03072

Instituto de Biotecnología

Universidad Nacional Autónoma de México

C.C.H.

"Diseño y caracterización de un simulador de gradientes de oxígeno disuelto: Aplicación al proceso de producción de penicilino acilasa por *Escherichia coli* recombinante "

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

ANTONIO DE LEON RODRIGUEZ

Cuernavaca, Mor. 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de los Drs. Enrique Galindo Fentanes y Octavio T. Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN-300692, y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con la beca 84201.

A mi madre

Ma. de Jesús

A mis hermanos

Francisco, Jesús, J. Elena
Rosa, Berenice y Carmen

Gracias por su apoyo incondicional

Reconocimientos

Al Dr. Enrique Galindo por aceptarme en su grupo de trabajo, y por el apoyo que recibí para la realización de esta tesis.

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez, por su apoyo y por todas sus enseñanzas que me trasmitió a lo largo de mi formación.

A los miembros del Jurado, por la revisión del manuscrito de tesis,

Dr. O. Tonatiuh Ramírez
Dr. Enrique Galindo
Dr. Rafael Chávez
Dr. Enrique Merino
Dr. Mario Soberón

A quienes me apoyaron en el desarrollo de este trabajo,

M.C. Arturo Aguilar-Aguila
Ing. Rocio Zamora
Lic. Karin Levy

A mis amigos: Lolis, Francisco, Gaby, Ruben, Mónica, Laura, Betty y Juan, por todos los momentos que vivimos.

Indice general

	Página
Indice de figuras	iv
Indice de tablas	vii
Nomenclatura	viii
Resumen	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	6
2.1 Importancia del oxígeno en los procesos fermentativos	6
2.1.1 Suministro de oxígeno	6
2.1.2 Consumo de oxígeno	7
2.1.3 Efecto del oxígeno sobre el metabolismo de *E. coli*	9
2.1.4 Estudios a TOD constante en procesos de fermentación	11
2.2 Escalamiento	12
2.2.1 Gradientes de oxígeno disuelto y tiempos de circulación	14
2.2.2 Escalamiento descendente (*Scale-down*)	17
2.2.3 Simuladores utilizados en el escalamiento descendente	18
2.2.4 Trabajos reportados utilizando fluctuaciones de TOD	21
2.3 Modelo de estudio: la penicilino acilasa	26
2.3.1 Penicilinas semisintéticas	26
2.3.2 Penicilino acilasa	26
2.3.3 Biología molecular de PA proveniente de *E. coli*	27
2.3.4 Producción de PA	29
3. Objetivos	30
4. Materiales y métodos	31
4.1 Diseño del simulador	31
4.1.1 Sistema de fermentación	31
4.1.2 Programa de control	33
4.2 Caracterización del simulador	34
4.2.1 Determinación de la constante de tiempo del electrodo de TOD	34

4.2.2 Determinación de la constante de tiempo del sistema de fermentación 35
4.2.3 Respuesta del simulador a cambios escalonados en la variable de entrada 35
4.2.4 Respuesta del simulador a cambios sinusoidales en el flujo de oxígeno a la entrada 36
4.2.5 Determinación de las constantes de control 36
4.2.6 Generación de perfiles oscilantes de TOD 37
4.3 Proceso de producción de penicilino acilasa 38
4.3.1 Microorganismo 38
4.3.2 Medios de cultivo 39
4.3.3 Conservación del microorganismo 40
4.3.4 Inóculos 41
4.3.5 Muestreo 41
4.3.6 Métodos analíticos 41
4.3.6.1 Determinación de biomasa 41
4.3.6.2 Determinación de glucosa 41
4.3.6.3 Determinación de actividad enzimática 42
4.3.6.4 Determinación de ácidos orgánicos 43
4.4 Necesidad de la presión de selección en cultivos en bioreactor 44
4.5 Cultivos por lote a tensión de oxígeno disuelto constante 44
4.6 Cultivos a tensión de oxígeno disuelto oscilante 45
4.7 Estudios de maduración del precursor de PA en fase post-fermentativa 46

5. Resultados y discusión 47
5.1 Caracterización dinámica del sistema de fermentación 47
5.1.1 Constante de tiempo del electrodo 47
5.1.2 Constante de tiempo del simulador 49
5.1.3 Selección de las condiciones de operación del simulador 53
5.1.4 Respuesta del simulador a entradas sinusoidales 55
5.1.5 Generación de perfiles oscilantes 59
5.1.6 Determinación de las constantes de control 60
5.2 Cinéticas de crecimiento con y sin presión de selección 62
5.3 Cultivos a TOD constante 63
5.4 Cultivos a TOD oscilante 74
5.5 Efecto de las condiciones de incubación sobre el procesamiento del precursor de PA 83

5.6 Efecto conjunto del TOD oscilante y la maduración 88

6. Conclusiones y recomendaciones 92

7. Bibliografía 95

Apéndices 103

A. Análisis de la respuesta transitoria 103

A.1 Sistemas de primer orden 103

A.1.1 Respuesta al escalón unitario de sistemas de primer orden 104

A.1.2 Características de los sistemas de primer orden 106

A.1.3 Estimación de la constante de tiempo en sistemas de fermentación 107

A.1.4 Respuesta de los sistemas de primer orden a entradas sinusoidales 108

A.2 Sistemas de segundo orden 109

A.2.1 Respuesta de los sistemas de segundo orden al escalón unitario 110

A.2.2 Estimación de la constante de tiempo de sistemas de segundo orden con amortiguamiento crítico 113

B. Programa de control y generador de ondas cuadradas de TOD en lenguaje QuickBasic 114

C. Preparación de soluciones 123

C.1 Kanamicina (35 mg/ml) 123

C.2 IPTG (100 mM) 123

C.3 Tiamina (0.1 %) 123

C.4 Elementos traza 123

C.5 Buffer de fosfatos (pH 7.8) 124

C.6 Solución de PDAB 124

C.7 Solución de penicilina G al 20 % 124

D. Curvas estándar 125

C.1 Curva estándar de peso seco 125

C.2 Curva estándar de actividad enzimática 126

C.3 Curva estándar de ácidos orgánicos 127

E. Cultivo controlado en modo de lazo abierto 129

F. Cultivos a TOD constante 130

G. Cultivos a TOD oscilante 138

H. Programa de simulación de cultivos lote a TOD oscilante 143

Indice de figuras

Figura		Página
2-1	Diagrama de flujo de carbono y generación de energía en el metabolismo de *E. coli* (Lester y DeMoss, 1971; Varma y col., 1993 y Hörnsten, 1995).	10
2-2	Gradientes de oxígeno disuelto en tanques de gran escala (Oosterhuis y Kossen, 1984).	15
2-3	Efecto del volumen del tanque sobre los $\bar{t}_c$ para un fluido pseudoplástico (*A*) y tres fluidos newtonianos (*B*= 10^{-1} Pas; *C*= 10^{-2} Pas; *D*= 10^{-3} Pas). Configuración del tanque $Z_L/D=1$, Turbina Rushton de 6 paletas planas Di/D=0.33, Po=1.67 KW/m^3 (Anderson y col., 1982).	17
2-4	Sistemas de laboratorio reportados para la realización experimental de escalamiento descendente.	19
2-5	Modelo de dos compartimientos para tanques agitados (Reuss, 1991).	20
2-6	Tipos de ondas utilizadas en la metodología del escalamiento descendente.	21
2-7	Estructura de las penicilinas naturales.	26
2-8	Obtención de 6-APA por vía enzimática.	27
2-9	Precursor de la penicilino acilasa (modificado de Schumacher y col., 1986).	28
4-1	Esquema del sistema de control y adquisición de datos (Aguilar-Aguila y col., 1993).	32
4-2	Diagrama de flujo del programa de control.	34
4-3	Arreglo experimental para la determinación de la constante de tiempo del electrodo de TOD.	35
4-4	Curva típica de reacción del proceso.	37
4-5	Mapa genético del plásmido pPA102 (Ramírez y col. 1994b).	39
4-6	Reacción química del 6-APA con PDAB (Balasingham y col., 1972).	42
5-1	Curva de respuesta del electrodo de TOD para un cambio súbito de TOD.	48
5-2	Curva de respuesta del simulador ante un cambio escalonado (las lineas representan el orden del modelo ajustado.	49
5-3	Curva de respuesta del simulador con cámaras de humedad (las lineas representan el orden del modelo ajustado).	50
5-4	Estimación del tiempo muerto y de la VRS.	51
5-5	Efecto del número de Reynolds sobre la velocidad máxima de respuesta y el tiempo muerto del simulador.	52

5-6	Efecto de la agitación y la aireación sobre los parámetros que caracterizan al simulador (configuración con cámaras de humedad).	54
5-7	Efecto de las cámaras de humedad sobre los parámetros que caracterizan al simulador.	56
5-8	Respuesta del simulador a entradas sinusoidales.	57
5-9	Efecto del período de la función seno del flujo de O_2 (E=A= 10.5 %) sobre la amplitud en la señal de salida (TOD).	58
5-10	Efecto del período de oscilación de la función de entrada (flujo de O2) sobre la amplitud de la onda de salida (TOD) y el desfase entre la entrada y la salida.	58
5-11	Comparación de la onda de respuesta experimental del simulador con la señal propuesta por la teoría de control (asumiendo un modelo de primer orden).	59
5-12	Respuesta del simulador a diferentes *setpoints*. a) cuadrado y b) sinusoidal.	60
5-13	Comparación de la velocidad de respuesta del simulador a diferentes *setpoints*.	61
5-14	Cinética de crecimiento a 40 % TOD.	64
5-15	Cinética de crecimiento a 0.2 % TOD.	65
5-16	Cinéticas de crecimiento a diferentes niveles de TOD.	67
5-17	Cromatograma de a) soluciones estándar y b) metabolitos presentes en una muestra al agotamiento de glucosa y 0.2 % TOD.	68
5-18	Efecto del oxígeno disuelto sobre la velocidad específica de crecimiento.	69
5-19	Efecto del oxígeno disuelto sobre el rendimiento celular.	70
5-20	Efecto del oxígeno disuelto sobre la actividad enzimática de PA y la producción de ácidos orgánicos al agotamiento de glucosa. La actividad específica de PA en el cultivo anaerobio fue de 0 $U/mg_{cel.}$.	72
5-21	Efecto de la velocidad específica de crecimiento (obtenida mediante la limitación por oxígeno) sobre la producción de ácidos orgánicos, el rendimiento celular y la actividad específica de PA, medidos al agotamiento de glucosa.	73
5-22	Cinética a TOD oscilante (E = 2.5 %, A = 2.5 % y Ω = 400 s).	75
5-23	Composición de los gases a la entrada del bioreactor durante un cultivo a TOD oscilante (E = 2.5 %, A = 2.5 %, Ω = 400 s).	76
5-24	*Setpoint* cuadrado y respuesta del simulador durante un cultivo a TOD oscilante (E= 2.5 %, A= 2.5 % y Ω = 400 s).	77

5-25	Efecto del eje de oscilación sobre la velocidad específica de crecimiento, el rendimiento celular y la actividad específica de PA al agotamiento de glucosa. La barra (⊢—⊣) indica los niveles de TOD a los cuales se osciló.	78
5-26	Efecto del eje de oscilación sobre la producción PA y ácidos orgánicos. La barra (⊢—⊣) indica los niveles de TOD a los cuales se osciló.	79
5-27	Simulación numérica de un cultivo a TOD oscilante (E= 2.5%, A = 2.5% y Ω = 400 s).	81
5-28	Crecimiento escalonado como consecuencia de las oscilaciones de TOD	82
5-29	TOD oscilante y μ puntuales obtenidas para la simulación numérica del cultivo a TOD oscilante (E = 2.5%, A= 2.5% y Ω =400 s). La línea punteada (---) representa la μ experimental obtenida mediante los datos de biomasa medida cada hora.	83
5-30	Aumento en la actividad enzimática en la fase estacionaria de un cultivo lote.	84
5-31	Efecto de la ruptura celular sobre la determinación de la actividad de PA.	85
5-32	Efecto del pH sobre el procesamientodel precursor de la PA.	86
5-33	Efecto del acetato sobre el procesamiento del precursorde la PA.	87
5-34	Efecto del oxígeno sobre el procesamiento del precursor de la PA.	87
5-35	Comparación de la cinética de un cultivo a TOD constante a 40 % con un cultivo a TOD oscilante (E = 15 %, Ω = 400 s A = 5 % durante la fase de crecimiento y A = 15 % para la fase estacionaria).	90
5-36	Comparación de la cinética de un cultivo a TOD constante de 10 % con un cultivo a TOD oscilante (E = 7.5 %, A = 7.5 % y Ω = 400 s).	91

