que ha travessat el contingut del minibioreactor, i 4) una fibra òptica que condueix la llum des de la font, situada a l'espectrofotòmetre, fins al minibioreactor. El camp electromagnètic necessari per agitar el contingut del minibioreactor es genera mitjançant 5) una placa electrònica alimentada amb 6) una font d'alimentació. Les dades d'absorbància mesurades són transferides a 7) un ordinador de sobretaula, mitjançant 8) una connexió RS-232.

Per tal de mantenir en suspensió el contingut del minibioreactor s'ha emprat una placa que crea un camp electromagnètic altern (construïda al laboratori del grup d'Instrumentació Electrònica i Biomèdica del Departament d'Enginyeria Electrònica de la UPC) per tal de poder moure les varetes magnètiques (6×12 mm) utilitzades com a element d'agitació. Aquesta placa ha estat alimentada amb una font d'alimentació externa.

L'adquisició de les dades obtingudes amb l'espectrofotòmetre de Steag Microparts s'ha realitzat mitjançant un ordinador de sobretaula, connectat amb l'espectrofotòmetre mitjançant una connexió RS-232 i gestionant les comunicacions, visualització i registre de les dades mitjançant el programari propi de l'espectrofotòmetre.

Sistemes integrant el maquinari per al control de temperatura, aeració, realització de mesures òptiques i realització de mesures polarogràfiques

Una vegada s'ha construït un primer prototip que incorpora els elements per al control de temperatura, aeració, realització de mesures polarogràfiques (construït al laboratori del grup d'Instrumentació Electrònica i Biomèdica del Departament d'Enginyeria Electrònica de la UPC), amb diferents etapes s'ha anat incorporant la tecnologia òptica a mesura que s'anava avançant en el desenvolupament d'aquesta.

A la figura 8.2.7 es presenta el prototip, que encara treballava amb un espectrofotòmetre extern, i incorporava una font de llum situada sota el minibioreactor.

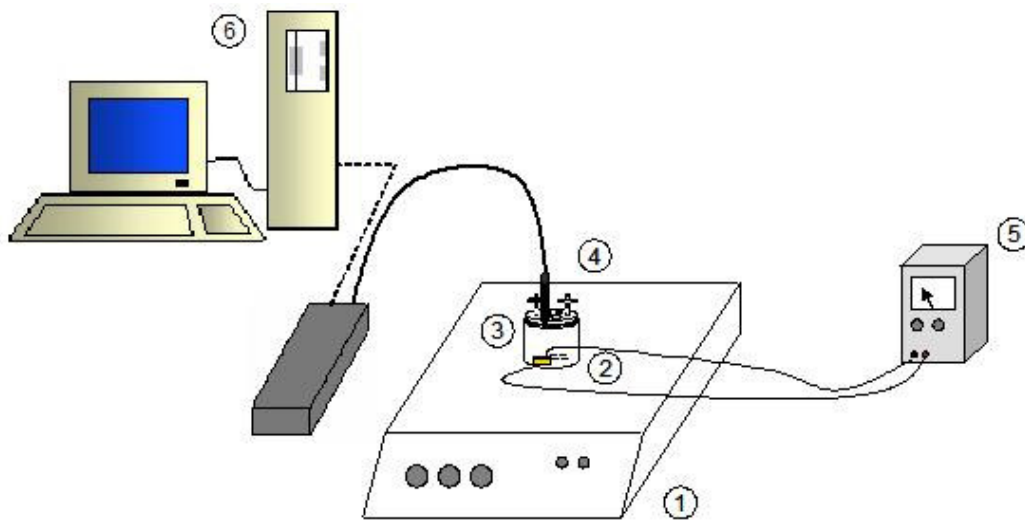


Figura 8.2.7. Esquema simplificat del muntatge emprat per avaluar els efectes de canvi del set-up òptic. Components: 1) Sistema de cultiu d'un únic minibioreactor, 2) Minibioreactor plàstic, 3) font de llum (Luxeon LXHL-BW03 warm-white LED) situat sota el minibioreactor, 4) Fibra òptica de recepció, amb un angle d'acceptació de 60°, 5) Font d'alimentació emprada per a la font de llum, i 6) PC per a l'adquisició de dades.

Una vegada establert el disseny del set-up òptic que permetia una funcionalitat adequada (desenvolupament realitzat a l'apartat 5.1.2), aquest s'ha integrat en el sistema de cultiu que incorporava la resta de tecnologies necessàries per al cultiu amb un únic minibioreactor. Referent al desenvolupament de la tecnologia de mesura polarogràfica d'oxigen, aquesta es presenta a l'apartat de materials i mètodes de sistemes de mesura. A les figures 8.2.8 i 8.2.9 es presenta el sistema de cultiu d'un únic minibioreactor desenvolupat (construït al laboratori del grup d'Instrumentació Electrònica i Biomèdica del Departament d'Enginyeria Electrònica de la UPC).

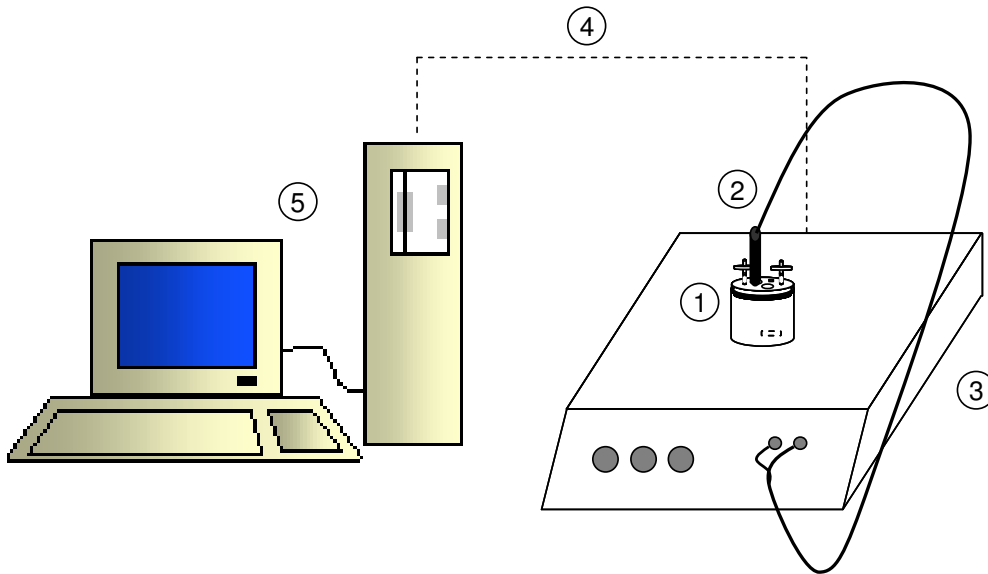


Figura 8.2.8. Esquema simplificat del prototip del sistema de cultiu d'un únic minibioreactor. 1) Minibioreactor plàstic, 2) Fibra òptica de recepció de llum amb un sensor de temperatura integrat, 3) Estació de treball que conté els elements de termostatació, ventil·lació (electrovàlvules), agitació, mesura i control de temperatura i sistemes de mesura espectrofotomètrics 4) connexió de dades del sistema d'un únic minibioreactor a l'ordinador de sobretaula via ethernet 5) Ordinador de sobretaula.

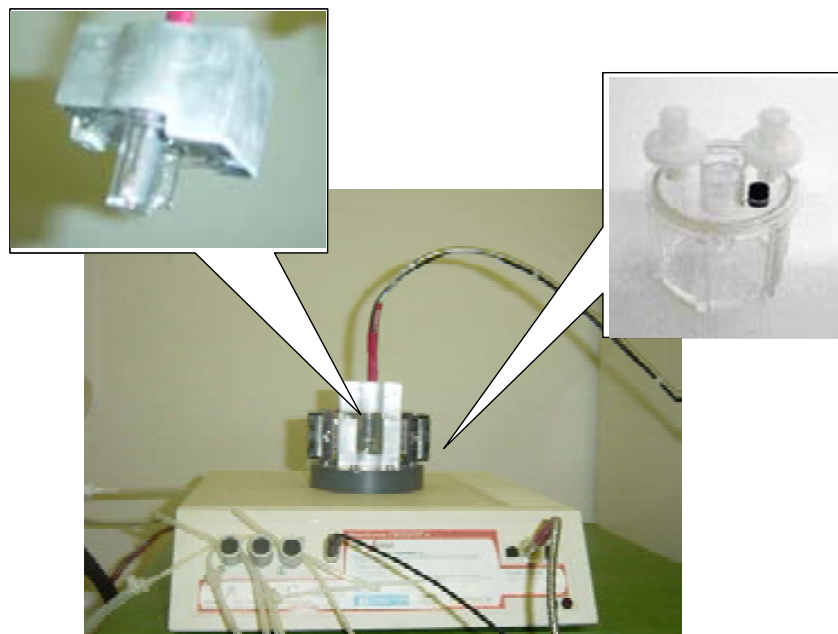


Figura 8.2.9. Fotografies amb diferents detalls de l'equip d'un únic minibioreactor: a l'esquerra, detall del port de la tapa del minibioreactor on es situa la fibra òptica, i la seva coberta de termostatació. A la dreta, minibioreactor plàstic que es situa dins la coberta de termostatació.

8.2.2.2. Sistemes de múltiples minibioreactors

8.2.2.2.1. Minibioreactors injectats en poliestirè cristall

Les plaques de plàstic inclouen 6 minibioreactors individuals, amb tots els elements dels minibioreactors individuals presentats anteriorment (figura 8.2.2). L'espai ubicat entre els minibioreactors està pensat per a ser omplert d'aigua, que serà homogeneïtzada amb un eix que entrarà a la placa per la part central, i permetrà una termostatació conjunta de tota la placa de minibioreactors.

La placa de plàstic està constituïda per tres blocs, injectats tots ells amb PS cristall. El primer dels blocs és una base que comprèn les bases dels sis minibioreactors, el segon, una tapa intermèdia que delimita el bany de termostatació, i el tercer, les tapes individuals de cadascun dels minibioreactors. A la figura 8.2.10 es mostren unes fotografies de les peces comunes de la placa de minibioreactors (base i tapa intermèdia).



Figura 8.2.10. Fotografies de les peces comunes de la placa de sis minibioreactors (base i tapa intermèdia).

8.2.2.2.2. Maquinari associat al sistema de cultiu de múltiples minibioreactors

El sistema de sis minibioreactors (construït al laboratori del grup d'Instrumentació Electrònica i Biomèdica del Departament d'Enginyeria Electrònica de la UPC) incorpora els elements per a permetre la termostatació de les plaques de plàstics, la seva aeració, la monitorització del creixement i metabolisme dels cultius. A la figura 8.2.11 se'n presenta una fotografia i seguidament se'n detallaran els principals elements.



Figura 8.2.11. Fotografia d'un prototip de sistema de cultiu de sis minibioreactors.