Indice de tablas

Tabla		Página
2-1	Algunas concentraciones de TOD críticas reportadas en la literatura	8
2-2	Ventajas y desventajas de los simuladores de gradientes de TOD reportados en la literatura	22
2-3	Algunos procesos de producción de PA.	29
4-1	Condiciones de operación.	38
4-2	Condiciones de control.	38
4-3	Medio Luria.	39
4-4	Agar Luria.	40
4-5	Medio BSg.	40
4-6	Tiempos de retención de diferentes compuestos.	43
4-7	Condiciones operacionales y parámetros de control para los cultivos a TOD constante.	45
4-8	Condiciones operacionales de los cultivos con fluctuaciones de TOD.	45
5-1	Constantes de tiempo para diferentes electrodos de TOD reportados en la literatura.	48
5-2	Constantes de control propuestas para las diferentes edades del cultivo.	61
5-3	Comparación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos a 10 % TOD con y sin presión de selección.	62
5-4	Constantes de Monod para diferentes cepas de *E. coli* para O_2 como sustrato limitante.	69

Nomenclatura

A	Amplitud de la onda	(%)
a_1	coeficiente	(-)
a_2	coeficiente	(-)
AE	Actividad enzimática de PA (producto)	(U/L)
AFA	Acido fenilacético	(-)
a_0	coeficiente	(-)
B	Magnitud del cambio de la repuesta medida	(%)
b	coeficiente	(-)
C_L	Concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo	(mg O_2/L)
C_g^*	Concentración de oxígeno disuelto a la saturación del aire	(mg O_2/L)
D	Diámetro del tanque	(m)
Di	Diámetro del impulsor	(m)
E	Eje de oscilación	(%)
E_n	Error actual	(%)
E_{n-1}	Error anterior	(%)
E_{n-2}	Error anterior a dos tiempos	(%)
G	Función de transferencia	(-)
H	Altura de la paleta de los impulsores	(m)
Kc	Constante proporcional	(-)
k_La	Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	(h^{-1})
Ko_2	Constante de satuación para oxígeno	(%)
Kp	Ganancia del proceso	(-)
Ks	Constante de saturación para glucosa	(g/L)
$K_{x/s}$	Constante de saturación para rendimiento	(%)
M^o	Magnitud del cambio de la variable manipulada	(%)
N	Velocidad de agitación	(rpm, s^{-1})
Na	Velocidad de transferencia de oxígeno	(mg O_2/L·h)
Np	Número de potencia	(-)
$O_2\%$	Flujo de oxígeno actual	(%)
$O_2\%_{n-1}$	Flujo de oxígeno anterior	(%)
P	Potencia	(W)
PA	Penicilino acilasa	(-)

q	Relación entre la velocidad angular en la punta de la flecha y la velocidad angular en el impulsor	(-)
Qi	Capacidad de bombeo del impulsor	(m^3/s)
Qo_2	Velocidad específica de consumo de oxígeno	(mg O_2/g h)
Re	Número de Reynolds	(-)
RFP	Reactor de flujo pistón	(-)
S	Sustrato	(g/L)
S	Variable compleja	(-)
t	Tiempo	(h)
t_c	Tiempo de circulación	(s)
$\overline{t_c}$	Tiempo de circulación promedio	(s)
t_{ca}	Tiempo característico	(s)
Td	Tiempo muerto	(s)
tm	Tiempo de mezclado	(s)
TOD	Tensión de oxígeno disuelto	(%)
tr	Tiempo de retención	(min)
UFC	Unidades formadoras de colonias	(-)
V	Volumen	(L, m^3)
VCO	Velocidad de consumo de oxígeno	(mg O_2/L·h)
VRS	Velocidad máxima de respuesta del simulador	(%/s)
W	Ancho del impulsor	(m)
X	Biomasa	(g/L)
$Y_{x/s}$	Rendimiento celular	($g_{cel.}/g_{glucosa}$)
$Y_{x/s(max)}$	Rendimiento celular máximo	($g_{cel.}/g_{glucosa}$)
Z_L	Altura del líquido en el tanque	(m)

Letras griegas

α	Coeficiente de producción asociada a crecimiento	(U/g)
β	Coeficiente de producción no-asociada a crecimiento	(U/g·h)
ϕ	Tiempo de control	(s)
η	Viscosidad	(Pa s)
ρ	Densidad	(kg/m^3)
τ	Constante de tiempo	(s)
τ_d	Constante derivativa	(s)

τ_E	Constante de tiempo del electrodo de TOD	(s)
τ_i	Constante integral	(s)
τ_S	Constante de tiempo del simulador	(s)
Ω	Perfodo de oscilación	(s)
ζ	Factor de amortiguamiento	(-)
μ	Velocidad especffica de crecimiento	(h^{-1})
μ_{max}	Velocidad especffica de crecimiento máxima	(h^{-1})

Resumen

Cuando se realiza el escalamiento de un proceso de fermentación, se asume un comportamiento ideal, y no se consideran los gradientes en las variables fisicoquímicas en el bioreactor, originados por el deficiente suministro de energía. Dada la baja solubilidad del oxígeno en los medios de cultivo acuosos, una de las variables más afectada es la tensión oxígeno disuelto (TOD), situación que puede resultar crítica para los procesos aerobios. En vista de la poca disponibilidad de tanques de gran volumen para la experimentación, una estrategia más accesible, consiste en la generación de fluctuaciones de TOD en equipos de fácil operación como son los bioreactores de laboratorio (simuladores). A esto se le conoce como "escalamiento descendente" (*Scale-down*).

En este trabajo, se diseñó y caracterizó un simulador de gradientes de oxígeno disuelto empleando herramientas de ingeniería de control de procesos. El simulador desarrollado está constituido por un bioreactor (de 1 L volumen de trabajo) instrumentado con sensores de pH y TOD. El simulador fue manipulado por un algoritmo de control proporcional integral derivativo escrito en lenguaje *QuickBasic*. El algoritmo incluye una subrutina de *setpoint* variable (onda sinusoidal o cuadrada) que permitió generar ambientes fluctuantes de TOD. Una vez caracterizado el simulador, se utilizó en el escalamiento descendente del proceso de producción de penicilino acilasa (PA) por *E. coli* recombinante, enzima de gran demanda en la industria farmacéutica, la cual se satisface mediante cultivos de gran volumen, en donde la formación de gradientes de oxígeno es inevitable.

Con respecto al simulador, los resultados mostraron que se trata de un sistema de primer orden, con una constante de tiempo (τ) de 27 s, capaz de generar oscilaciones de TOD a períodos superiores a este valor. Las condiciones óptimas de operación del simulador fueron: velocidades de agitación superiores a 500 rpm y flujo de gases de 1,000 cm^3/min. De los perfiles predeterminados que se probaron (sinusoidal y cuadrado), el perfil cuadrado resultó más eficiente para la generación de oscilaciones de TOD.

Para evaluar el efecto de las oscilaciones de TOD sobre la producción de PA, se realizaron diferentes cultivos variando el eje y la amplitud de la onda y manteniendo constante el período de oscilación a 400 s. Los resultados obtenidos se compararon con cultivos a TOD constante realizados a tensiones desde 0 hasta 40 % TOD (denominados como cultivos control).

En cuanto a los cultivos a TOD constante, los resultados mostraron que al diminuir la TOD de 40 a 0.2 %, la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento celular, disminuyeron como una función de la TOD, siguiendo un perfil de saturación ($\mu_{max} = 0.38\ h^{-1}$ y $K_{O_2} = 0.54$ % TOD para la velocidad específica de crecimiento y $Y_{X/S max} = 0.58$ gcel/gglucosa y $K_{X/S} = 0.67$ % TOD para rendimiento). Por el contrario, la producción de PA se incrementó de 0.09 a 0.165 $U/mg_{células}$ (medida al agotamiento de glucosa). Sin embargo, no se obtuvo crecimiento ni actividad de PA en condiciones anaerobias ($\mu = 0\ h^{-1}$). En los cultivos realizados a tensiones por debajo de 5 % TOD, se presentó acumulación de ácidos orgánicos (fórmico y acético principalmente), como consecuencia del efecto *Pasteur*.

De los cultivos a TOD oscilante se encontró que, al aumentar el eje de oscilación de 0.5 a 35 %, la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento celular se incrementaron de 0.17 a 0.38 h^{-1} y de 0.25 a 0.55 $g_{cel}/g_{glucosa}$, respectivamente, siguiendo un perfil de saturación. Por el contrario, la actividad específica de PA disminuyó de 0.17 a 0.09 U/g_{cel} (medida al agotamiento de glucosa). Los resultados mostraron que las oscilaciones de TOD no afectaron la cinética de crecimiento durante la fase exponencial, lo que se infiere de la similitud con los cultivos control.

La PA es particularmente interesante por ser de las pocas enzimas de procariotes que requieren procesamiento post-traduccional (maduración). Con la finalidad de evaluar el efecto de los parámetros como el pH, concentración de ácido acético y oxígeno disuelto sobre el procesamiento del precursor de PA, se evaluó el aumento de la actividad específica de PA de células en fase estacionaria (post-fermentativa) incubadas a pH 6, 7 y 8. El efecto del acetato se evaluó a 0, 0.6, 0.7 y 1.7 g/L y para oxígeno se probaron condiciones aerobias (9.1 y 21 % de O_2 en fase gaseosa) y anaerobias. De los resultados obtenidos, se encontró que el pH no afectó el procesamiento. Sin embargo, el acetato a la concentración de 1.7 g/L presentó un ligero efecto negativo sobre el procesamiento.

En las células incubadas en condiciones anaerobias, la actividad aumentó de 0.09 a 0.11 $U/mg_{cel.}$, mientras que en presencia de oxígeno, la actividad aumentó de 0.09 a 0.41$U/mg_{cel.}$. Los resultados obtenidos mostraron que el oxígeno participa de manera muy importante en el procesamiento post-traduccional del precursor de PA, situación que no ha sido reportada en la literatura.

Al considerar la etapa post-fermentativa, los cultivos a TOD oscilante presentaron más del doble de actividad de PA que los cultivos a TOD constante.

Una estrategia de fermentación que combine el efecto logrado por el control de la velocidad de crecimiento mediante la limitación de oxígeno y la exposición a tensiones altas de oxígeno (para favorecer el procesamiento post-traduccional), hacen de las oscilaciones de oxígeno una estrategia con gran potencial para aumentar la producción de PA a nivel industrial.

Con base en los estudios de escalamiento descendente realizados en este trabajo, se concluyó que la presencia de gradientes de oxígeno disuelto de los bioreactores de gran escala, pueden favorecer la producción de PA por *E. coli* JM101/pPA102.

Capitulo I
Introducción

1.1 Introducción

Los bioreactores tipo tanque agitado son los sistemas más ampliamente difundidos en el sector industrial, debido a la versatilidad que presentan respecto a otras configuraciones. Los objetivos fundamentales de todo bioreactor agitado son: mantener homogéneo el medio de cultivo y suministrar el oxígeno necesario para el crecimiento de los microorganismos (Galindo, 1996). Al escalar un proceso de fermentación, se asume un estado de idealidad, es decir se considera que el bioreactor sigue cumpliendo con las funciones para las cuales fue diseñado. Sin embargo, se ha demostrado experimentalmente en tanques de gran escala (volumen del tanque de 25 m^3 y superiores), que el mezclado se hace más deficiente, como consecuencia de las limitaciones físicas y de índole económico que no permiten suministrar la potencia necesaria para cumplir dicho objetivo. Lo anterior, trae como consecuencia la formación de gradientes de parámetros como la temperatura, el pH, la concentración de metabolitos, la biomasa y los nutrientes dentro del tanque. Bajo tales condiciones, los procesos de fermentación pueden ser afectados en cuanto a rendimientos o producción del metabolito de interés.

Conocer el efecto de los gradientes sobre los parámetros de producción, resulta de gran importancia. Sin embargo, la experimentación utilizando tanques de gran escala está fuertemente restringida en vista de los gastos operacionales que involucra. Por otra parte, tratar de reproducir dichos eventos utilizando reactores de laboratorio resulta más práctico. Así, el concepto de escalamiento hacia abajo (*Scale-down*) surge como una herramienta de investigación de más fácil acceso. El escalamiento descendente, pretende evaluar el efecto de las condiciones del mal mezclado sobre los parámetros de producción.

En vista de que el oxígeno es un elemento muy poco soluble en medios acuosos, es el sustrato más difícil de suministrar al cultivo. Situación que puede llegar a ser crítica ya que puede ser el sustrato limitante para el crecimiento de los microorganismos. La implementación experimental para simular gradientes de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) en bioreactores de laboratorio, se realiza asumiendo que en el tanque de gran escala se pueden distinguir dos zonas; a) una zona considerada como bien mezclada y b) zonas deficientes de oxígeno. La zona bien mezclada corresponde físicamente a las regiones aledañas a los impulsores en movimiento. En esta zona la

transferencia de oxígeno resulta eficiente y por consiguiente se logran concentraciones de oxígeno adecuadas para el metabolismo microbiano. Las zonas deficientes de oxígeno, se presentan lejos de los impulsores, en donde las tensiones de oxígeno son bajas, llegando incluso a cero.

Los simuladores desarrollados para la investigación de gradientes de TOD, han sido tradicionalmente sistemas de dos compartimientos con recirculación del medio de cultivo y sistemas de un compartimiento, en donde los gradientes de TOD se logran mediante la modificación de la presión parcial del oxígeno a la entrada del reactor. La gran mayoría de estos últimos no presentan ningún tipo de control retroalimentado a través del cual se pueda garantizar que la TOD obtenida sea la deseada.

La creciente demanda de penicilino acilasa, materia prima en la síntesis de penicilinas semisintéticas, se satisface mediante la producción del catalizador en cultivos de gran volumen, en donde la formación de gradientes de oxígeno es inevitable.

En este trabajo se desarrolló y caracterizó un simulador de gradientes de oxígeno disuelto que supera las limitaciones de los sistemas de un compartimiento sin control retroalimentado. El sistema desarrollado está constituido por un bioreactor de 1 litro y fue manipulado con un algoritmo de control de lazo cerrado proporcional-integral-derivativo (PID) escrito en lenguaje *QuickBasic*. El programa de control contiene una subrutina que genera *setpoints* oscilatorios a través de cambios escalonados (onda cuadrada) o bien mediante la función seno.

El simulador desarrollado se utilizó para evaluar el efecto de gradientes de TOD sobre la producción de penicilino acilasa por *Escherichia coli* recombinante. Con la finalidad de tener un punto de comparación, se realizaron cultivos a TOD constante, para conocer el comportamiento del cultivo asumiendo la condición ideal; es decir, considerando la ausencia de gradientes de TOD.

Este trabajo tiene cuatro aportaciones relevantes:

1.- La utilización de un sistema computarizado de fermentación capaz de generar perfiles oscilantes de TOD mediante control de lazo cerrado.

2.- La generación de datos utilizando el criterio de escalamiento hacia abajo en procesos de producción de metabolitos de microorganismos recombinantes, información escasa en la literatura.

3.- La propuesta de una etapa post-fermentativa para completar el proceso de maduración del precursor de penicilino acilasa.

4.- La proposición de estrategias novedosas (*i.e.* oscilaciones de TOD) para la optimización del proceso de producción de PA.

Capitulo II

Antecedentes

2.1 Importancia del oxígeno en los procesos fermentativos

El oxígeno, sin duda alguna, es de los sustratos más importantes, ya que puede afectar directa o indirectamente a los procesos biotecnológicos. La participación del oxígeno se puede dar en diferentes eventos metabólicos, por ejemplo:

a) En el metabolismo aerobio para la producción de energía, ya que participa como aceptor final de electrones y protones producidos en las reacciones de oxidación. Actúa también como inductor de la síntesis de varias enzimas respiratorias como la citocromo oxidasa (Strayer, 1990).

b) Como sustrato directo de algunas enzimas del metabolismo secundario. Por ejemplo, interviene directamente en la oxidación de la penicilina N a cefalosporina C mediante la expandasa (Zhou y col., 1992) y en la síntesis de otros antibióticos (Koning y col., 1981).

c) En los mecanismos de regulación de la esporulación de *Bacillus sphaericus* utilizado en la producción de bioinsecticidas (Karim y col., 1993)

d) En la estabilidad de plásmidos recombinantes tanto en bacterias como en levaduras, mediante un efecto indirecto de la velocidad de crecimiento (Lee y Hassan, 1987; Hopkins y col., 1987; Impoolsup y col., 1989 y Caunt y col., 1990). Sin embargo, poco se sabe al respecto y los mecanismos de acción no se conocen hasta el momento (Namdev y col., 1993).

2.1.1 Suministro de oxígeno

Independientemente del tipo de microorganismo, el bioreactor debe permitir un contacto tan bueno como sea posible entre la fase biótica (microorganismo) y abiótica del sistema. El crecimiento adecuado de un microorganismo está asociado íntimamente a los fenómenos de transferencia entre las células y el medio de cultivo. En este punto la transferencia de nutrientes al interior de la célula, depende en gran medida de la capacidad del bioreactor para mantener homogéneo el caldo de cultivo. En vista de que el oxígeno es un elemento muy poco soluble en medios acuosos, debe suministrarse continuamente mediante la aireación. La agitación, por su

parte participa en dos formas: a) mediante la operación de micromezclado, que consiste en el rompimiento de las burbujas y la disminución del espesor de la capa de líquido estática (capa límite) que las recubre y por ende contribuye a la transferencia de oxígeno y b) mediante el macromezclado, que consiste en la transferencia de momentum al medio de cultivo. Con esta operación, se pretende homogeneizar el medio de cultivo y, en consecuencia, evitar la formación de zonas muertas.

La transferencia de oxígeno hacia el caldo de cultivo se efectúa en por lo menos tres etapas importantes:

a) difusión desde el seno de la burbuja hacia la superficie líquida,
b) disolución en el líquido, y
c) difusión del oxígeno desde la superficie del líquido hacia el seno del mismo.

Este último paso resulta la principal resistencia a la transferencia de oxígeno al medio de cultivo y por consiguiente se le considera el paso limitante. La bien conocida ecuación de transferencia de oxígeno (ec. 2-1), muestra que la velocidad de transferencia depende de: a) un gradiente de concentración que actúa como fuerza motriz y b) de la capacidad del fermentador para transferir oxígeno. Esto último se ve reflejado en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La).

$$Na = k_La\left(C_g^* - C_L\right) \qquad (2\text{-}1)$$

donde:

Na = Velocidad de transferencia de oxígeno
C_L = Concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo
C_g^* = Concentración de oxígeno disuelto a la saturación del aire
k_La = Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

2.1.2 Consumo de oxígeno

La velocidad de consumo de oxígeno (VCO), depende del número de microorganismos en el medio de cultivo y, por consiguiente, aumenta en forma exponencial durante un cultivo lote. En cualquier punto de la curva de crecimiento celular, la VCO viene dado por :

$$VCO = Qo_2 X \tag{2-2}$$

donde:

VCO = Velocidad de consumo de oxígeno
Qo_2 = Velocidad específica de consumo de oxígeno
X = Biomasa celular

Para evitar que un cultivo esté limitado por oxígeno, la velocidad de transferencia debe ser mayor o al menos igual a la velocidad de consumo de oxígeno. La velocidad global de transferencia de oxígeno (dC_L/dt) viene dada por la ecuación 2-3.

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a\left(C_g^* - C_L\right) - Qo_2 X \tag{2-3}$$

El oxígeno disuelto (C_L), se puede mantener a un valor constante (sin limitar al cultivo) mediante la manipulación de la concentración de oxígeno en la fase gaseosa (cambio de presión parcial de oxígeno en C_g^*). De esta forma, es posible lograr diferentes perfiles de oxígeno disuelto como constante, oscilante o aleatorio (Zhou y col., 1992; Träger y col., 1992 y Namdev y col., 1993)

Se ha demostrado que bajo condiciones de limitación de oxígeno, la velocidad específica de crecimiento es una función de la concentración de oxígeno en el medio de cultivo, siguiendo una cinética de saturación tipo Monod. La concentración de oxígeno bajo la cual empieza la limitación se le conoce como concentración crítica (Chen y col., 1985). La **tabla 2-1** muestra algunas concentraciones críticas para diferentes microorganismos reportadas en la literatura.

Microorganismo	[OD]crítica, mg/L	Referencia
A. vinelandii	0.35	Chen y col., 1985
E. coli B/r ATCC 12407	0.12	Chen y col., 1985
Candida utilis	1.10	Quintero, 1987
S. cerevisiae	0.60	Quintero, 1987
P.chrysogenum	0.40	Quintero, 1987
E. coli TB-1/pUC19	0.25	Li y col., 1992

Tabla 2-1. Algunas concentraciones de TOD críticas reportadas en la literatura.

2.1.3 Efecto del oxígeno sobre el metabolismo de *E. coli*

La **figura 2-1** muestra el mapa metabólico de las rutas para la obtención de energía y el flujo de carbono en el metabolismo de *E. coli*. En condiciones no limitantes de oxígeno, la fuente de carbono -generalmente glucosa- es transformada completamente en acetil CoA. Si la velocidad de consumo de glucosa es superior a la capacidad oxidativa (como normalmente ocurre a altas velocidades específicas (Han y col., 1992)), parte de la acetil CoA es hidrolizada a coenzima A y ácido acético mediante la acetil CoA sintetasa. Al proceso generador de acetato por esta vía se le conoce como *"efecto Crabtree"* o *"efecto glucosa de las bacterias"* (Doelle y col., 1982). Sin embargo, la mayor parte de la acetil CoA es completamente degradada en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de *Krebs.*, vía que resulta la más eficiente para la obtención de energía.

Cuando se realiza un cultivo en ausencia total de oxígeno (anaerobiosis), el ácido pirúvico es hidrolizado a formiato y ácido acético. El ácido fórmico obtenido resulta el metabolito más importante, ya que es el principal donador de electrones en el metabolismo anaerobio (Ruiz-Herrera y DeMoss, 1969a). La enzima encargada de la oxidación del ácido fórmico es la formiato deshidrogenasa. Los electrones provenientes del formiato son utilizados en la reducción del nitrato, siempre y cuando la cepa sea capaz de expresar el sistema de la nitrato reductasa (Ruiz-Herrera y col., 1969b). En ausencia de nitrato o en mutantes deficientes de nitrato reductasa, la vía alterna para la producción de energía viene dada por la formiato hidrógeno-liasa, que degrada el ácido fórmico a hidrógeno molecular y dióxido de carbono (Hörnsten, 1995).

Lester y DeMoss (1971) demostraron que dos elementos -el molibdeno y el selenio- son indispensables en el metabolismo anaerobio de *E. coli*, ya que la síntesis de las enzimas encargadas del metabolismo del ácido fórmico (formiato deshidrogenasa, el citocromo b_{555} y la nitrato reductasa) solo se realizaba en la presencia de estos dos elementos. El molibdeno además, es el cofactor de la nitrato reductasa (Taniguchi e Itagaki, 1960).