Els components principals del sistema són:

- Sistema mecànic per a posicionar la placa de minibioreactors plàstics, constant d'una carcassa inferior on es situa l'electrònica del sistema i el sistema de termostatació, i una carcassa superior per a permetre el tancament de la placa de minibioreactors en una atmosfera tancada, i que conte les connexions per a les entrades de gasos dels minibioreactors, que provenen de les electrovàlvules situades en el panell frontal (veure figura 8.2.11).
- Sistema de control de temperatura. La targeta de gestió de temperatura disposa de tres canals de mesura de temperatura per a sondes PT100, un driver per a la bomba de calor, i un canal d'actuació per a calentadors resistius externs (per a humidificadors externs/ sistemes reducció evaporació). El calor es transmet als minibioreactors mitjançant sistemes peltier que transmeten a una placa metàl·lica situada sota la placa de minibioreactors el calor que s'ha de subministrar o extreure.
- Actuadors per a transmetre als elements d'agitació dels minibioreactors un camp electromagnètic que provoqui el seu moviment. Hi ha un actuator per a cada minibioreactor individual, trobant-se situats per sota d'aquests, immediatament sota la placa metàl·lica que termostata els minibioreactors
- Targetes per a la mesura d'oxigen dissolt. En la primera versió dels prototips la mesura d'oxigen dissolt es realitzava de forma polarogràfica mitjançant una

placa d'acondicionament amb una capacitat de 6 canals. Té la funció de subministrar el voltatge requerit a les sondes, i rebre la intensitat elèctrica que aquestes detecten, que serà proporcional a la concentració d'oxigen dissolt.

- Espectrofotòmetre i set-up de mesura òptica. La xarxa de difracció per a la mesura espectrofotomètrica és la mateixa que incorporava l'espectrofotòmetre del sistema d'un únic minibioreactor, si bé en aquesta cas s'ha incorporat un concentrador de llum que passa de sis canals a un, per tal de necessitar únicament un espectrofotòmetre de mesura.
- Targeta controladora per a gestionar la connectivitat Ethernet, l'adquisició d'espectres, generació de senyals d'agitació, adquisició de les mesures d'oxigen dissolt i temperatura, i execució dels controls de temperatura PI1 y PI2.
- Targeta d'accionament. Conté els drivers per a l'agitació, les electrovàlvules i les fonts de llum.

Aquest primer prototip que s'acaba de presentar, ha sofert diversos redissenys per tal d'anar depurant i millorant diferents elements funcionals.

A nivell de sistemes de mesura, havent vist a l'apartat 5.2 la deriva en la senyal de la sonda d'oxigen causada pel posicionament semi-automàtic de les sondes polarogràfiques, l'ha substituït la placa d'acondicionament per a les sondes polarogràfiques per una altra que permeti realitzar mesures de fluorescència, seguint els desenvolupaments realitzats per Sarró (2009) i Hexascreen CT.

A nivell de sistemes auxiliars, havent vist a l'apartat 5.3 que era necessari disposar d'un sistema d'humidificació integrat a la carcassa, aquesta necessitat s'ha tingut en compte per al redisseny dels següents prototips.

A continuació (figura 8.2.12) es presenta el disseny del prototip incloent els sistemes de mesura d'oxigen per fluorescència i les actualitzacions de la carcassa realitzades.

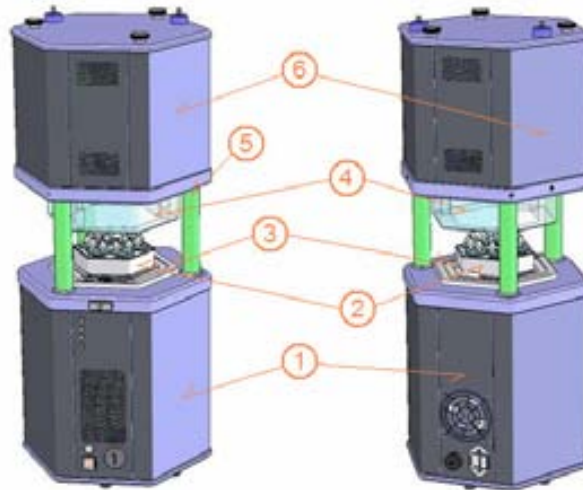


Figura 8.2.12. Representació esquemàtica del sistema de sis minibioreactors. Els diferents elements que l'integren (números 1-6), es detallen a continuació.

El sistema té forma de columna hexagonal, dividida en dues parts, caixa superior i inferior. La placa de minibioreactors s'ubica a la cavitat interior situada entre ambdues caixes, i una vegada s'ha realitzat el tancament del sistema, tots els filtres de gasos i sondes queden correctament posicionats als minibioreactors, a punt per la seva operació. A continuació s'expliquen els diferents elements del sistema, seguint la numeració indicada a la figura 8.2.12:

1. Caixa inferior. Conté les parts electròniques, el conjunt d'actuadors i suporta la resta del sistema.
2. Placa de minibioreactors.
3. Placa d'actuadors. Comprèn els actuadors de termostatació, els camps magnètics d'agitació i excitació lluminosa per a la realització de les mesures òptiques.
4. Placa intermèdia transparent. Manté la placa de minibioreactors tèrmicament aïllada de l'exterior, permetent una inspecció visual i implementa el sistema de connexió segura de gasos.
5. Columna de guiat. Permet efectuar la obertura i tancament del sistema de forma guiada, fent passar pel seu interior el cablejat de les sondes.
6. Caixa superior. Aquesta comprèn les electrovàlvules i el circuit de gasos, amb elements per realitzar-ne una humidificació i aïllament respecte l'exterior per tal d'evitar fenòmens de condensació.

El tancament/obertura del sistema és una operació en tres passos (per a una millor comprensió de l'explicació següent, veure la figura 8.2.13):

- 1er.** Situar la placa de minibioreactors correctament al seu allotjament.

2on. Tancar la primera etapa de la caixa superior. En aquesta situació els minibioreactors estan correctament connectats als filtres d'aeració i les sondes estan completament posicionades, però encara es pot visualitzar el contingut dels minibioreactors. Cal tenir en compte que en aquesta posició, hi poden haver interferències en les mesures òptiques.

3er. Tancar la segona etapa de la caixa superior. Ja no hi ha la possibilitat de visualitzar l'interior dels minibioreactors. Aquesta és la posició normal durant la realització dels cultius.



Figura 8.2.13. Esquema de l'operació de tancament del sistema.

8.3. Sistemes de mesura

8.3.1. Instrumentació analítica associada als minibioreactors

8.3.1.1. Sondes per a la mesura d'oxigen dissolt

8.3.1.1.1. Sonda polarogràfica

Per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt en el medi, s'utilitzen la sonda polarogràfica, desenvolupada juntament amb la unitat de Química Analítica del Departament de Química.

A continuació es detalla el protocol de construcció de les minisondes polarogràfiques d'oxigen que s'han desenvolupat per a aquest treball. Per a una millor visualització dels passos que s'expliquen seguidament, es presenta la figura 8.3.1.

1er pas: Preparació dels elèctrodes de platí i plata.

- A partir d'un fil de platí de 1 mm de diàmetre (GoodFellow, n° cat. PT005155) es realitzen talls de 2 mm de longitud i s'obtenen cilindres (1 mm de diàmetre × 2 mm d'alçada).
- A partir d'un tub de plata de 3,5 mm de diàmetre extern i 3,04 mm de diàmetre intern (paret de 0,23mm) (GoodFellow, n° cat. AG007230) es realitzen talls de 2 mm de longitud i s'obtenen anells, a cadascun dels quals es realitza un forat de 0,5 mm travessant la paret de l'anell per a futures soldadures.

2on pas: Soldadura dels elèctrodes amb els cables elèctrics.

- Per fer les soldadures s'utilitza una reïna d'epoxy conductora.
- Un cop fetes les soldadures es deixen curar durant 24 hores a 60°C per tal que s'endureixi la reïna.

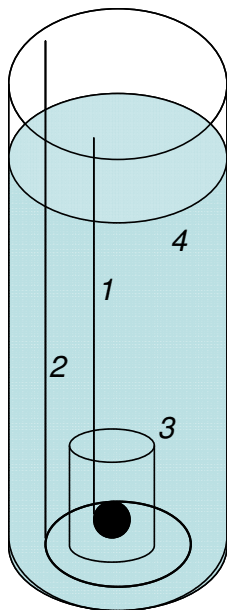
3er pas: Recobriment de l'elèctrode de platí amb epoxy no conductor.

- Com a suport per fer el recobriment de l'elèctrode de platí s'utilitza un tub FIA d'uns 2,4 mm de diàmetre intern i 1,0-1,5 cm de longitud. Aquest s'omple mitjançant una xeringa d'epoxy no conductor. Tot seguit s'introdueix l'elèctrode de platí ja soldat amb el corresponent cable elèctric el més centrat possible. L'epoxy es deixa curar durant 24h a temperatura ambient.
- Un cop curat l'epoxy es realitzen talls longitudinals al tub de FIA per a poder retirar-lo.

4rt pas: Ensamblatge final dels elèctrodes de platí i plata en el seu cos de PVC o niló.

- Com a cos per fer la minisonda de pO₂ s'utilitza un tub de niló o de PVC de 6 cm de longitud, 6 mm de diàmetre extern i 3,7 mm diàmetre intern. Aquest es construeix a partir d'una barra de niló del mateix diàmetre extern al que es realitza un forat de 3,7 mm al llarg del seu eix.
- Es diposita l'anell de plata sobre la reïna d'epoxy de manera que quedi ben sucata tan per la part interna com l'externa. Ràpidament, per evitar que s'assequi l'epoxy, es col·loca l'elèctrode platí a la part central de l'anell de plata tot passant primer els dos cables elèctrics.

- S'omple de reïna d'epoxy el cos de PVC o niló utilitzant una xeringa i ràpidament es posa el conjunt plata-platí a l'extrem del tub.
- S'acaba d'omplir el tub de reïna d'epoxy, i es reomplen les pèrdues al introduir els elèctrodes.
- Netejar les restes d'epoxy que s'hagin pogut quedar sobre els cables amb cura de no moure els elèctrodes en la manipulació.
- Es deixa curar la reïna d'epoxy unes 24 h a temperatura ambient.



1. Cilindre de Pt soldat a un fil de coure mitjançant una reïna epoxy conductora.
2. Anell de Ag soldat a un fil de coure mitjançant una reïna epoxy conductora.
3. L'espai entre el cilindre de Pt i l'anell de Ag es recobreix de epoxy en una primera etapa.
4. En una segona etapa l'interior del cos de la sonda s'omple amb epoxy aïllant.

Figura 8.3.1. Detall elements que componen la sonda polarogràfica i que s'han ensamblat en el muntatge descrits dels passos 1 a 4.

5è pas: Poliment de la minisonda i elèctrodes.

- Es realitzen diferents passos de polit a l'extrem de la sonda on hi ha els elèctrodes de platí i plata a fi d'eliminar les restes d'epoxy que sobreïxin per sobre el nivell dels elèctrodes i per que ambdós elèctrodes tinguin una superfície llisa i neta d'impureses exposada.
- Pels diferents passos de poliment s'utilitzarà paper d'aigua de gra 360, 600 i 800 en aquest ordre. Primer de tot es mulla lleugerament el paper d'aigua i tot seguit es poleix la sonda fent cercles suaus.
- Un cop llimat amb el paper d'aigua s'acaba de polir la sonda amb paper d'alúmina de la casa ORION fins que es vegin els dos elèctrodes ben brillants.