Cuando el cultivo se realiza en condiciones microaerofílicas (limitación del crecimiento por oxígeno), *E. coli* establece el metabolismo denominado fermentación ácida mixta. Bajo tales condiciones, se producen diferentes ácidos orgánicos (acético, láctico, propiónico, succínico y fórmico) y etanol (**figura 2-1**). A este proceso se le conoce como *efecto Pasteur*. El intermediario para la generación de los ácidos orgánicos es el piruvato, que actúa como aceptor de electrones. Los metabolitos obtenidos por esta vía, generalmente son consumidos cuando la glucosa disponible se agota.

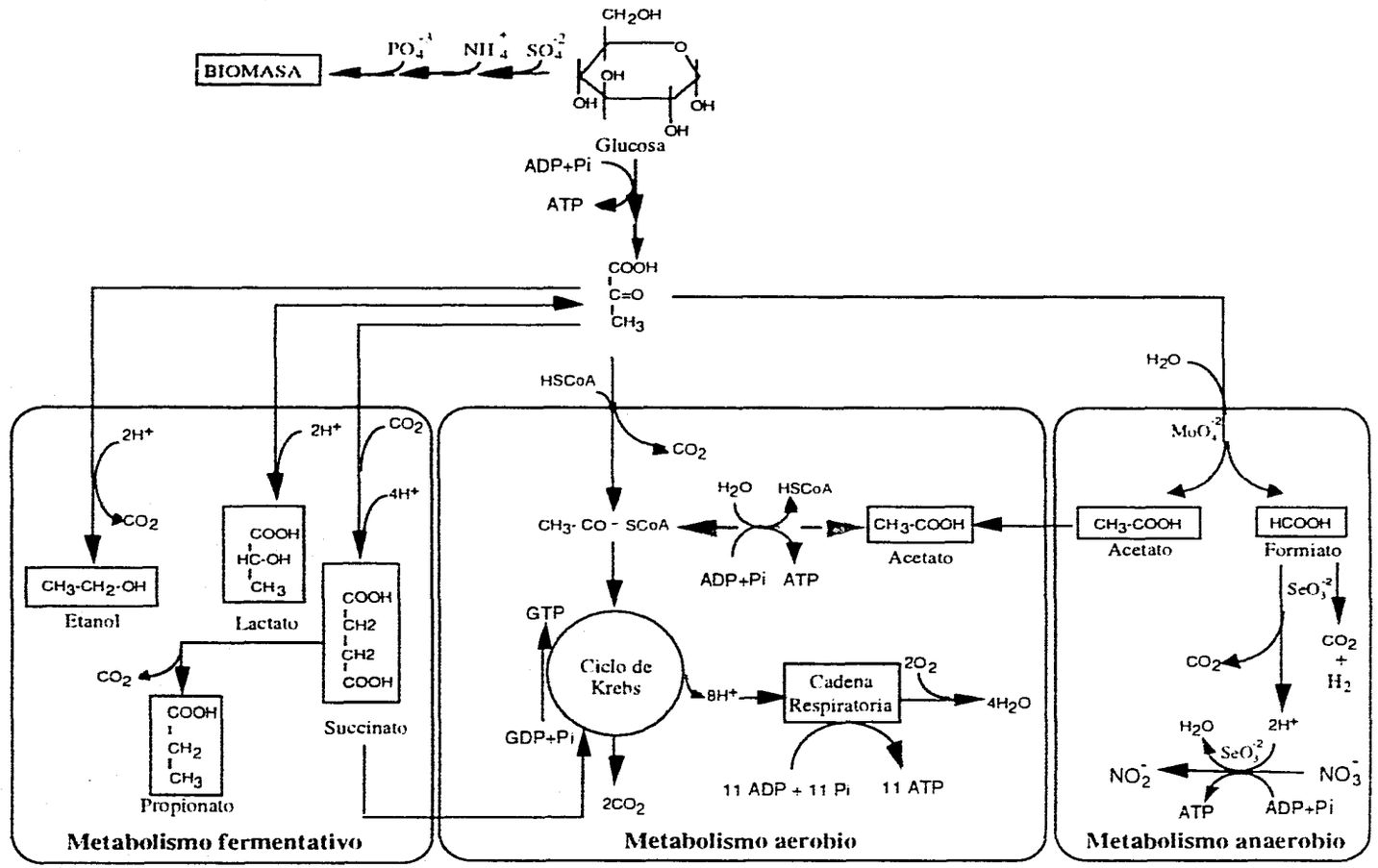


Figura 2-1. Diagrama de flujo de carbono y generación de energía en el metabolismo de *E. coli* (Lester y De Moss, 1971; Varma y col., 1993 y Hörnsten, 1995).

2.1.4 Estudios a TOD constante en procesos de fermentación

En vista de la importancia que tiene el oxígeno en los cultivos celulares, varios autores han evaluado el efecto de este sustrato sobre la producción de diferentes metabolitos.

Suphantharika y col. (1994) evaluaron el efecto de la TOD sobre la síntesis de los antibióticos dificidina y oxidificidina por *Bacillus subtilis*. Encontraron que la velocidad específica de crecimiento solo se reducía por debajo de 5% TOD. En cuanto a la producción de los antibióticos, se observó que la síntesis de oxidificidina no se afectaba por los niveles de oxígeno. Sin embargo, la velocidad de síntesis de dificidina se reducía de manera importante cuando se cultivaba a TOD por debajo de 40%.

Yegneswaran y col. (1991) estudiaron el efecto de la TOD constante sobre la producción de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*. Observaron disminución en el crecimiento por debajo de 50 % TOD, debido a la formación de *pellets*. La producción del antibiótico resultó mayor cuando el cultivo se realizaba a 100 % TOD, tomando como control, la producción de cultivos sin control de oxígeno. Otro ensayo, consistió en cultivos en donde se mantuvo la TOD a 100 % durante la fase de crecimiento y se redujo a 50% durante la fase estacionaria, dicho cultivo se comportó de la misma manera que aquel en donde se controló siempre a 100 %.

Zhou y col. (1992) investigaron la influencia del oxígeno disuelto constante sobre la producción de cefalosporina C por *Cephalosporium acremonium*. Tomaron este modelo para sus estudios en vista de que la expandasa, enzima que convierte la penicilina N en cefalosporina C, requiere de oxígeno como sustrato. Sus resultados mostraron que, al disminuir la TOD de 40 a 5 %, la concentración de cefalosporina C y la biomasa disminuyeron de 7.2 a 1.1 g/L y de 70 a 50.1g/L, respectivamente, mientras que la penicilina N aumentó de 2.57 a 7.65 g/L. Concluyeron que por debajo de 20% de TOD, el sistema estaba limitado, originando la acumulación de la penicilina N.

Lee y Hassan (1987) estudiaron, en quimiostatos limitados por glucosa, el efecto de la TOD y la tasa de dilución sobre la estabilidad y expresión de la toxina asesina "*Killer*" en *Saccharomyces cerevisiae* transformada con el plásmido pADH-10A. Reportaron que la expresión de la toxina (determinada como actividad entre densidad celular) fue mucho mayor cuando se crecieron las células a 100 % de nitrógeno (anaerobiosis) que cuando se utilizaba aire o 100 % de oxígeno.

Sin embargo, la estabilidad del plásmido fue mayor en los quimiostatos con suministro de aire en comparación con aquellos donde se utilizó nitrógeno u oxígeno puro.

Li y col. (1992) investigaron el efecto del oxígeno disuelto sobre la expresión de β-galactosidasa en *E. coli* recombinante TB-1/pUC19. Probaron tensiones de oxígeno de 0 a 100 % TOD. Los autores observaron limitación en el crecimiento celular por debajo de 10 % de TOD. En cuanto al contenido específico de plásmido, reportaron que, bajo condiciones anaerobias, se presentaba una considerable reducción en el contenido de plásmido y éste incrementaba continuamente en los intervalos de 0.4 a 100 % de TOD. Sin embargo, la actividad específica de β-galactosidasa obtenida en cultivos anaerobios resultó diez veces mayor respecto a la obtenida en cultivos con tensiones de oxígeno superiores a 10 %. Por otra parte, la actividad volumétrica de β-galactosidasa resultó de 439.2 $Ux10^{-3}$/L a 0.4 % de TOD, en tanto que a condiciones no limitantes de oxígeno, la actividad fue de 170 $Ux10^{-3}$/L, y en anaerobiosis de 109.4 $Ux10^{-3}$/L. De sus resultados concluyeron que la acumulación del plásmido fue mayor cuando los cultivos se realizaban a tensiones de oxígeno no limitantes. Sin embargo, la expresión del gene resultaba más eficiente a tensiones limitantes (bajas velocidades específicas de crecimiento).

Caunt y col. (1989) mediante el uso de quiminostato, evaluaron el efecto de la limitación de oxígeno sobre la estabilidad del plásmido pLG669-z para la producción de β-galactosidasa en *Saccharomyces cerevisiae*. Encontraron que, al someter el cultivo a un cambio escalonado de TOD a valores por debajo de la concentración crítica de oxígeno, disminuía la fracción celular con plásmido. Por otra parte, el plásmido resultó más estable cuando la cepa se cultivó en condiciones no limitantes de oxígeno.

Cabe resaltar que en la actualidad son pocos los estudios del efecto del oxígeno sobre sistemas de expresión recombinante (algunos otros trabajos son discutidos en la sección 2.2.4).

2.2 Escalamiento

El escalamiento se define como el traslado de un proceso de una escala a otra, manteniendo constante un parámetro de operación. Tradicionalmente, el orden establecido de escalamiento es de cierto volumen a otro mayor (*i.e.*, escalamiento ascendente). Bajo este contexto se dice que existen tres escalas de operación:

1- Escala laboratorio (1-10 L)
2- Escala piloto (30-500 L)
3. Escala industrial (> 1,000 L)

Cuando se traslada de un volumen establecido a otro más grande se habla de escalamiento ascendente (*Scale- up*). En caso contrario, es decir, si el proceso se lleva de cierta escala a una menor, se trata de escalamiento descendente (*Scale-down*).

Entre los parámetros más utilizados en el escalamiento ascendente se encuentran: potencia por unidad de volumen (P/V), coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La) y velocidad en la punta del impulsor (ND), entre otros. La mayoría de las veces, la elección del parámetro de escalamiento se lleva a cabo de manera empírica, lo que origina que la producción y los rendimientos del metabolito de interés no correspondan a los planeados. En la mayoría de los casos, tal diserepancia se debe a un suministro insuficiente de energía. Lo anterior se explica de la siguiente manera: conforme aumenta la escala de operación, los requerimientos de potencia aumentan de una forma drástica. El bien conocido número de potencia (ec. 2-4) establece que el aumento en la escala de operación (y por consiguiente en el diámetro de los impulsores) origina un fuerte incremento en la potencia consumida. Por lo cual, el suministro de potencia no es adecuado y por consecuencia el sistema no transfiere la energía necesaria para mantener homogéneo el medio de cultivo. De esta forma, la aparición de gradientes en el bioreactor se vuelve inevitable. Otra consecuencia del mal mezclado es la reducción en la trasferencia de oxígeno, lo que resulta considerablemente crítico en los procesos aerobios en donde el oxígeno interviene, ya sea de forma directa (síntesis de antibióticos (Koning y col., 1981)) o indirecta (afectando la velocidad específica de crecimiento (Li y col., 1992)).

$$Np = \frac{P}{\rho Di^5 N^3} \qquad (2\text{-}4)$$

donde:

ρ = Densidad
Di = Diámetro de los impulsores
N = Velocidad de agitación
P = Potencia
Np = Número de potencia

2.2.1 Gradientes de oxígeno disuelto y tiempos de circulación

Manfredini y col. (1983) monitorearon el oxígeno disuelto en diferentes zonas de un bioreactor de 112 m^3 utilizado en la producción de tetraciclinas por *Streptomyces aureofacies*. Encontraron la presencia de gradientes axiales y radiales de TOD en las zonas monitoreadas. Con sus resultados, propusieron un modelo simple con el que fue posible predecir la distribución de TOD en el bioreactor.

Oosterhuis y Kossen (1984) demostraron la presencia de gradientes de TOD en bioreactores de gran escala (20 m^3) mediante el monitoreo con sensores de TOD colocados a lo largo del tanque (**figura 2-2**). Encontraron que, en las inmediaciones del impulsor, se presentaban tensiones de 22 a 14 % respecto a la saturación del aire y que al moverse en forma radial, las tensiones de oxígeno decrecían a valores de 3 % a la altura de los impulsores y hasta de cero en las lejanías de éstos. Concluyeron que la presencia de los gradientes se debe a que los tiempos de mezclado son relativamente más grandes que la trasferencia de oxígeno (expresada como constante de tiempo (ver sección A.1.3)). Lo anterior tiene importancia ya que los parámetros como el tiempo de mezclado, y la trasferencia de oxígeno -entre otros- son función del tamaño del reactor, no así la constante de tiempo de las reacciones biológicas (Anderson y col., 1982).

El tiempo de mezclado de un bioreactor (t_m) se define como el tiempo necesario para que se alcance cierto grado de homogeneidad en el medio de cultivo ante una perturbación. Por convención, se ha establecido como grado de homogeneidad cuando se alcanza el 95 % del valor final de la variable medida. Si bien el t_m es de gran utilidad, es más común referirse al tiempo de circulación (t_c) definido como el tiempo necesario para que una partícula discreta de fluido, realice un ciclo a través de las regiones que definen al bioreactor. En otras palabras, los t_c nos dan información sobre la frecuencia con la que pasan los microorganismos a través de una región determinada dentro del bioreactor. Por esta razón, en realidad existe una distribución estadística de los tiempos de circulación, por lo cual es más común referirse al tiempo de circulación promedio ($\overline{t_c}$). Se ha reportado que la distribución de los t_c varía con el tamaño del bioreactor y con las propiedades reológicas del caldo de cultivo, incluso si se utilizan geometrías estándares (Anderson y col., 1982). Estas diferencias en t_c puede ser una de las causas por la cual los bioreactores de gran escala muestran menor productividad que la obtenida en bioreactores pequeños cuando el parámetro de escalamiento es P/V (Mukataka y col., 1980; Takebe y col. 1994).

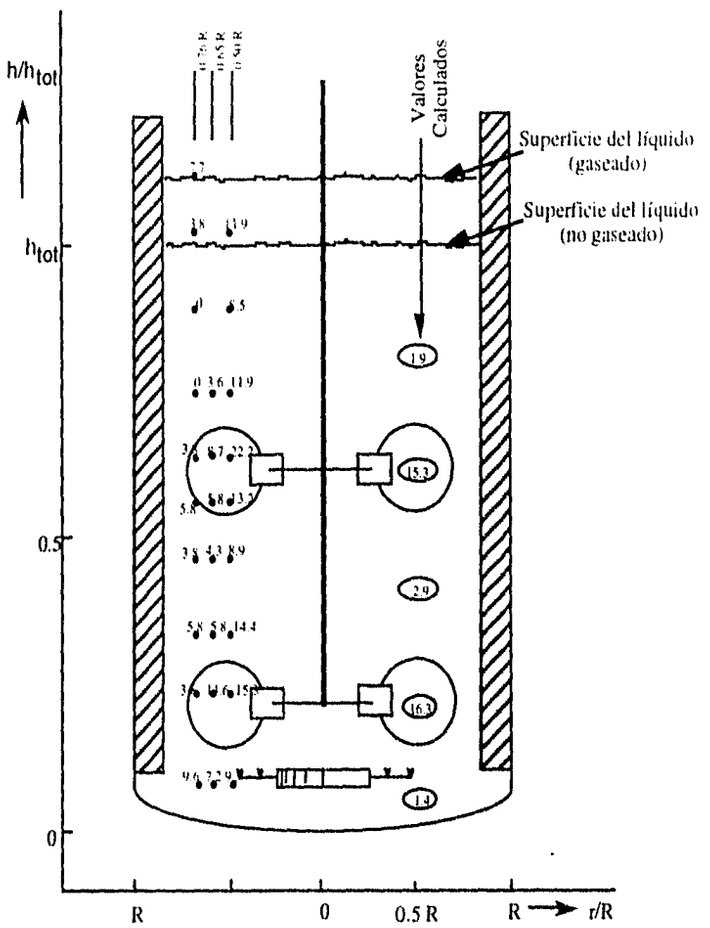


Figura 2-2. Gradientes de oxígeno disuelto en tanques de gran escala (Oosterhuis y Kossen, 1984), los valores están reportados en % de TOD y las escalas se encuentran en forma normalizada.

Anderson y col. (1982) reportaron que los t_c para tanques agitados pueden ser estimados a partir de la capacidad de bombeo de los impulsores (Q_i). Los autores estimaron los $\overline{t_c}$ para fluidos Newtonianos con diferentes viscosidades, así como el posible $\overline{t_c}$ de un fluido pseudoplástico (suponiendo la ley de la potencia) a diferentes escalas de operación **(figura 2-3)**. La capacidad de bombeo fue estimada mediante la correlación de Norwood y Metzner (1960) para turbinas rushton estándar (ec. 2-5).

$$Q_i = 1.98\text{x}10^{-2} N Di^2 W \left[\frac{Di^{0.4}\rho}{\eta}\right]^{0.5} \left(1-q^2\right)^{0.5} \qquad (2\text{-}5)$$

donde:

N = Velocidad de agitación
Di = Diámetro del impulsor
W = Ancho del impulsor
q = Relación entre la velocidad angular en la punta del impulsor y la velocidad angular del impulsor
ρ = Densidad
η = Viscosidad

El $\overline{t_c}$ es estimado como la relación entre el volumen del tanque y la capacidad de bombeo por los impulsores (ec. 2-6).

$$\overline{t_c} = \frac{V}{Qi} \qquad (2\text{-}6)$$

donde:

V = Volumen del líquido
Qi = Capacidad de bombeo de los impulsores

Sweere y col. (1987) citaron una correlación para estimar el $\overline{t_c}$ como una función de las dimensiones del tanque y de la velocidad de agitación (ec. 2-7).

$$\overline{t_c} = \frac{V}{2H\pi^2 NDi^3} \qquad (2\text{-}7)$$

donde:

N = Velocidad de agitación
Di = Diámetro del impulsor
H = Altura de la paleta de los impulsores
V = Volumen del líquido
π = 3.1416

Mukataka y col. (1980) reportaron un valor experimental de 2 s como $\overline{t_c}$ para tanques de 10.5 L (volumen de trabajo) y usando agua como fluido. Concluyeron que la relaciones Di/D probadas (0.33, 0.45 y 0.6) no afectaron el $\overline{t_c}$ a los valores de potencia a los que se trabajó (20-50 w/m^3).

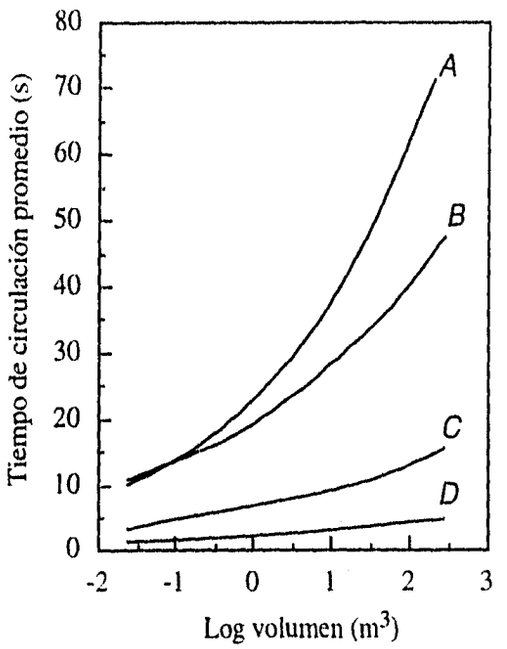


Figura 2-3. Efecto del volumen del tanque sobre los $\bar{t}_c$ para un fluido pseudoplástico (*A*) y tres fluidos newtonianos (*B* = 10^{-1} Pas; *C* = 10^{-2} Pas; *D* = 10^{-3} Pas). Configuración del tanque $Z_L/D=1$, Turbina Rushton de 6 paletas planas Di/D=0.33, Po=1.67 KW/m^3 (Anderson y col., 1982).

2.2.2 Escalamiento descendente (*Scale-down*)

Cuando se traslada un proceso de una escala de operación a otra más pequeña se le conoce como escalamiento descendente o hacia abajo (*scale-down*). Este concepto surgió de la necesidad de conocer el efecto que pueden tener los problemas que se presentan en los bioreactores de gran escala sobre determinado proceso.

La metodología clásica del escalamiento descendente consiste en detectar el mecanismo limitante del proceso y reproducirlo en simuladores de pequeña escala (Sweere y col., 1987). Una herramienta poderosa para determinar cual es el paso limitante, consiste en la comparación de los tiempos característicos (t_{ca}). Los t_{ca} son una medida de la velocidad con la que se llevan a cabo los procesos. Un valor pequeño en el t_{ca} indica un mecanismo rápido y un valor alto, un mecanismo lento.

Por comparación de los t_{ca} de los fenómenos de transporte (transferencia de oxígeno, tiempos de circulación, etc.) con los t_{ca} de los procesos biológicos (consumo de sustrato, crecimiento, etc.), se establece si el sistema está o no controlado por los fenómenos de transporte. En la mayoría de los casos así sucede, en vista de que los t_{ca} de ambos eventos son del mismo orden de magnitud (Oosterhuis y col, 1985).

Una vez que se conocen las condiciones limitantes del proceso (gradientes en variables ambientales, falta de nutrientes, estrés hidrodinámico, etc.) el siguiente paso consiste en simular tales condiciones en bioreactores de laboratorio. El simulador desarrollado con este fin, debe ser capaz de reproducir el comportamiento de los tanques de gran escala, ya que en esto radica el exito del escalamiento descendente. En base al conocimiento generado en la etapa de simulación, es posible optimizar el proceso y después trasladarlo a una escala mayor.

2.2.3 Simuladores utilizados en el escalamiento descendente

En la literatura se encuentran reportados diferentes simuladores para evaluar el efecto de gradientes de glucosa y acetato (Neubauer y col., 1995), de pH (Davison y Stephanopoulos, 1986) y más comúnmente, gradientes de TOD (Oosterhuis y col., 1985; Kataoka y col.,1986; Buse y col., 1992 y Träger y col., 1992).

Los simuladores de gradientes de TOD más utilizados consisten en tanques agitados de uno o dos compartimientos (**figura 2-4**). El diseño de los simuladores se han basado en la consideración de que un bioreactor industrial presenta dos zonas que lo caracterizan.

a) Una zona denominada como bien mezclada.

b) La región del macromezclado en donde, debido al consumo de oxígeno por los microorganismos, se presentan zonas anóxicas que pueden resultar críticas.

Al modelo que explica tal comportamiento se le conoce como el modelo de dos compartimientos (**figura 2-5**). El modelo supone una región de micromezclado (físicamente localizada en las inmediaciones del impulsor) en donde se logran tensiones de oxígeno adecuadas para el crecimiento. La región de macromezclado, se refiere a la región originada por el bombeo de los impulsores. De esta forma, la función objetivo (TOD para este ejemplo) resulta ser una distribución normal respecto al tiempo de circulación (Reuss, 1991).