6è pas: Eliminació d'impureses amb ultrasons

- Per eliminar impureses deguts al procediment de poliment es fan dos passos de neteja amb ultrasons. Primer s'omple un vas de precipitats amb aigua i sabó i es submergeix la punta de la sonda. El vas es posa aproximadament un minut als ultrasons. Tot seguit es neteja la punta de la sonda amb aigua destil·lada i es submergeix en un vas de precipitats amb aigua destil·lada. El vas es posa aproximadament un minut als ultrasons.

7è pas: Reducció de l'elèctrode de plata

- Per la reducció de l'elèctrode de plata s'aplica un corrent de 0,05 mA durant un mínim de 30 minuts.
- Primer es prepara el cablejat i els instruments necessaris. Es necessiten un elèctrode de platí, un clip d'oficina que es doblegarà en forma d'espiral i la minisonda d'oxigen. També es necessiten un pont salí, i solucions de NaNO_3 0,1M i NaCl 0,1M.
- L'elèctrode de platí es connecta al jack senyalat amb una "R" (referència) a sobre. El cable de la minisonda d'oxigen corresponent a l'elèctrode de plata es connecta al jack amb una "W" (working). Els dos elèctrodes es submergeixen a la banda del vas doble on hi ha la solució NaCl 0,1M on també s'hi posa una mosca per assegurar que la solució estigui ben homogènia.
- El clip doblegat en forma d'espiral es connecta mitjançant un cocodrill amb un cable i va connectat al que surt de darrera el jack rotulada amb la lletra "A". El clip es submergeix a la banda del vas doble on hi ha la solució NaNO_3 0,1M.
- Per realitzar l'operació de reducció de l'elèctrode de plata s'utilitza el programa GPES manager, aplicant un amperatge de 0,05 mA i que el temps són 1800 segons (30 min).

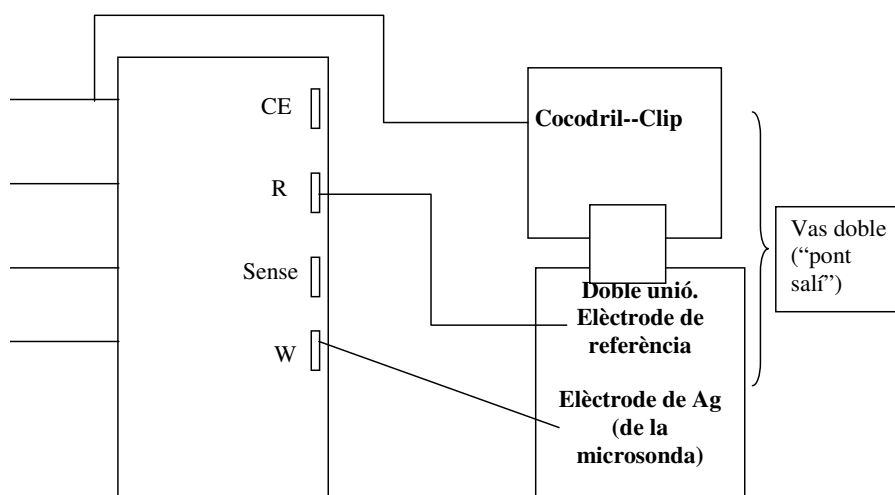


Figura 8.3.2. Muntatge per a la reducció de l'elèctrode de plata.

A continuació es presenten les diferents versions dels prototips de sonda construïts (figures 8.3.3 i 8.3.4). El primer d'ells (figura 8.3.3) té un diàmetre extern de 6 mm, i s'acoba al port corresponent del minibioreactor mitjançant una junta tòrica. El segon d'ells (figura 8.3.4) ha estat realitzat en símil d'ABS per tècniques de *rapid prototyping* per tal de millorar l'encaix amb els minibioreactors plàstics i reduir els volums morts entre l'electrolit.



Figura 8.3.3. Prototip de sonda polarogràfica basat en un cilindre de 6 mm de diàmetre extern.



Figura 8.3.4. Prototip de sonda polarogràfica realitzat mitjançant tècniques de rapid prototyping.

8.3.1.1.2. Sonda de fluorescència

La tecnologia emprada per a la mesura de l'oxigen dissolt per fluorescència consta, per una part, de membranes amb el fluoròfor immobilitzat i, per altra part, per tecnologia òptica i electrònica. Les membranes amb el fluoròfor immobilitzat emprades han estat de Ocean Optics (FOXY GF), i la tecnologia ha estat desenvolupada en el marc de la tesi doctoral de Enric Sarró (2009), i amb desenvolupaments realitzats al Grup d'Instrumentació Electrònica i Biomèdica del Departament d'Enginyeria Electrònica de la Universitat Politècnica de Catalunya.

Les membranes del fluoròfor immobilitzat han estat adherides a les tapes dels minibioreactors mitjançant una silicona (Dow Corning, Sylgard 184), quedant situades tal com es mostra a la figura 8.3.5.

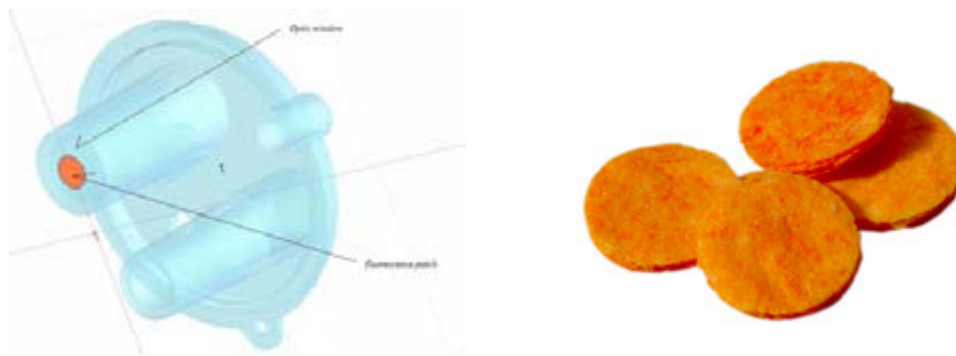


Figura 8.3.5. A l'esquerra, representació esquemàtica de la localització de les membranes amb el fluoròfor immobilitzat sobre una tapa de minibioreactor. A la dreta, membranes FOXY-GF de Ocean Optics amb el fluoròfor immobilitzat.

8.3.1.2. Sistemes de mesura òptica de l'absorbància

8.3.1.2.1. Sonda òptica per a la mesura de l'absorbància en el sistema d'un únic minibioreactor

Aquest element, desenvolupat per Andreu Fontova del departament d'Enginyeria Electrònica de la UPC, permet captar la mesura d'absorbància del medi de cultiu, gràcies a una fibra òptica de silici amb 300 μm de diàmetre. El sensor està fabricat en plàstic i té un diàmetre de 10 mm que encaixa amb el port òptic de la tapa del minibioreactor.

8.3.1.2.2. Microespectrofotòmetre

El microespectrofotòmetre, model STEAG microParts (veure figura 8.3.6), és un instrument que permet captar la llum tant en el rang visible de l'espectre com en l'ultraviolat amb un interval de longituds d'ona que oscil·la entre 220 i 920 nm. El seu funcionament es basa en un disseny sense parts mòbils anomenat hollow cavity waveguide (veure esquema figura 8.3.7): la llum penetra a través d'una fibra òptica de 300/330 μm i es difracta per ser detectada gràcies a un fotodiode. Aquest disseny permet una òptima estabilitat òptica i tèrmica.



Figura 8.3.6. Microespectrofotòmetre

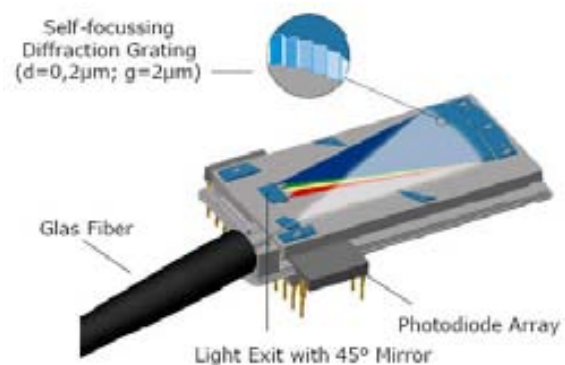


Figura 8.3.7. Esquema del funcionament del microespectrofotòmetre

8.3.1.2.3. Sistema de concentració de llum per a la mesura en múltiples minibioreactors

El sistema de múltiples minibioreactors contempla un element addicional a les fibres òptiques i el microespectrofotòmetre: un set-up òptic per a concentrar la llum provinent de les fibres corresponent a cadascun dels minibioreactors a una única fibra que condueixi la llum fins al microespectrofotòmetre. Aquest element ha estat desenvolupat per Hexascreen CT, i a la figura 8.3.8 se'n mostra una representació esquemàtica.

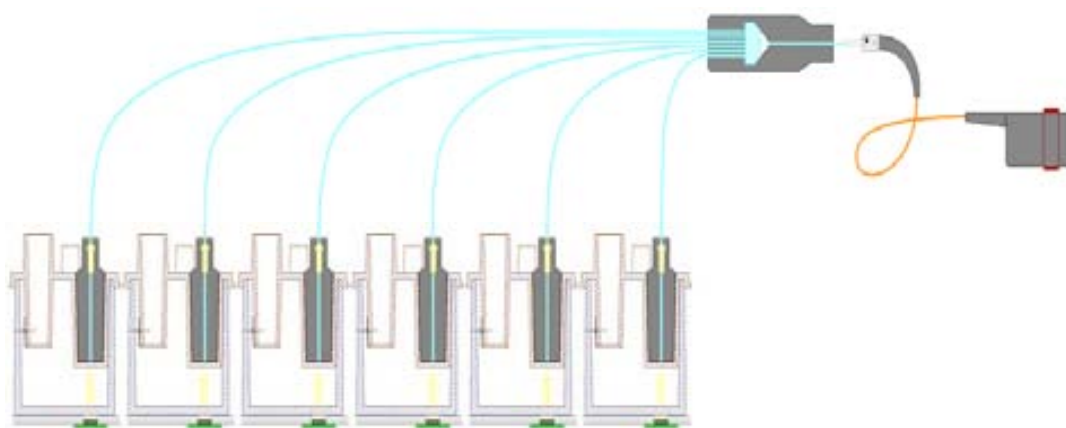


Figura 8.3.8. Set-up òptic per a sis canals de mesura. A la part inferior esquerra es poden observar sis fibres situades de forma individual a cadascun dels minibioreactors. La llum captada per aquestes fibres, després de passar per un concentrador de llum que passa de sis canals a un canal, finalitza en una única fibra que es connecta a l'espectrofotòmetre situat a l'interior de l'equip (part dreta del dibuix esquemàtic).

8.3.2. Instrumentació analítica no associada als minibioreactors

8.3.2.1. Sondes per a la mesura de temperatura, pH i oxigen dissolt

Les sondes d'oxigen emprades en els estadis de validació de les estratègies de seguiment seleccionades (capítol 4) i com a control en el desenvolupament de sistemes de mesura propis (capítol 5) han estat sondes Ingold 12 mm (Mettler Toledo, Greifensee, Suïssa) (Ref. 3-532-58).

Les sondes de pH emprades els estadis de validació de les estratègies de seguiment seleccionades (capítol 4) han estat sondes Polyclave 200 (Hamilton, Bonaduz, Suïssa). Per al seguiment de temperatura, les sondes emprades han estat del tipus PT-100.

8.3.2.2. Equips per a l'anàlisi de glucosa i glutamina

Per als anàlisis puntuals de glucosa i glutamina que ha calgut realitzar per a comprovar el possible exhauriment d'aquests nutrients en determinats cultius, s'han utilitzat analitzadors automàtics de Yellow Spring Instruments (Yellow Springs, USA), que disposessin de les membranes enzimàtiques per a la detecció d'aquests nutrients.

8.4. Equipament auxiliar

8.4.1. Sistemes d'agitació

8.4.1.1. Agitadors

En el capítol de validació de les estratègies de seguiment seleccionades (capítol 4), juntament amb els minibioreactors mecanitzats (figura 8.2.1) s'ha emprat un sistema d'agitació extern. Aquest sistema ha estat el VARIOMAG[®] Telesystem 06.20 (H+P Labortechnik), un equip dissenyat per a situar-se a l'interior d'incubadors, ja que disposa de dues parts:

- I. Placa multipunt de fins a 6 ubicacions d'agitació: on es troben les bobines magnètiques que permeten el gir, amb velocitats que varien de 100 a 1400 rpm.
- II. Comandament a distància (Telemodul 20C): permet controlar amb exactitud la velocitat d'agitació, sense tenir contacte directe amb la placa d'agitació i provocar perturbacions en les condicions de cultiu.

Adicionalment, cal tenir en compte que per als casos de cèl·lules animals, permet reduir la potència d'agitació de 20 fins a 5 W i això minimitza el possible augment de temperatura que aporti al cultiu. Es troba conformat per dues subunitats:

8.4.1.2. Varetas imantades

Tant al capítol de validació de les estratègies de seguiment seleccionades (capítol 4), com a l'apartat de desenvolupament d'un sistema d'agitació personalitzat (apartat 5.3.1), s'han emprat diferents models de varetas imantades, que es presenten a la taula 8.4.1.

Descripció	Referència	Dimensions: longitud i diàmetre (mm)
Prisma Triangular	AZLON, SWN532	12 x 6
Creu	COLE PARMER, CZ-04765-10	10 x 3
Cilindre amb anella	BIOBLOCK, N1501S	13 x 3
Cilindre	COLE PARMER, CZ-08546-00	10 x 10

Taula 8.4.1. Descripció i dimensions de les varetas imantades emprades

A la figura 8.4.1 es presenta una fotografia amb les varetes magnètiques emprades.



Figura 8.4.1. Detall de les varetes magnètiques emprades. D'esquerra a dreta: prisma triangular, creu, cilindre amb anella i cilindre

En el cas dels experiments amb les varetes imantades situades en un eix central (presentat en el capítol de Desenvolupament dels sistemes de mesura, figura 5.3.3), s'ha emprat imants de Neodimi perforats (Ima, Mollet del Vallès), amb geometries cilíndrica i en forma de prisma que, donada la toxicitat del Neodimi, han estat recobertes amb poliamida (Rilsan, Arkema Química, Barcelona), mitjançant mètodes de deposició electromagnètica realitzats a Gewosint (Barcelona).

8.4.1.3. Pèndols

Els pèndols emprats com a sistema d'agitació sense punts de cisalla, consten d'un disseny (veure figura 8.4.2) que contempla un extrem en forma de fletxa, per a poder encaixar en un orifici de la tapa superior dels minibioreactors, i una cavitat a l'altre extrem, on s'ha d'encaixar un imant de neodimi en forma de disc (Ima, Mollet del Vallès), que una vegada posicionat es segellarà emprant una silicona Wacker E43 (Wacker Neuson, Torrejón de Ardoz).

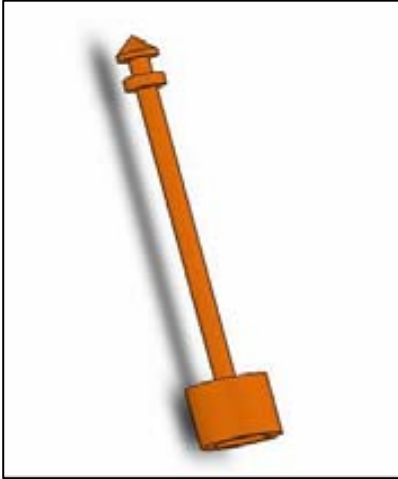


Figura 8.4.2. Esquerra: disseny del pèndol flexible amb una cavitat (a la part inferior) on posicionar i segellar un imant. Dreta: detall de la tapa d'un minibioreactor que incorpora encaixat a un forat situat al seu punt central un pèndol de silicona flexible amb un imant a la seva part inferior.

8.4.2. Elements d'aeració

8.4.2.1. Rotàmetres

Per a la regulació del cabal de gasos durant l'experimentació amb sistemes d'un únic minibioreactor s'ha emprat un rotàmetre multicanal de Fisher Scientific (suport A73576, amb vàlvules de regulació A73190), que tenen la possibilitat de regular fins a tres gasos en paral·lel. Això permet utilitzar en un mateix cultiu aire-5% CO₂, nitrogen, i CO₂ pur.



Figura 8.4.3. Rotàmetre multicanal

8.4.2.2. Electrovàlvules

Les electrovàlvules emprades en els prototips de les etapes inicials de desenvolupament han estat electrovàlvules de 3 vies (D344V57-Z530A Sirai) utilitzades per obrir/tancar el pas d'aire-5% CO₂, i també de nitrogen en els casos en què s'ha realitzat seguiments d'OUR.

El cos de la vàlvula i la junta d'estanquitat, estan fabricats en elastòmer fluorocarbònic (FPM) i en polieterimida (PEI) respectivament. Poden treballar a temperatures i pressions de fins a 100°C i 1,5 bars respectivament. El coeficient Kv per aquesta electrovàlvula és de 0,28. La bobina treballa amb un voltatge estàndard de 12 V a corrent continu i consumeix 6 W.

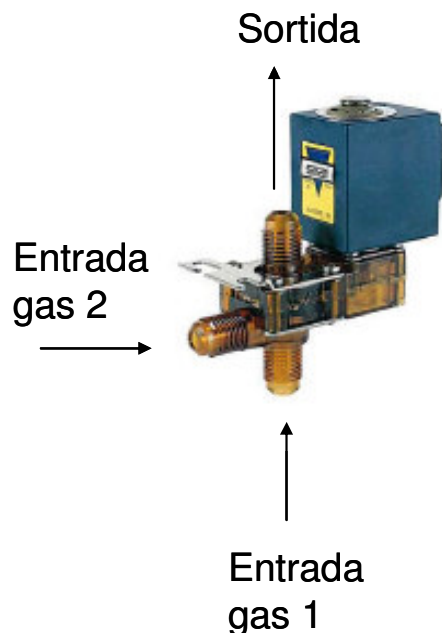


Figura 8.4.4. Electrovàlvula de 3 vies.

8.4.3. Fonts alimentació

Ffreak M10-330A-03. Font d'alimentació que disposa d'un voltatge de 13,8 V i una intensitat de 3 A (en total pot suportar fins a 40 W). Dóna servei als commutadors (relés) que alimenten a les electrovàlvules Sirai.

ATAIO 152A. Font d'alimentació regulable que disposa d'un rang de voltatge de 0-15 V i d'un rang d'intensitat de 0-2 A. Dóna servei a les targetes d'adquisició de dades que ho necessitin o a elements de mesura com el microespectrofotòmetre.

GRELCO GSD305. Font d'alimentació regulable de dos canals, amb un rang de voltatge de 0-30 V i un rang d'intensitat 0-5 A. Dóna servei als prototips de sistemes de múltiples minibioreactors.

8.4.4. Sistemes d'humidificació

En el capítol de validació de les estratègies de seguiment seleccionades (capítol 4), juntament amb els minibioreactors mecanitzats (figura 8.2.1) s'ha emprat un sistema d'humidificadors format per una ampolla Pirex de 1000 mL amb un difusor porós (Alco, PSL613609) i dos humidificadors de gasos Alco, situats en sèrie a l'interior de l'incubador. Assegura que l'aire que entra en al minibioreactor es troba saturat d'aigua, no causa l'evaporació del medi i no varia els resultats d'OUR. Per a una millor visualització, veure figura 8.4.5.

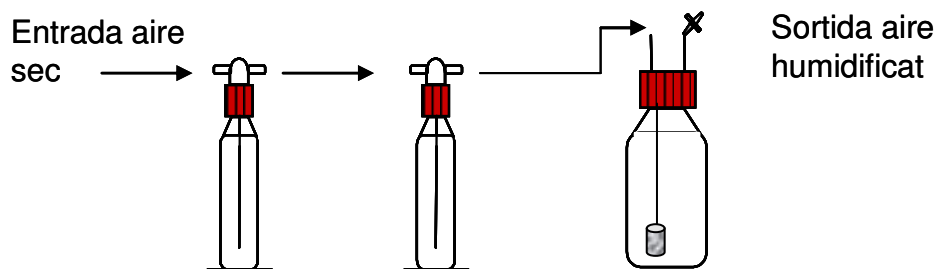


Figura 8.4.5. Sistema d'humidificadors en incubador. Consta de dos humidificadors de gasos Alco, i d'una ampolla de Pirex de 1000 mL amb un difusor porós.

Durant el treball amb els prototips d'un únic minibioreactor, s'ha emprat com a humidificador una ampolla de Pirex amb difusor porós (ALCO, PSL613609), termostatada emprant un bany termostàtic, i amb la conducció fins les electrovàlvules aïllada amb un tub de neoprè Camelback.

Per al treball amb els sistemes de múltiples minibioreactors, d'entrada s'ha emprat novament com a humidificadors ampolles de Pirex amb difusor porós (ALCO, PSL613609), termostatades emprant un bany termostàtic, i amb la conducció fins les electrovàlvules aïllada amb tub de neoprè Camelback. Quan amb el sistema emprat en l'experiment anterior s'ha fixat temperatures de l'humidificador superiors a 30°C, han aparegut condensacions degudes a la diferència de temperatura entre el gas que circula per l'interior de la conducció que va des de l'humidificador fins als minibioreactors i

l'ambient que han acabat obturant els filtres d'entrada als minibioreactors. Per a resoldre aquest problema, novament s'han realitzat modificacions al sistema experimental de manera que els humidificadors fossin inclosos en una coberta situada directament sobre del sistema de minibioreactors, i evitant l'existència de punts freds en el circuit entre l'humidificador i els minibioreactors. A la figura 8.4.6 es presenten les modificacions realitzades: bàsicament s'ha inclòs una carcassa, a l'interior de la qual es situava l'ampolla d'humidificació (en aquest cas un cilindre de llautó amb 80 mL d'aigua destil·lada, i novament un difusor porós (ALCO, PSL613609). La carcassa també incorporava un ventil·lador que seguint una estratègia *on-off*, mantenia la temperatura de l'interior en funció de la consigna efectuada.