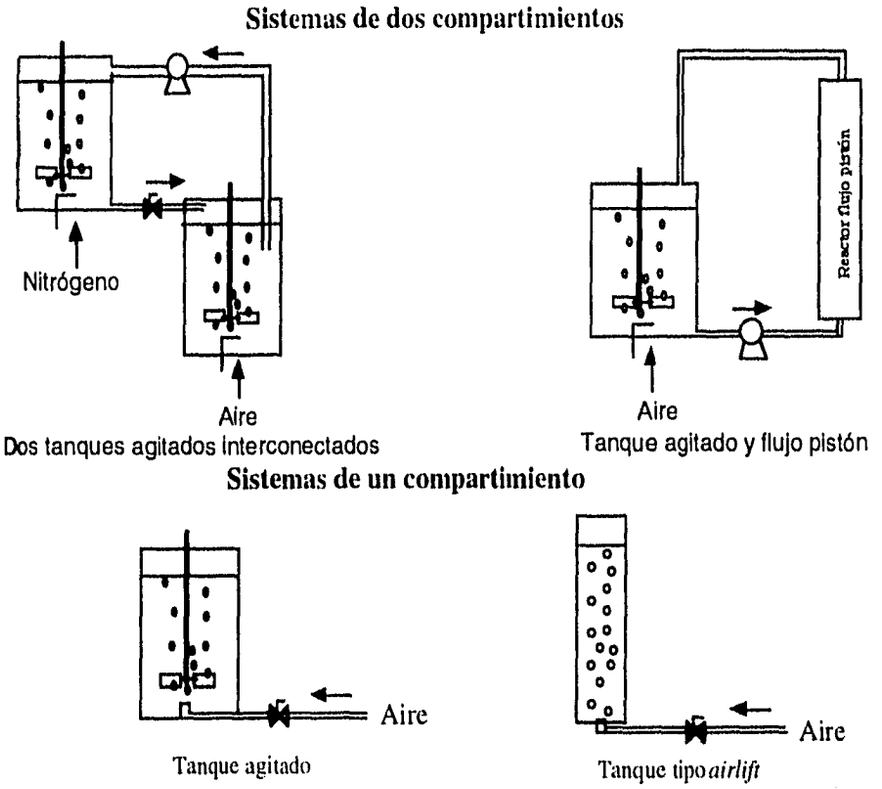


Figura 2-4. Sistemas de laboratorio reportados para la realización experimental de escalamiento descendente.

Sin embargo, el modelo de dos comportamientos no simula completamente el comportamiento de los bioreactores industriales, ya que en realidad se presenta una serie de gradientes de oxígeno disuelto. Un análisis que se aproxima mas a la realidad, es el modelo de multicompartimientos (Reuss, 1991).

Los simuladores de dos compartimientos funcionan mediante la circulación del medio de cultivo en dos tanques agitados e interconectados. A uno de ellos se le suministra aire para simular la región denominada como bien mezclada y al otro se mantiene en condiciones anaerobias mediante burbujeo de nitrógeno (simulando las zonas deficientes de oxígeno). Los tiempos de circulación en estos simuladores, se manipulan mediante la velocidad de circulación del medio de cultivo (Oosterhuis y col., 1985). Una variante consiste en un simulador formado por un tanque agitado (aerobio) y un reactor de flujo pistón (RFP). En estos sistemas, los gradientes se logran mediante el consumo de oxígeno a lo largo del RFP (Larsson y Enfors, 1985).

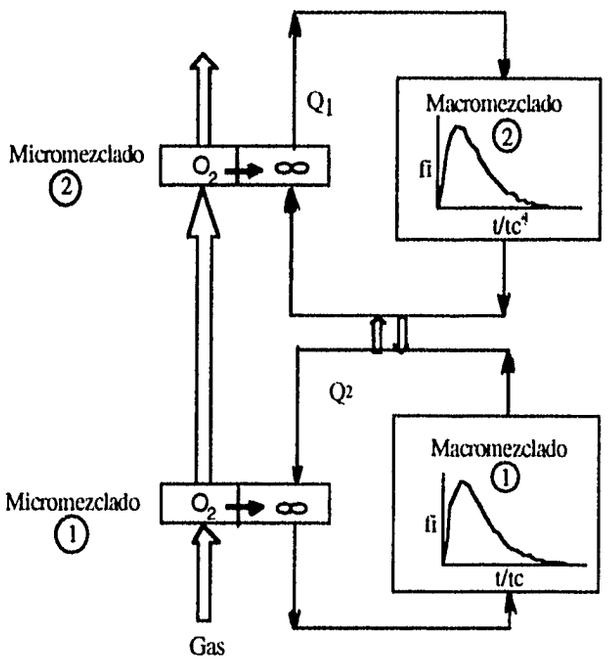


Figura 2-5. Modelo de dos compartimientos para un tanque agitado con dos turbinas rusthon, el esquema muestra las regiones de micromezclado y el macromezclado (Reuss, 1991).

Los simuladores de un compartimiento pueden estar formados por un bioreactor tipo *airlift* (Träger y col., 1991) o por un tanque agitado (Abel y col., 1994). En estos sistemas, las oscilaciones de oxígeno disuelto se logran mediante cambios al azar (Namdev y col., 1993) o bien cambios periódicos (Kataoka y col., 1986) en la presión parcial de oxígeno a la entrada del bioreactor. Dichos cambios pueden ser en forma de ondas cuadradas, triangulares o sinusoidales (**figura 2-6**). Con lo anterior se pretende simular el tránsito de los microorganismos de la zona bien mezclada (cresta de la onda) a las zonas deficientes de oxígeno (valle de la onda).

La **tabla 2-2** resume las ventajas y desventajas que tienen los simuladores de uno y dos compartimientos. Cabe resaltar que la mayoría de los simuladores de un compartimiento reportados son de lazo abierto y muy pocos utilizan control de lazo cerrado (Träger y col., 1991).

Un sistema con control de lazo cerrado para TOD, es aquel que cuenta con un sensor de TOD para monitorear el estado del proceso, el valor obtenido se compara con un valor predeterminado

(*setpoint*) y en caso de ser necesario, se corrige mediante la acción de actuadores (agitación, válvulas de aire, controladores de flujo másico, etc.). Por el contrario, en los sistemas de lazo abierto para TOD, se establece un perfil en los actuadores y la señal (TOD) es únicamente monitoreada.

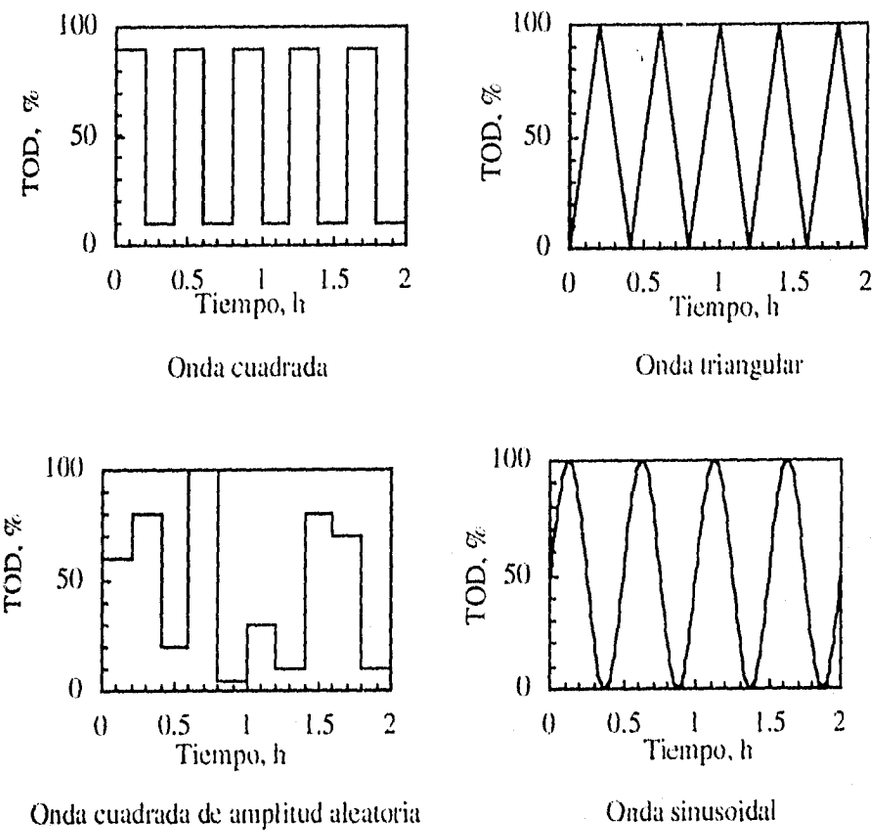


Figura 2-6. Tipos de ondas utilizadas en la metodología del escalamiento descendente.

2.2.4 Trabajos reportados utilizando fluctuaciones de TOD

Con la finalidad de conocer el comportamiento o "desviaciones" metabólicas que pudiesen presentarse como consecuencia del mal mezclado, varios autores han evaluado el comportamiento de diferentes procesos ante las fluctuaciones de oxígeno que se presentan a escala industrial.

Sistema	Configuración	Microorganismo	Ventajas	Desventajas	Referencia
Un compartimiento	Tanque Agitado	*P. aeroginosa*	-Fácil operación -Bajo costo -Un solo tanque	-Lazo abierto -Un solo tc -Altos esfuerzos de corte -Limitación por k_La	Kataoka y col., 1986
		E. coli	-Fácil operación -Bajo costo -Un solo tanque -Lazo cerrado	-Altos esfuerzos de corte -Limitación por k_La -Un solo tc	Este trabajo
	Airlift	*A. niger*	-Fácil operación -Bajo costo -Un solo tanque -Lazo cerrado	-No logra perfiles por debajo de 10 % TOD -Un solo tc -Limitación por k_La	Träger y col., 1991
Dos compartimientos	Dos tanques agitados	*B. subtilis*	-Varios tc	-Cambio escalón -Altos esfuerzos de corte -Doble equipo	Amanullah y col., 1992
	Tanque agitado y Flujo pistón	*S. cerevisiae*	-Varios tc	-Cambios escalonados -Altos esfuerzos de corte -Doble equipo	Abel y col., 1994

Tabla 2-2. Ventajas y desventajas de los simuladores de gradientes de TOD reportados en la literatura.

Kataoka y col. (1986) diseñaron un sistema para simular los gradientes de presión y de concentración de oxígeno disuelto de los reactores de columna, utilizados para el tratamiento de aguas. El sistema consistió en un tanque agitado sometido a cambios periódicos (ondas triangulares) en la presión de los gases a la entrada del reactor (períodos de onda de 1- 10 min y presión total de 1 a 6 atm). Como modelo biológico utilizaron una *Pseudomona aeruginosa*. Sus resultados mostraron que al aumentar la concentración de oxígeno disuelto de 10 a 70 ppm, el rendimiento celular y la velocidad específica de crecimiento decrecieron de 0.4 a 0.15 g/g y de 0.52 a 0.15 h^{-1}, respectivamente. Concluyeron que el rendimiento solo fue afectado a períodos menores a 4 min y la velocidad específica de consumo de glucosa no fue afectada por el período de oscilación.

Träger y col. (1991) desarrollaron un simulador de gradientes de TOD utilizando un reactor tipo *airlift* controlado por un algoritmo proporcional integral derivativo (PID). Como instrumento de medición, utilizaron dos electrodos, uno con constante de tiempo (τ_E) de 18 s y otro con τ_E= 3 s.

Probaron el equipo en agua y en cultivos de *A. niger* y encontraron que resultaba mas difícil lograr perfiles oscilatorios en los cultivos, debido al consumo de oxígeno por parte de los microorganismos. Los autores lograron oscilaciones reproducibles a ejes de oscilación de 100 % y amplitud de 60 % TOD. El período utilizado fue de 160 s. Sin embargo, no lograron fluctuaciones por debajo de 10 % TOD. Para subsanar la limitación, propusieron un sistema de lazo abierto en donde la ecuación sinusoidal fue incorporada en el flujo de oxígeno a la entrada del bioreactor. La nueva configuración resultó más adecuada que el control de lazo cerrado para generar fluctuaciones por debajo de 10 % TOD. El sistema previamente optimizado, se utilizó para evaluar el efecto de la TOD oscilante sobre la producción de ácido glucónico por *A. niger* . Los resultados mostraron que la velocidad máxima de producción se afectó solo a perfodos de 200 s, no así a 90 y 140 s. En cuanto al crecimiento celular, los parámetros evaluados (fase lag, biomasa obtenida al final de la fase exponencial y velocidad específica de crecimiento) no fueron afectados por las oscilaciones en la TOD (Träger y col., 1992).