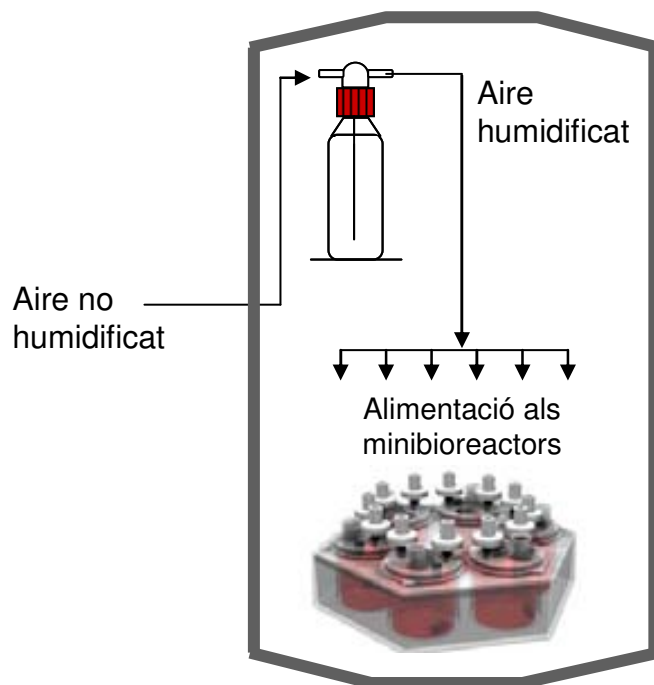


Figura 8.4.6. Esquema del muntatge del sistema de cultiu incorporant la humidificació dins la carcassa que cobreix tot el sistema.

8.4.5. Equipament per a la gestió de la instrumentació i l'adquisició de dades

8.4.5.1. Ordinador de gestió

L'ordinador de gestió té la funció de controlar, monitorar i supervisar les diferents comunicacions amb els aparells emprats, així com la recepció de senyals de mesura, i activació de protocols de cultiu. L'entorn dels programes de calibració i de control utilitzat és el Labview 7.0. Les especificacions tècniques de l'ordinador són:

- PC Pentium® 4
- CPU 2.80 GHz
- 512 Mb RAM
- Microsoft Windows XP Professional SP1

8.4.5.2. Targeta Advantech PCL-812-PG

La targeta Advantech PCL-812-PG és una targeta d'adquisició de dades multifuncional d'alta resolució i velocitat, que serveix per comunicar ordinadors compatibles amb IBM PC/XT/AT i els diferents aparells. S'ha utilitzat per a l'adquisició de dades dels prototips que encara no incorporaven el hardware intern per gestionar l'enviament i recepció de dades via ethernet. Les especificacions tècniques són:

- La velocitat de mostreig màxima del convertor A/D és de 30 KHz.
- 16 entrades analògiques amb convertor A/D per aproximacions successives de 12 bits.
- 2 sortides analògiques amb convertor D/A de 12 bits.
- 16 entrades i 16 sortides digitals, compatibles TTL/DTL.

8.4.5.3. Targeta O₂ probe

La targeta O₂ Probe (figura 8.4.7), desenvolupada al Grup d'Instrumentació electrònica i Biomèdica al Departament d'Enginyeria Electrònica de la UPC, serveix per establir les connexions entre els connectors d'entrada analògica de la targeta d'Advantech PCL-812-PG, amb sondes d'oxigen diferents fins a un total de 6. Aquesta necessita la tensió d'una font de 6 volts per aplicar un potencial a l'elèctrode de platí i per convertir i amplificar la intensitat de senyal mesurada a un rang de 0 a 2,5 V.



Figura 8.4.7. Targeta d'adquisició O₂ probe.

8.5. Programari

El programari emprat per a l'operació amb els sistemes de minibioreactors desenvolupats ha estat programat en entorn LabVIEW.

LabVIEW és una eina gràfica de test, control i disseny mitjançant la programació. El llenguatge de programació emprat per LabVIEW s'anomena llenguatge G. Aquesta eina va ser creada per National Instruments l'any 1976. LabVIEW és emprat principalment per enginyers i científics per a tasques com:

- Adquisició de dades.
- Control d'equips.
- Automatització industrial.

La seva principal característica és la facilitat d'ús del seu entorn gràfic, en principi, persones amb pocs coneixements en programació poden desenvolupar programes relativament complexos, més complicats de portar a terme amb llenguatges tradicionals com el C. Això es deu al fet que, en LabVIEW, “els programes no s'escriuen, sinó que es dibuixen”, és a dir, no s'han de introduir complexos línies de codi, sinó que els elements de programació es connecten de forma gràfica i intuïtiva. Entre d'altres avantatges significatius, presenta facilitats per a l'ús d'interfícies de comunicació com ports sèrie o paral·lel i té capacitat per interaccionar amb d'altres aplicacions com Matlab o Simulink.

Un programa en LabVIEW es divideix en:

- Panell Frontal: és l'interfície amb l'usuari, amb el qual es defineixen els controls i els indicadors que es mostraran a l'usuari del programa.
- El Diagrama de Blocs: és el programa pròpiament dit, on es defineix la seva funcionalitat, aquí es col·loquen les icones amb una determinada funció i s'enllacen.

El desavantatge principal és que les aplicacions realitzades amb aquest entorn són complicades de mantenir, sobretot si es tracta d'aplicacions grans.

Després de valorar els avantatges i desavantatges de cadascun dels entorns de programació, es va optar pel LabVIEW com a eina més indicada per desenvolupar les aplicacions necessàries.

A continuació (figures 8.5.1 i 8.5.2) es presenta un esquema de l'aplicació de cultiu en sistema de sis minibioreactors, que contempla la integració de les diferents tecnologies desenvolupades.

A la figura 8.5.1 es mostra l'aplicatiu fins que s'ha completat el calibratge de les sondes. Aquest consta d'una etapa inicial on s'escalfa el contingut dels minibioreactors fins que la temperatura d'aquests assoleix la temperatura de consigna. Durant aquest període es realitza una aeració seqüencial dels minibioreactors amb aire-5% CO₂ per tal que quan es superi aquest període d'atemperament, la realització del 100% de les sondes d'oxigen dissolt sigui un procés ràpid.

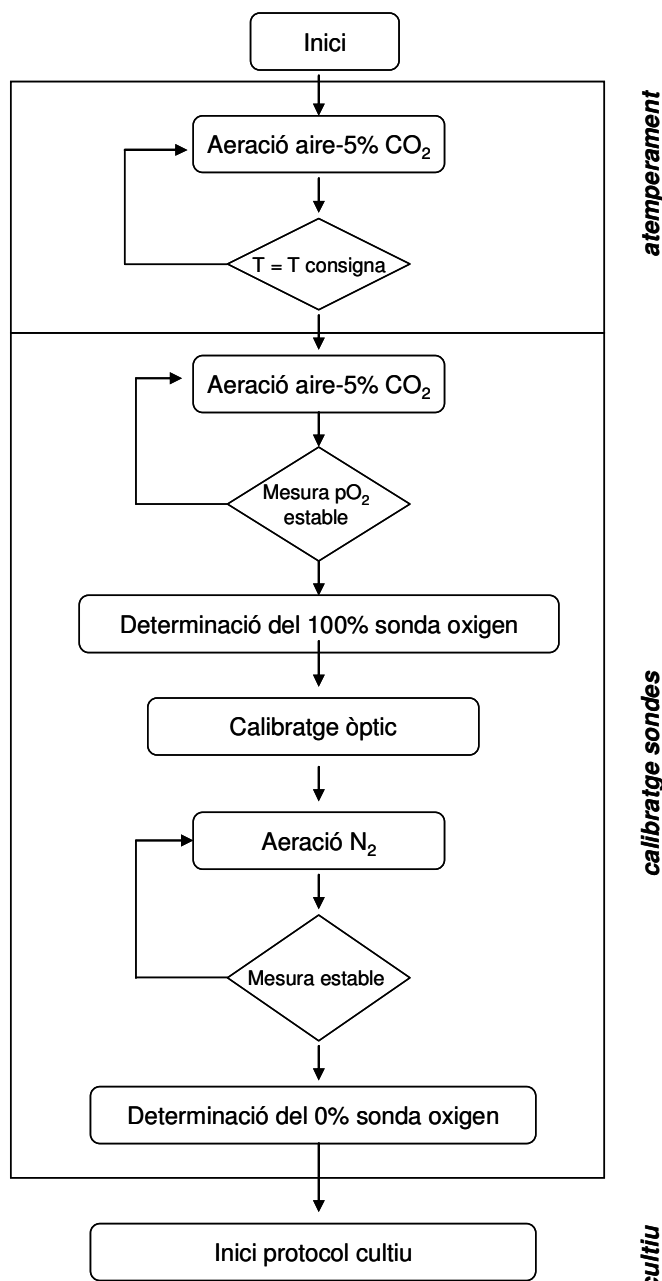


Figura 8.5.1. Esquema de l'aplicatiu de cultiu. Atemperament i calibratge de les sondes.

Una vegada superada l'etapa d'atempament, quan les mesures d'oxigen dissolt s'estabilitzen s'adquireixen els valors de 100% dels calibratges i a continuació es realitza el calibratge òptic, adquirint la mesura de blanc a partir de la qual es calcularan les absorbàncies que es mesuraran posteriorment, i que serviran tant per al pH com per a la mesura de concentració cel·lular. A continuació s'inicia el pas d'un corrent de nitrogen fins que s'assoleixi una mesura estable de les sondes, moment en el qual s'adquiriran les senyals corresponent al 0% d'oxigen dissolt. Seguidament s'iniciaran els processos relatius al seguiment dels cultius.

A la figura 8.5.2 es mostra el diagrama de l'aplicatiu una vegada s'han superat les etapes d'atempament i calibratge de les sondes.

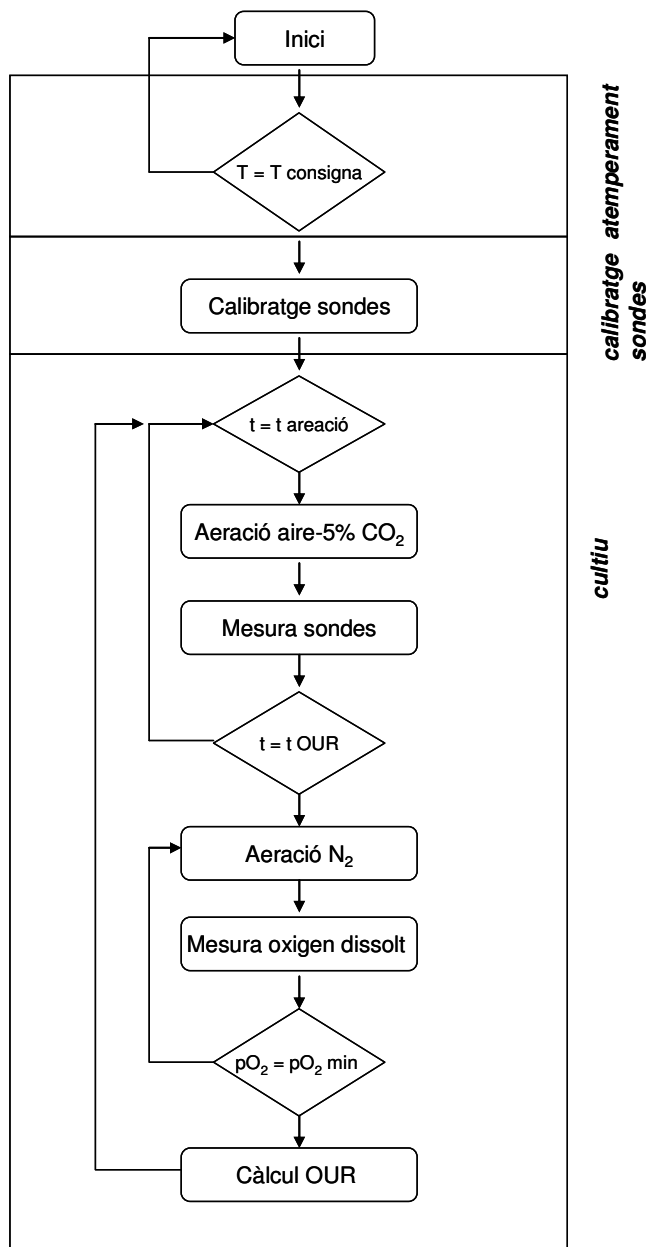


Figura 8.5.2. Esquema de l'aplicatiu de cultiu. Protocol de cultiu.

El protocol de cultiu consisteix en aplicar cicles d'aeració amb aire-5% CO₂ cada determinats períodes, realitzant mesures de oxigen dissolt, pH, i concentració cel·lular cada vegada que es supera un cicle d'aeració. En el cas que es desitgi realitzar mesures de consum d'oxigen (OUR), cada determinats períodes de temps (8-12 h) es realitzen caigudes d'oxigen dissolt fins un valor mínim d'oxigen dissolt (habitualment del 30%), i a continuació, es calculen els valors de OUR, que seran funció de la velocitat de la caiguda d'oxigen.

8.6. Protocols i càlculs

8.6.1. Càlcul OUR

Prèviament a la mesura de OUR, amb el minibioreactor amb el mateix volum de medi, temperatura, i agitació que tindran durant l'execució dels cultius, es realitza una mesura del coeficient de desorció.

Per a fer aquesta mesura, partint d'una concentració d'oxigen major del 70%, s'inicia el pas d'un cabal de nitrogen per capçal del minibioreactor, de manera que hi haurà una corba de caiguda de la concentració d'oxigen dissolt que es pot descriure a partir del balanç de matèria (Eq. 5.3.1):

$$A = (E-S) + G \quad \text{Eq. 5.3.1}$$

Al no haver-hi consum, el terme de generació no s'aplica i l'equació es pot expressar de la següent manera:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = K_L a ([O_2^*] - [O_2]) \quad \text{Eq. 5.3.2}$$

on:

K_La és el coeficient de transferència d'oxigen dissolt (h⁻¹)

[O₂]* és la concentració d'oxigen en equilibri amb l'atmosfera del capçal del minibioreactor (mmol/L).

[O₂] és la concentració d'oxigen en el medi del minibioreactor (mmol/L)

En aquest cas *[O₂*]*, la concentració d'equilibri amb l'atmosfera del capçal serà zero, degut a la circulació d'un cabal de nitrogen. En aquest cas, ens referirem al paràmetre *K_La* com a coeficient de desorció (*K_{des}*), ja que les corbes a modelitzar són de caiguda de

concentració d'oxigen dissolt. Tenint en compte aquestes consideracions, l'expressió quedarà de la següent manera:

$$\frac{d[O_2]}{[O_2]} = K_{des} dt \quad \text{Eq. 5.3.7}$$

Que integrada, serà:

$$\ln [O_2] = \ln [O_2](t_0) - K_{des} t \quad \text{Eq. 5.3.8}$$

Per a calcular K_{des} es realitza una regressió lineal de les dades d'oxigen dissolt expressades en forma de logaritme neperià, enfront del temps, essent K_{des} el pendent de la recta obtinguda.

Una vegada calculada K_{des} , durant la realització del cultiu ja es podran realitzar mesures de OUR, ja que al conèixer K_{des} es coneixeran tots els paràmetres de l'equació de càlcul (5.3.6), excepte OUR.

$$OUR = 0.00194 \times \left[\frac{[O_2](t_0) - [O_2](t_f)}{t_f - t_0} + \frac{\int_{t_0}^{t_f} (-K_{des} \times [O_2](t)) dt}{t_f - t_0} \right] \quad \text{Eq 5.3.6}$$

On:

$[O_2]$ és la concentració d'oxigen en el bioreactor [%]

t el temps [s] (els subíndex $0, f$ es refereixen a temps inicial i final de càlcul de la OUR [mmols O_2 /(L·h)])

0.00194 és la constant que serveix per passar d'unitats de saturació d'aire a mmols/L,

K_{des} [h^{-1}] és el coeficient que caracteritza la desorció de l'oxigen en el medi

Per a la mesura de la OUR durant el cultiu, en el moment que es desitgi realitzar, s'obre el pas a un corrent de nitrogen a un cabal constant (el mateix utilitzat per al càlcul de K_{des}), que seguirà fins que la concentració d'oxigen al bioreactor baixi fins a una concentració d'oxigen dissolt del 30%. En aquest punt es reactiva l'aeració per retornar a les condicions de cultiu.

8.6.2. Metodologia de càlcul del pH i concentració cel·lular a partir de mesures espectrofotomètriques

La metodologia es basa en obtenir mesures en regions de l'espectre on no hi hagi influència de l'indicador de pH per a obtenir la concentració cel·lular, i una vegada coneguda aquesta, realitzar mesures a la longitud d'ona on absorbeix la forma bàsica de l'indicador del pH, i restant-li l'absorbància deguda a les cèl·lules i aplicant un calibratge, conèixer el valor del pH.

La metodologia de mesura i càlcul es descriu a continuació amb més detall:

- I. Mesura de l'absorbància a una longitud d'ona major a 620 nm, regió de l'espectre on no hi ha influència de l'indicador de pH. Per tal de reduir l'error de mesura, d'acord amb els desenvolupaments realitzats a l'apartat 5.1, s'aplica un entorn d'integració entre +/- 15 i +/- 20 nm. En els diferents apartats s'ha aplicat 635 +/- 15 nm, 640 +/- 20 nm, i 650 +/- 20 nm.

A la figura 8.6.1 es mostra un fragment del programa elaborat en Labview per al càlcul d'absorbància (referida a la figura com turbidesa). En aquest intervenen els paràmetres de calibratge de l'espectrofotòmetre (*off-set*, *slope*), la longitud d'ona central de mesura (635-650 nm), l'entorn d'integració (+/- 15-20 nm). A partir de les mesures en aquests punts, es calcula l'absorbància a partir de la fórmula que es mostra a l'equació 8.6.1.

$$\text{Absorbància} = -\log_{10}\left(\frac{I_L - I_{L,\text{blanc}}}{I_L - I_{L,\text{negre}}}\right) \quad \text{Eq. 8.6.1}$$

On:

I_L és la intensitat lumínica

$I_{L,0}$ és la intensitat lumínica del blanc

$I_{L,\text{negre}}$ és la intensitat lumínica mesurada per l'espectrofotòmetre amb la llum apagada

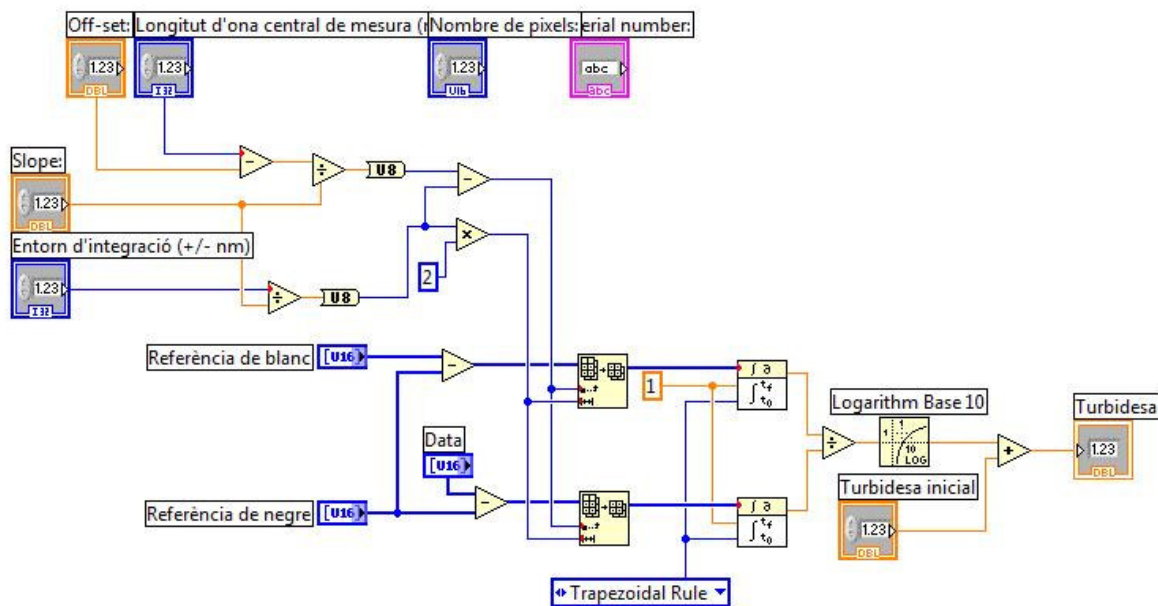


Figura 8.6.1. Fragment del programa elaborat en Labview per al càlcul de l'absorbància deguda a la concentració cel·lular (referida a la figura com turbidesa).

II. Mesura de l'absorbància a 560 +/-20 nm. Aquesta mesura inclou l'absorbància deguda a les cèl·lules i la deguda a la forma base de l'indicador de pH.

Càlcul absorbància deguda a les cèl·lules a 560 a partir de les dades a les longituds d'ona de 635 +/- 15 nm a 650 +/- 20 nm. En el cas de mesures a 650 +/-20 nm, l'equació es mostra a l'equació 8.3.2, contemplant cadascuna de les absorbàncies l'entorn d'integració de +/-20 nm.

$$\text{Absorbància}_{560\text{nm}} = 0,0067 + 1,1452 \cdot \text{Absorbància}_{650\text{nm}} \quad \text{Eq. 8.3.2}$$

Aquest valor d'absorbància deguda a la suspensió cel·lular es resta del total d'absorbància a 560 +/-20 nm, i al valor resultant d'aquesta operació s'hi aplica la sigmoïdal que permetrà calcular el valor del pH.