Amanullah y col. (1992), describieron la utilidad de un sistema de dos compartimientos interconectados entre sí. Uno de los compartimientos fue burbujeado con aire, simulando la zona del reactor considerada como bien mezclada, y otro reactor en donde se eliminaba el oxígeno con nitrógeno (simulando las zonas muertas). El sistema fue utilizado para evaluar el efecto de las fluctuaciones de oxígeno sobre la producción de butanodiol por *Bacillus subtilis*. Probaron tiempos de circulación de 20 a 300 s mediante la manipulación del flujo del caldo de cultivo entre los dos compartimientos. Sus resultados mostraron que la biomasa y la velocidad específica de crecimiento disminuían conforme aumentaba el tiempo de circulación. Sin embargo, la concentración de acetoína y butanodiol aumentaban, favoreciéndose más este último (Amanullah y col. 1993).

Abel y col. (1994) diseñaron un simulador de TOD utilizando un tanque agitado en donde las oscilaciones de TOD se lograban mediante la manipulación de la composición de los gases a la entrada del reactor. El simulador contaba además con un reactor de flujo pistón, para simular diferentes t_c. Con tal equipo, los autores estudiaron el efecto de las fluctuaciones de TOD sobre la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*, a diferentes tiempos de retención en el reactor de flujo pistón. Encontraron que al aumentar el tiempo de residencia de 1 a 5 min, la biomasa y el rendimiento celular por unidad de glucosa no se afectaron, sin embargo, la máxima concentración de etanol tendió a aumentar. Por el contrario, el rendimiento celular por unidad de etanol disminuyó de 0.46 a 0.38 g_{cel}/g_{etanol}.

Suphantharika y col. (1995), evaluaron el efecto de las oscilaciones de TOD en la producción de difícidina en cultivos por lote de *Bacillus subtilis*. Las oscilaciones de TOD se obtuvieron mediante la manipulación de la composición de los gases de entrada a través de válvulas solenoides. Probaron ejes de oscilación de 15, 30 y 40 % y amplitudes de onda de 5 a 10 % de TOD. Los períodos de oscilación del oxígeno en la fase gaseosa fueron de 60 s. La constante de tiempo del electrodo utilizado fue de 14 s. Sus resultados mostraron que al disminuir el eje de la oscilación de 40 a 15 % de TOD, la velocidad volumétrica total de producción de difícidina decreció de 4 a 2.85 mg/L·h. De la misma manera, la biomasa obtenida disminuyó de 4.65 a 3.8 g/L. Los valores obtenidos de velocidad de producción y de biomasa en los cultivos con TOD oscilante, fueron menores que los registrados en cultivos a TOD constante.

Cortés (1995) evaluó el efecto de las oscilaciones de TOD sobre la producción de β-galactosidasa por *Kluyveromyces fragilis*.. Utilizó un algoritmo de control PID y una función sinusoidal para generar los ambientes fluctuantes de TOD. En sus cultivos utilizó un eje de oscilación de 10 %, amplitud de 10 % y períodos de oscilación de 300, 600 y 1200 s. Los experimentos se realizaron en un sistema similar al descrito en este trabajo. Sus resultados mostraron que las oscilaciones probadas no afectaron el rendimiento ni la velocidad específica de crecimiento obtenida en los diferentes cultivos. Sin embargo, la actividad específica de β-galactosidasa tendió a aumentar de 2,020 a 2,790 U/g a medida que el período de oscilación decrecía de 1,200 a 300 s.

Poco se sabe acerca del efecto ocasionado por los gradientes de oxígeno sobre microorganismos manipulados genéticamente. Sin embargo, debido a la gran utilidad que presentan en la actualidad, algunos investigadores han empezado a realizar estudios de escalamiento descendente con microorganismos recombinantes.

Caunt y col., (1990) realizaron cultivos continuos a TOD oscilante con *S. cerevisiae* YN124/pLG669-Z para producir β-galactosidasa. Las oscilaciones de TOD se lograron mediante la manipulación con oscilaciones cuadradas de la composición de los gases a la entrada del reactor. Encontraron que, en la ausencia de cambios cíclicos, la fracción de células conteniendo plásmido disminuyó de 0.6 a 0.4, después de 60 generaciones. Por otra parte, los cultivos con TOD oscilante mostraron una población en donde la fracción celular conteniendo plásmido permaneció constante en 0.6, casi por 100 generaciones. Concluyeron que la estabilidad del plásmido, que mejoró bajo condiciones de TOD oscilante, estaba íntimamente relacionada con la velocidad específica de crecimiento. De tal forma que al oscilar el oxígeno

disuelto, la velocidad específica de crecimiento presenta también un comportamiento oscilatorio. Los autores propusieron que la generación de fluctuaciones de TOD puede ser utilizada como una herramienta para estabilizar cepas recombinantes.

Namdev y col., (1993) evaluaron el efecto de las fluctuaciones sobre la producción de β-galactosidasa por *E. coli* Dh5α/pUC19. El período de las fluctuaciones fue seleccionado por un algoritmo de elección al azar, denominado como "Monte Carlo", que utiliza una función logaritmo de distribución normal (media de 20 s y desviación estándar de 8.9 s), lo anterior para simular t_c de 8 a 44 s. El equipo funcionaba de la siguiente manera: una vez seleccionado el t_c, el sistema burbujeaba aire por 5 s y luego suprimía la aireación por el mismo tiempo. Sus resultados mostraron que los niveles de biomasa alcanzados al final del cultivo, fueron similares a los obtenidos en cultivos control (cultivos con aireación constante). Sin embargo, la fase de crecimiento exponencial fue ligeramente mayor en los cultivos con fluctuaciones. No encontraron efecto sobre la actividad de β-galactosidasa, a pesar de que el plásmido se amplificaba en los experimentos con aireación continua. Concluyeron que la amplificación del plásmido, sin obtener un incremento en la actividad enzimática, pudo deberse a una α-complementación que resultó el paso limitante en la obtención de actividad enzimática. La falta de amplificación en los cultivos con fluctuaciones sugirió que el oxígeno pudo regular la expresión del plásmido.

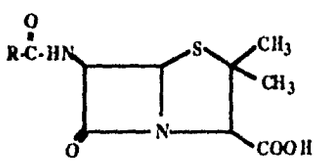
Hopkings y col., (1987) evaluaron el comportamiento de cultivos de *E. coli* /pKN401 sometidos a choques de oxígeno disuelto mediante la interrupción de la aireación. Encontraron que las células recombinantes fueron altamente inestables a las perturbaciones a las que fueron sometidas.

Cabe enfatizar que los trabajos discutidos anteriormente, son todos los que se han reportado en donde el microorganismo utilizado contenga DNA recombinante. Así mismo, hasta la fecha no se han establecido mecanismos que expliquen la interacción entre el oxígeno disuelto y la estabilidad de plásmidos recombinantes (Namdev y col., 1993). A la fecha, no hay reportes en donde se evalúe el efecto de ambientes de TOD oscilante sobre la producción de la PA.

2.3 Modelo de estudio: la penicilino acilasa

2.3.1 Penicilinas semisintéticas

Las penicilinas G y V (**figura 2-7**) son antibióticos naturales producidos por diferentes especies de *Penicillium sp.* y fueron de los primeros antibióticos utilizados en el tratamiento de enfermedades bacterianas. Sin embargo, con el tiempo fueron apareciendo cepas resistentes al antibiótico (cepas con actividad β-lactámica) y la penicilina perdió eficacia en el campo de la medicina. El descubrimiento de que la actividad bactericida se debe a una estructura en común, el ácido 6-amino penicilánico (6-APA), sugirió la posibilidad de crear moléculas con modificaciones en las cadenas laterales de la penicilina G y así generar moléculas que no fuesen sustrato fácil de hidrolizar por las β-lactamasas. A este tipo de penicilinas modificadas se les conoce como penicilinas semisintéticas.



Cadena lateral (R)	Nombre
$C_6H_5CH_2$-	Penicilina G
$C_6H_5OCH_2$-	Penicilina V

Figura 2-7. Estructura de las penicilinas naturales.

La materia prima para la elaboración de los nuevos antibióticos es el núcleo de 6-APA. Este compuesto se puede obtener por síntesis orgánica, sin embargo, el proceso químico para la generación de 6-APA no resulta atractivo por su complejidad. En contraste, a partir del descubrimiento de la penicilino acilasa de *Penicillium chrysogenum* , fue posible la producción de 6-APA por métodos enzimáticos.

2.3.2 Penicilino acilasa

La enzima penicilino acilasa (PA) o penicilino aminohidrolasa (EC 3.5.1.11) cataliza la hidrólisis de la penicilina G o V liberando como productos 6-APA y ácido fenilacético (**figura 2-8**).

La PA es producida por una gran variedad de hongos filamentosos, levaduras y bacterias, siendo la de *Escherichia coli* de las más estudiadas (Duggleby y col., 1995).

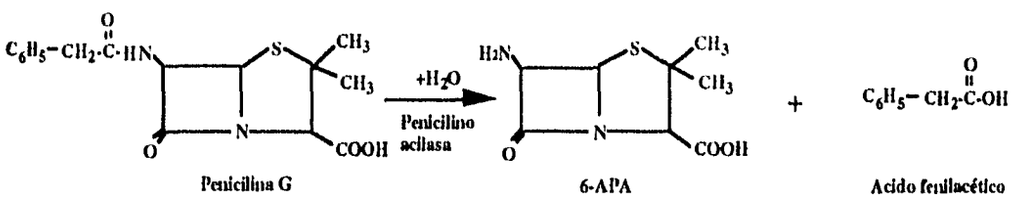


Figura 2-8. Obtención de 6-APA por vía enzimática.

La expresión *in vivo* de la PA de *E. coli* es regulada por la temperatura y por el ácido fenilacético (AFA), por lo cual se piensa que participa en la incorporación de compuestos aromáticos para ser utilizados como fuente de carbono por el microorganismo en vida libre (Burlingame y Chapman, 1983).

2.3.3 Biología molecular de PA proveniente de *E. coli*

La PA es una proteína heterodimérica (αβ) localizada en la región periplásmica de la bacteria (**figura 2-9**). La forma activa se obtiene después de una serie de modificaciones post-traduccionales en el polipéptido precursor. A este proceso se le conoce como maduración. Los cortes proteolíticos ocurren de la siguiente manera:

1. Escisión del péptido señal (26 aminoácidos) que direcciona a la proteína al espacio periplásmico (Schumacher y col, 1986).

2. Escisión del péptido conector (54 aminoácidos) de las subunidades α y β, que participa en el plegamiento (*folding*) de la proteína (Daumy y col., 1985a, Daumy y col., 1985b y Sizmann y col., 1990).

Las modificaciones post-traduccionales son regularmente encontradas en sistemas eucariotes y en virus de animales, pero raramente encontrados en microorganismos procariotes (Oliver y col., 1985).

Se ha reportado que el proceso de maduración del precursor de PA puede ser bloqueado cuando el crecimiento de la bacteria se realiza a temperaturas superiores a 30°C (Schumacher y col., 1986), por el contrario, la acumulación del precursor puede ser favorecido por la adición de sustratos no metabolizables como sacarosa o glicerol (Scherrer y col., 1994). De tal forma que

el proceso de maduración puede llegar a ser el paso limitante para la sobreproducción de PA por *E. coli* recombinante (Choi y col., 1992).