Exemple de càlcul:

- i. Absorbància cèl·lules mesurada a 650nm = 0,200 UA
 - ii. Absorbància cèl·lules calculada a 560nm = 0,236 UA
- calibratge aplicat: $Abs_{560} = 1,1452 Abs_{650} + 0,0067$

iii. Restar a l'absorbància total la deguda a les cèl·lules:

$$Abs_{pH} = Abs_{total,560nm} - Abs_{cell\ 560nm} = 0,800 - 0,236 = 0,564 \text{ UA}$$

iv. A partir del valor anterior, aplicar la sigmoïdal per calcular el valor de pH (sigmoïdal de DMEM 10% FCS):

$$pH = x_0 - b \ln\left(\frac{a}{y-y_0} - 1\right)$$

$$pH = 7,5665 - 0,148 \ln\left(\frac{1,8851}{0,564 - 0,0608} - 1\right)$$

$$pH = 7,15$$

9. BIBLIOGRAFIA

- Amao Y., Miyashita T., Okura I. (2001). Metalloporphyrins immobilized in styrene-trifluoroethyl-methacrylate copolymer film as an optical oxygen sensing probe. *Journal of Porphyrins and Phtalocyanines* 5, 433-438.
- Arocena I. (2007-2008). Publicación seriada titulada “Los colores de la Biotecnología”, en los nº 1,2,4,5,6 de la revista *Biotec Magazine*, de MKM Publicaciones.
- ASEBIO (ASociación Española de BIOempresas) (2008). Informe ASEBIO 2007, Editado por la Asociación Española de bioempresas.
- Bambot S.B., Holavanahali R., Lakowicz J.R., Carter G.M., Rao G. (1994). Phase fluorometric sterilizable optical oxygen sensor. *Biotechnology and bioengineering* 43, 1139-1145.
- Baneyx F., Mujacic M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 22, 1399-1408.
- Bartolomew S.R., Tansey J.T. (2007). Cost-Effective Engineering of a Small-Scale Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 96, 401-407.
- Behrendt U., Koch S., Gooch D.D., Steegmans U., Comer M.J. (1994). Mass spectrometry: a tool for on-line monitoring of animal cell cultures. *Cytotechnology* 14, 157-165.
- Berndt K.W., Lakowicz J.R. (1992). Electroluminescent lamp-based phase fluorometer and oxygen sensor. *Analytical Biochemistry* 201, 319-325.
- Betts J.I., Baganz F. (2006). Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *Microbial Cell Factories* 5, 21.
- Büchs J. (2001). Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal* 7, 1-98.
- Bylund F., Guillard F., Enfors S.-O., Trägårdh C., Larsson G. (1999). Scale down of recombinant protein production: a comparative study of scaling performance. *Bioprocess Engineering* 20, 377-389.
- Carraway E.R., Demas J.N., DeGraff B.A., Bacon J.R. (1991). Photophysics and photochemistry of oxygen sensors based on luminescent transition-metal complexes. *Analytical Chemistry* 63, 337-342.

- Cereghino J.L., Cregg J.M. (2000). Heterologous Protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology reviews* 24, 45-66.
- Chalmers J.J. (1994). Cells and bubbles in sparged bioreactors. *Cytotechnology* 15, 311-320.
- Chalmers J.J. (1996). Shear sensitivity of insect cells. *Cytotechnology* 20, 163-171.
- Chapman T.M., Perry C.M. (2004). Insulin Detemir: A Review of its Use in the Management of Type 1 and 2 Diabetes Mellitus. *Drugs* 64, 2577-2595.
- Charlesworth J.M. (1994). Optical sensing of oxygen using phosphorescence quenching. *Sensors and actuators B* 22, 1-5
- Charlesworth J.M., Gan T.H. (1996). Kinetics of quenching of ketone phosphorescence by oxygen in a glassy matrix. *Journal of Physical Chemistry* 100, 14922-14927.
- Chen A., Chitta R., Chang D., Amanullah A. (2009). Twenty-Four Well Plate Miniature Bioreactor System as a Scale-Down Model for Cell Culture Process Development. *Biotechnology and Bioengineering* 102, 148-160.
- Choi M.M.F., Xiao D. (2000). Single standard calibration for an optical oxygen sensor based on luminiscence quenching of a ruthenium complex. *Analytica Chimica Acta* 403, 57-65.
- Cino J. (1999). High yield protein production from *pichia pastoris* yeast: a protocol for bench-top fermentation. Protocol proveit per New Brunswick Scientific (Edison, USA), www.nbsc.com.
- Columbia Encyclopedia (2008). Chemical Industry, a The Columbia Encyclopedia, Sixth Edition. Columbia University Press, New York.
- D'mello R., Hill S., Poole R.K. (1996) The cytochrome bd quinol oxidase in *Escherichia coli* has an extremely high oxygen affinity and two oxygen-binding haems: implications for regulation of activity in vivo by oxygen inhibition. *Microbiology* 142, 755-763.
- DaSilva E.J. (2007). The colours of biotechnology: science, development and humankind. *Electronic Journal of Biotechnology* - Editorial, Jan 2007.

- Diao J., Young L., Zhou P., Schuler M.-L. (2008). An actively mixed Mini-bioreactor for protein production from suspended animal cells. *Biotechnology and Bioengineering* 100, 72-81.
- Dodge T. C., Hu W.S. (1986). Growth of hybridoma cells under different agitation conditions. *Biotechnology Letters* 8, 683-686.
- Doran P. (1998). *Principios de la ingeniería de los bioprocesos*. Academic Press Ltd., London.
- Dorresteyn R. C., Harbrink K. N., Gooljer C. D., Tramper J., Beuvery E. C. (1996). On-line estimation of the biomass activity during animal-cell cultivations. *Biotechnology and Bioengineering* 50, 206-214.
- Drews M., Hunt R. (2010). Growth and Production Characteristics of Four Mammalian Cell Lines on a Cost-Effective Serum-Free Medium. *Cells and Culture. ESACT Proceedings* 4, 223-227.
- Dunn C.J., Plosker G. L., Keating G.M., McKeage K., Scott L. J. (2003). Insulin Glargine: An Updated Review of its Use in the Management of Diabetes Mellitus. *Drugs* 63, 1743-1778.
- Eaton K., Douglas B., Douglas P. (2004). Luminiscent oxygen sensors: Time-resolved studies and modelling of heterogeneous oxygen quenching of luminescence emission from Pt and Pd octaethylporphyrins in thin polymer films. *Sensors and actuators B* 9, 2-12.
- EFPIA (European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations). EFPIA annual report, *The Pharmaceutical Industry in figures*, 2008.
- EC-JRC-IPTS (2007). Consequences, opportunities and challenges of modern biotechnology for Europe, European Commission Joint Research Centre, Institut for Prospective Technological Studies, JRC reference reports. Zika E., Papatryfon I., Wolf O., Gómez-Barbero M., Stein A.J., Bock A-K..
- ETEPS (European Techno-Economic Policy Support Network) (2007). Consequences, opportunities and challenges of modern biotechnology for Europe Bio4EU-task 1. Document inclòs en l'estudi de EC-JRC-IPTS (2007).
- Farmaindustria, memoria anual (2007). Datos económicos provenientes de INE (Encuesta sobre actividades de I+D 2005 y 2006).

- Flores C-L, Rodríguez C., Petit T., Gancedo C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS microbiology reviews* 24, 507-529.
- Fredlund E., Broberg A., Boysen M.E., Kenne L., Schnürer J. (2004a). Metabolite profiles of the control yeast *Pichia anomala* J121 under oxygen limitation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 403-409.
- Fredlund E., Blank L.M., Schnürer J., Sauer U., Passoth V. (2004b). Oxygen- and glucose-dependent regulation of the central carbon metabolism in *Pichia anomala*. *Applied and Environmental Biotechnology* 70, 5905-5911.
- Fundación Genoma España (2006). Impacto de la Biotecnología en los sectores industrial y energético, Informe de prospectiva tecnológica.
- Gàlvez J. (2006). Desenvolupament d'un sistema per al seguiment de la concentració i l'activitat cel·lulars en cultius de cèl·lules animals no adherents en minibioreactor. Treball experimental títol de Màster, programa de doctorat en Biotecnologia, UAB.
- Gámez X. (2000). Estudi d'estratègies de cultiu per a cèl·lules animals, basades en eines d'instrumentació i control. Tesi doctoral, UAB. <http://www.tesisenxarxa.net/>
- Gao F.G., Jeevarajan A.S., Anderson M.M. (2004). Long-term continuous monitoring of Dissolved oxygen in cell culture médium for perfused bioreactors using optical oxygen sensors. *Biotechnology and Bioengineering* 86, 425-433.
- Gill N.K., Appleton M., Baganz F., Lye G.J. (2008). Quantification of power consumption and oxygen transfer characteristics of a stirred miniature bioreactor for predictive fermentation scale-up. *Biotechnology and Bioengineering* 100, 1144-1155.
- Ihde A.J. (1983). The development of modern chemistry. Dover books on physics and chemistry. Dover, New York.
- Jacobs P. P., Geysens S., Vervecken W., Contreras R., Callewaert N. (2009). Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. *Nature Protocols* 4, 58-70.

- John G.T., Klimant I., Wittmann C., Heinzle E. (2003). Integrated optical sensing of dissolved oxygen in microtiter plates: a novel tool for microbial cultivation. *Biotechnology and Bioengineering* 81, 829-836.
- Jorjani P., Ozturk S.S. (1999). Effects of cell density and temperature on oxygen consumption rate for different mammalian cell lines. *Biotechnology and Bioengineering* 64, 349-356.
- Joshi J.B., Elias C.B., Patole M.S. (1996). Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. *Chemical Engineering Journal* 62, 121-141.
- Kao C.M. (1999). Functional genomics technologies: creating new paradigms for fundamental and applied biology. *Biotechnology Progress* 15, 304-311.
- Kensy F., John J.T., Hofmann B., Büchs J. (2005). Characterisation of operation conditions and online monitoring of physiological culture parameters in shaken 24-well microtiter plates. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 28, 75-81.
- Kjeldsen T. (2000). Yeast secretory expression of insulin precursors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 277-286.
- Kost K.A., Condreay J.P., Jarvis D.L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology* 23, 567-575.
- Kostov Y., Harms P., Pilato R.S., Rao G. (2000a). Ratiometric oxygen sensing: detection of dual-emission ratio through a single emission filter. *Analyst* 125, 1175-1178.
- Kostov Y., Van Houten K.A., Harms P., Pilato R.S., Rao G. (2000b). Unique oxygen analyzer combining a dual emission probe and a low-cost solid-state ratiometric fluorometer. *Applied Spectroscopy* 54, 864-868.
- Kostov Y., Harms P., Randers-Eichhorn L., Rao G. (2001). Low-cost microbioreactor for high-throughput bioprocessing. *Biotechnology and bioengineering* 72, 346-352.
- Kumar S., Wittmann C., Heinzle E. (2004). Minibioreactors. *Biotechnology Letters* 26, 1-10.

- Kumari S., Beatty C.M., Browning D.F., Busby S.J.W., Simel E.J., Hovel-Miner G., Wolfe A.J. (2000). Regulation of Acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 182, 4173-4179.
- Kuncova G., Fialova M. (1995). Optical oxygen sensor based on metallo-organic compound immobilized by sol-gel technique. *Biotechnology Techniques* 9, 175-178.
- Kyung Y.-S., Peshwa M. V., Gryte D. M., Hu W.-S. (1994). High density culture of mammalian cells with dynamic perfusion based on on-line oxygen uptake rate measurements. *Cytotechnology* 14, 183-190.
- Lakowicz J.R. (2006). Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum editor, New York.
- Latimer P. (1982). Light scattering and absorption as methods of studying cell population parameters. *Annual Reviews of Biophysics and Bioengineering* 11, 129-150.
- Lecina M. (2007). Anàlisi d'alternatives per a un bioprocés de producció d'una vacuna animal. Tesi doctoral, UAB. <http://www.tesisenxarxa.net/>
- Lebanon S.S., San K.-Y., Bennet G.N. (2005). Effect of oxygen on the *Escherichia coli* ArcA and FNR regulation systems and metabolic responses. *Biotechnology and Bioengineering* 89, 556-564.
- Lee Y.H., Tsao G.T. (1979). Dissolved oxygen electrodes. *Advances in Biochemical Engineering* 13, 35-86.
- Lynn D.E. (2007). Available lepidopteran insect cell lines. *Methods in Molecular Biology* 388, 117-137.
- Mäder U., Zig L., Kretschmer J., Homuth G., Putzer H. (2008). mRNA processing by RNases J1 and J2 affects *Bacillus subtilis* gene expression on a global scale. *Molecular Microbiology* 70, 183-196.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (1997). Brock Biology of microorganisms, 8ª Edició. Prentice Hall International, New York.

- Maharbiz M.M., Holtz W.J., Howe R.T., Keasling J.D. (2004). Microbioreactor arrays with parametric control for high-throughput experimentation. *Biotechnology and Bioengineering* 85, 376-381.
- Meyer H.P., Käppeli O., Fietcher A. (1985). Growth control in microbial cultures. *Annual Review of Microbiology* 39, 299-319.
- Möller K. (2001). Glucose metabolism in the petite-negative yeast *Saccharomyces kluyveri*. Tesi doctoral, Technical University of Denmark.
- Mourant J.R., Freyer J.P., Hielscher A.H., Eick A.A., Shen D., Johnson T.M. (1998). Mechanisms of Light Scattering from Biological Cells Relevant to Noninvasive Optical-Tissue Diagnostics. *Applied Optics* 37, 3586-3593.
- Nahapetian A.T., Thomas J. N, Thilly W.G. (1986). Optimization for environment of high density vero cell culture: effect of dissolved oxygen and nutrient supply on cell growth and changes in metabolites. *Journal of Cell Science* 81, 65-103.
- Nilsang S., Nehru V., Plieva F.M., Nandakumar K.S., Rakshit S.K., Holmdahl R., Mattiasson B., Kumar A. (2008). Three-Dimensional Culture for Monoclonal Antibody Production by Hybridoma Cells Immobilized in Macroporous Gel Particles. *Biotechnology Progress* 24, 1122-1131.
- Olsson L. Nielsen J. (1997). On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. *Trends in Biotechnology* 15, 517-227.
- Ortega Martínez E. (1992). Manual de investigación comercial, 3a Edición. Ed. Pirámide, Madrid.
- Ozturk S.S., Palsson B.O. (1991). Growth, metabolic and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 2. Effects of serum concentration, Dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor. *Biotechnology Progress* 7, 481-494.
- Ozturk S.S., Hu W.-S. (2006). *Cell Culture Technology for pharmaceutical and cell-based therapies*. CRC press, Boca Raton.
- PhRMA (2008). New drugs approvals in 2007. Presented by America's Pharmaceutical Research Companies.

- Prentis S. (1993). *Biotecnología Una nueva revolución industrial* Biblioteca Científica Salvat, Barcelona.
- Rao G., Moreira A., Brorson K. (2009). Disposable bioprocessing: the future has arrived. *Biotechnology and Bioengineering* 102, 348-356.
- Revsbech N.P., Jørgensen B.B., Blackburn T.H., Cohen Y. (1983). Microelectrode studies of the photosynthesis and O₂, H₂S, and pH profiles of a microbial mat. *Limnology and Oceanography* 28, 1062-1074.
- Rodríguez, Juli (2006). Desenvolupament d'eines d'enginyeria tissular per a la regeneració de lesions de cartílag hialí i teixit cardíac. Treball per a l'obtenció del títol de Master en Biotecnologia, UAB.
- Sahni M., Wilcox H., Mettner P., Reiss C., Gilliland S.L., Purtle D.L., Etchberger K.J. (2006). HEK 293 cell growth and virus production in EX-CELL™ 293 serum-free medium. SAFC Biosciences Research Report.
- Sanfeliu A. (1995). Producció d'anticossos monoclonals mitjançant el cultiu *in vitro* d'hibridomes en bioreactors. Anàlisi de la fisiologia i metabolisme cel·lulars. Tesi doctoral, UAB. <http://www.tesisenxarxa.net/>
- Sarró E. (2005). Desenvolupament d'un sistema de seguiment de concentració i activitat cel·lular en cultius de cèl·lules animals adherents. Treball per a l'obtenció del títol de Master en Biotecnologia, UAB.
- Sarró E. (2009). Sistemes de monitoratge per a cultius de cèl·lules animals adherents. Desenvolupament i aplicacions en models cel·lulars i tissulars. Tesi doctoral, UAB. <http://www.tesisenxarxa.net/>
- Shacter E. (1989). Serum-free media for bulk culture of hybridoma cells and the preparation of monoclonal antibodies. *Trends in biotechnology* 7, 248-253.
- Scheidle M., Klinger J., Büchs J. (2007). Combination of On-line pH and Oxygen Transfer Rate Measurement in Shake Flasks by Fiber Optical Technique and Respiration Activity Monitoring System (RAMOS). *Sensors* 7, 3472-3480.
- Schmidt F.R. (2005). Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Applied microbiology and biotechnology* 68, 425-435.

- Sen A., Kallos, M.S., Behie L.A. (2001). Effects of hydrodynamics on cultures of mammalian neural stem cell aggregates in suspension bioreactors. *Industrial and Engineering Chemical Research* 40, 5350-5357.
- Singh V. (1999). Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology* 30, 149-158.
- Solà A. (2004). Estudi del metabolisme central del carboni de *Pichia pastoris*. Tesi doctoral, UAB. <http://www.tesisenxarxa.net/>
- Solà A., Maaheimo H., Ylönen K., Ferrer P., Szyperski T. (2004). Amino acid biosynthesis and metabolic flux profiling of *Pichia pastoris*. *European Journal of Biochemistry* 271, 2462-2470.
- Solé M., Rius N., Lorén J.G. (2000). Rapid extracellular acidification induced by glucose metabolism in non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *International Microbiology* 3, 39-43.
- Stancik L.M., Stancik D.M., Schmidt B., Barnhart D.M., Yoncheva Y.N., Slonczewski J.L. (2002). pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 184, 4246-4258.
- Stephens P.J., Joynson J.A., Davies K.W., Holbrook R., Lappin-Scott H.M., Humphrey T.J. (1997). The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. *Journal of applied microbiology* 83, 445-455.
- Stettler M., Zhang X., Hacker D.L., De Jesús M., Würm F.M. (2007). Novel orbital shake bioreactors for transient production of CHO derived IgGs. *Biotechnology Progress* 23, 1340-1346.
- Tintó A. (1999). Millora de cultius in vitro d'hibridomes mitjançant el desenvolupament d'un sistema de perfusió i la inhibició de la mort cel·lular programada. Tesi doctoral, UAB. <http://www.tesisenxarxa.net/>
- Tramper J., Williams J.B., Joustra D.J. (1986). Shear sensitivity of insect cells in suspension. *Enzyme and Microbial Technology* 8, 33-36.
- Tramper J., Smith J.D., Sreatham J., Valk J.M. (1988). Bubble-column design for growth of fragile insect cells. *Bioprocess Engineering* 3, 37-41.

- Vallejos J.R., Kostov Y., Ram A., French J.A., Marten M.R., Rao G. (2006). Optical Analysis of liquid mixing in a minibioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 93, 906-911.
- Van der Valk J., Brunnerb D., De Smetc K., Fex Svenningsend Å., Honeggere P., Knudsenf L.E., Lindlg T., Norabergd J., Priceh A., Scarinoi M.L., Gstraunthalerj G. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in vitro* 24, 1053-1063.
- Van Houten K.A., Heath D.C., Barringer C.A., Rheingold A.L., Pilato R.S. (1998). Functionalized 2-pyridil-substituted metallo-1,2-enedithiolates. Synthesis, characterization and photophysical properties of (dppe)M{S₂C₂(2-pyridinium)(CH₂CH₂OR“)}. (R“=H, Acetyl, Lauroyl; M = Pd, Pt; Dppe = 1,2-Bis(piphenylphosphino)ethane). *Inorganical chemistry* 37, 4647.
- Vanrolleghem P.A., Kong Z., Rombouts G., Verstraete W. (1994). An on-line respirographic biosensor for the characterization of load and toxicity of wastewaters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 59, 321-333.
- Vanrolleghem P.A., Lee D.S. (2003). On-line monitoring equipment for wastewater treatment processes: state of the art. *Water Science and Technology* 47, 1-34.
- Varley J., Birch J. (1999). Reactor design for large scale suspension animal cell culture. *Cytotechnology* 29, 177-205.
- Vasala A., Panula J., Bollók M., Illmann L., Hälsig C., Neubauer P. (2006). A new wireless system for decentralised measurement of physiological parameters from shake flasks. *Microbial Cell Factories* 5, 8.
- Vidal L. (2006). Producción de aldolasas recombinantes: de la biología molecular al desarrollo de procesos. Tesis doctoral, UAB. <http://www.tesisenxarxa.net/>
- Vila P. (2001). Enginyeria metabòlica de cèl·lules d' Escherichia coli: efecte sobre el creixement, el consum de glucosa i la secreció de subproductes. Tesis doctoral, UAB. <http://www.tesisenxarxa.net/>
- Werner R.G., Noé W. (1993). Mammalian cell cultures. Part I: Characterization, morphology and metabolism. *Arzneim.-Forsch./Drug.Res.* 43, 1134-1139.

- Wu P., Ozturk S.S., Blackie J.D., Thrift J.C., Figueroa C., Naveh D. (1995). Evaluation and applications of optical cell density probes in mammalian cell bioreactors. *Biotechnology and bioengineering* 45, 495-502.
- Würm F.M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology* 22, 1393-1398.
- Xu M., Wu T.T., Qu J.Y. (2008). Unified Mie and fractal scattering by cells and experimental study on application in optical characterization of cellular and subcellular structures. *Journal of Biomedical Optics* 13, 024015.
- Yasumura Y., Kawakita Y. (1963). A line of cells derived from African green monkey kidney. *Nippo Rinsho* 21, 1209-1210.
- Zanzotto A., Szita N., Boccazzi M., Lessard P., Sinskey A.J., Jensen K. F. (2004). Membrane-aerated microbioreactor for high-throughput bioprocessing. *Biotechnology and Bioengineering* 87, 243-254.
- Zaritski A., Woldringh C.L., Fishov I., Vischer N.O.E., Einav M. (1999). Varying division planes of secondary constrictions in spheroidal *Escherichia coli* cells. *Microbiology* 145, 1015-1022.
- Zhang J., Reddy J., Buckland B., Greasham R. (2002). Toward consistent and productive complex media for industrial fermentations: studies on yeast extract for a recombinant yeast fermentation process. *Biotechnology and Bioengineering* 82, 640-652.
- Zhang Z., Schärer J.M., Moo-Young M. (1997). Mathematical model for aerobic culture of a recombinant yeast. *Bioprocess Engineering* 17, 235-240.
- Zhang Z., Perozziello G., Boccazzi P., Geschke O., Sinskey A.J., Jensen K. F. (2007). Minibioreactors for bioprocess development. *Journal of the Association for Laboratory Automation (JALA)* 12, 143-151.
- Zhang H., Wang W., Quan C., Fan S. (2010). Engineering Considerations for Process Development in Mammalian Cell Cultivation. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11, 103-112.
- Zhou W., Rehm J., Hu W.-S. (1995). High viable cell concentration fed-batch cultures of hybridoma cells through on-line nutrient feeding. *Biotechnology and Bioengineering* 46, 579-587.

- Zimmermann H.F., John G.T., Trauthwein H., Dingerdissen U., Huthmacher K. (2003). Rapid evaluation of oxygen and water permeation through microplate sealing tapes. *Biotechnology Progress* 19, 1061-1063.