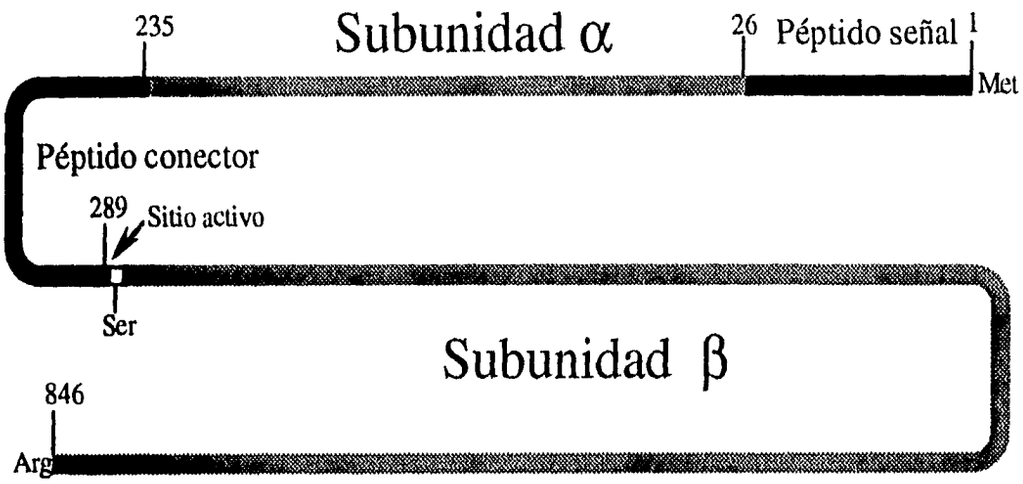


Figura 2-9. Precursor de la penicilino acilasa (modificado de Sizmann y col., 1990).

El centro catalítico de la PA está formado por un solo aminoácido, la serina. Se sabe que la sustitución de la serina del sitio catalítico por cisteina, inactiva la enzima (Slade y col., 1991) mientras que la sustitución por arginina, treonina o glicina, además de inactivar a la enzima, evitan el procesamiento post-traduccional (Choi y col., 1992).

La síntesis de PA de cepas nativas de *E. coli* es inducida por el ácido fenilacético (AFA) y catabólicamente reprimida por glucosa, fructosa, lactosa y glicerol (Schewale y Sivaraman, 1989). Dichas características resultan poco atractivas para la utilización de ese tipo de cepas, pues es bien conocido que el AFA inhibe el crecimiento de la bacteria y la represión catabólica por azúcares, evita la utilización de estas sustancias como fuente de carbono. De aquí la importancia de construir cepas recombinantes en donde la inducción pueda ser controlada de una forma más adecuada (Schümacher y col, 1986).

El gene que codifica para la PA se le conoce como gene *pac*. La expresión de este gene puede estar regulada por la temperatura (Robas y col., 1993), niveles de oxígeno (Shewale y Sivaraman, 1989), glucosa (Schömer y col., 1984) y ácido fenilacético (Robas y col., 1993).

2.3.4. Producción de PA

La gran importancia comercial de la PA se evidencía en que el catalizador ocupa el segundo lugar de venta de enzimas inmovilizadas a nivel mundial, con un mercado de 6 millones de dólares anuales (Ospina y col., 1992). Con la finalidad de satisfacer la demanda del catalizador, se han desarrollado estrategias de cultivo, como el uso de cultivos continuos (Lee y Chang, 1988), cultivos en reactor con recirculación o de semiperfusión (Lee y Chang, 1990) y cultivos en lote exponencialmente alimentados (Ramírez y col., 1994a). La biología molecular, por su parte, propone el uso de microorganismos recombinantes como una alternativa adicional para obtener cepas hiperproductoras (Schewale y Sivaraman, 1989; Bhattacharya y col., 1993 y Ramírez y col., 1994b). La **tabla 2-3** muestra un resumen de algunos de los procesos de producción de PA reportados en la literatura.

Sin embargo, para satisfacer la demanda de PA, se requieren cultivos de gran volumen en donde la formación de gradientes es inevitable.

Proceso	Cepa	Actividad $U/mg_{cel.}$	Productividad $U/g_{cel.} \cdot h$	Reactor (volumen)	Referencia
B	ATCC 11105	0.11	9.20	TA (10 L)	Gebauer y col., 1987
B	ATCC 11105	0.11	13.8	AL (60 L)	Gebauer y col., 1987
P	HB101/pPAKS2	6.00†	17.7†	RRM(0.5L)	Lee y Chang, 1990
B	DH 5/pUSAD2	0.08	2.70	TA (0.5 L)	Bhattacharya y col., 1993
FB	JM101/pPA102	2.00*	13.9**	TA (2 L)	Ramírez y col., 1994a
B	JM101/pPA102	0.10	8.30	TA (1-2 L)	Ramírez y col., 1994b

*:U/mg proteína, **:U/g proteína, †: µmol/h, B: Lote, FB: Lote alimentado, P: Perfusión, TA: Tanque agitado, AL: *Airlift*, RRM: Reactor reciclado con membrana.

Tabla 2-3. Algunos procesos de producción de PA.

Capitulo III

Objetivos

Objetivo general

Diseñar y caracterizar un sistema de un compartimiento con control retroalimentado, para simular gradientes de oxígeno disuelto. Aplicar el simulador en el proceso de producción de penicilino acilasa por *Escherichia coli* recombinante.

Objetivos específicos

Para el simulador

1. Diseñar y caracterizar dinámicamente el simulador de gradientes de TOD.

2. Seleccionar las condiciones operacionales y el perfil predeterminado más adecuado, para la generación de perfiles oscilatorios de oxígeno disuelto.

Para el modelo biológico

1. Realizar cultivos a tensiones de oxígeno disuelto constante y oscilante, y evaluar su efecto sobre:

a) La velocidad específica de crecimiento.

b) El rendimiento celular.

c) La producción de penicilino acilasa.

d) La generación de otros metabolitos.

2. Evaluar el efecto del pH, concentración de acetato y de la tensión de oxígeno disuelto sobre la maduración del precursor de penicilino acilasa durante la fase estacionaria.

Capitulo IV

Materiales y métodos

4.1 Diseño del simulador

El sistema experimental consistió de dos componentes principales: el bioreactor y el sistema computarizado de control, despliegue y adquisición de datos (SCAD).

4.1.1 Sistema de fermentación

El simulador está constituido por un bioreactor de 1 litro (Virtis) con soporte (Omniculture), mediante el cual fue posible manipular la velocidad de agitación y controlar la temperatura del medio de cultivo. El bioreactor fue equipado con 2 turbinas Rushton (Di/D=0.5) de seis paletas planas y la aireación fue mediante burbujeo a través de un difusor de 5 orificios de *ca.* 1 mm de diámetro. Las corrientes de los gases, tanto a la entrada como a la salida del fermentador, fueron filtradas a través de membranas (Millipore) de 0.2 µm de poro.

El oxígeno disuelto se midió con un electrodo polarográfico (Ingold) y el pH a través de un electrodo de vidrio (pHoenix), ambos esterilizables. El oxígeno disuelto en todos los casos se reportó como porcentaje de saturación con respecto al aire en agua a 29 °C y aproximadamente 0.85 atm. de presión. La señal de los electrodos se amplificó en el intervalo de 0 a 5 VCC (amplificadores Ingold) y se adquirió en una computadora Macintosh II SI a través de los convertidores análogos/digitales (A/D) de una tarjeta de interfase Mac ADIOS APO (GW Instruments).

A través de un algoritmo de control, descrito en detalle más adelante, las señales adquiridas se almacenan en disco duro y se despliegan en línea sobre la pantalla de la computadora, tanto en forma gráfica como en forma numérica. Los valores así adquiridos son procesados y las variables secundarias son calculadas, mediante las cuales se toma la acción de control para mantener el oxígeno disuelto en el valor deseado. Tal acción de control se toma mediante señales analógicas enviadas por la tarjeta de interfase a través de los convertidores digitales/analógicos (D/A) a dos controladores de flujo másico (Brooks): uno para nitrógeno y otro para oxígeno, ambos de una capacidad de 1,000 ml/min (0 a 5 VCC).

El pH se controló a 6.9 ± 0.2, mediante una subrutina "*On/Off*" (prendido/apagado) usando soluciones de NaOH 2 N y de H_2SO_4 2 N, dosificadas a través de dos bombas peristálticas (Cole Parmer) conectadas a relevadores (Opto-22). El sistema de control acciona los relevadores a través de canales de salida digital (+ 5 VCC), los cuales convierten la señal digital de la computadora a 120 VCA, resultando en el encendido o apagado de las bombas. La **figura 4-1** muestra un esquema global del sistema de fermentación.

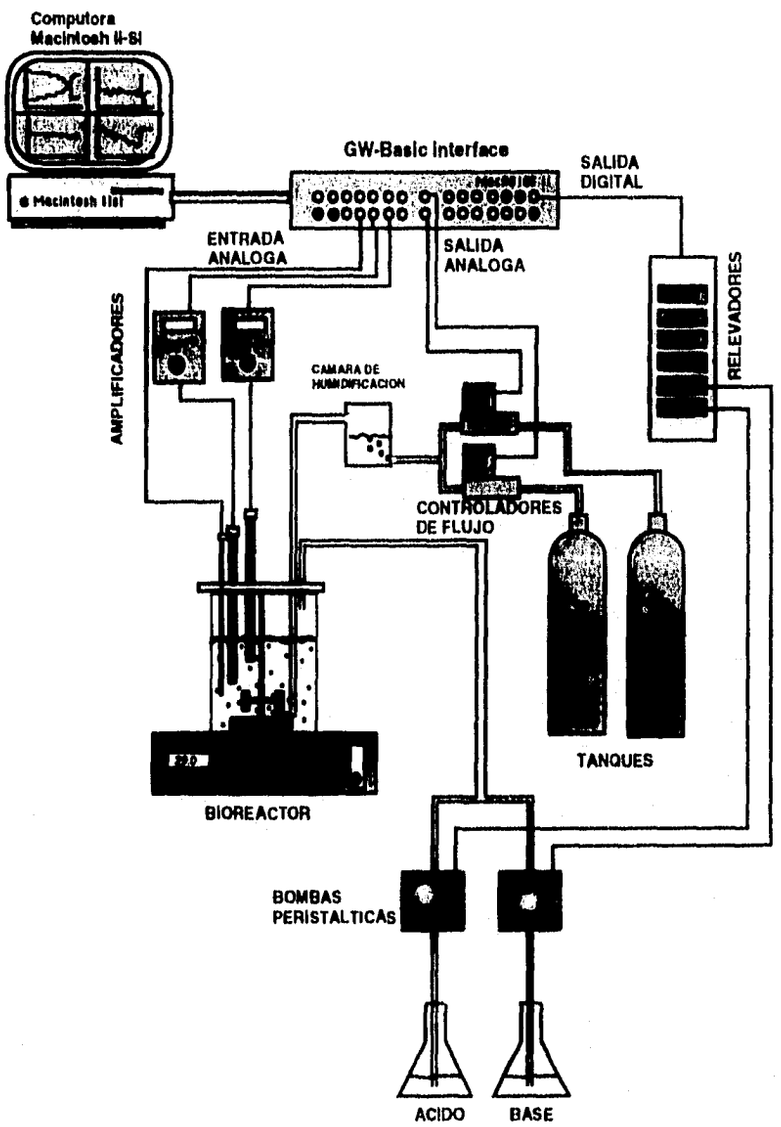


Figura 4-1. Esquema del sistema de control y adquisición de datos (Aguilar-Aguila y col., 1993).

4.1.2 Programa de control

El componente central para el funcionamiento del simulador es el programa de control, escrito en Microsoft Quick-Basic. El programa fuente (escrito y detallado por Aguilar-Aguila y col. (1993)), fue modificado y adaptado para las necesidades del proyecto. El listado del programa resultante se muestra en el **apéndice B**. La primera parte del programa, consiste en la introducción de los datos de fermentación y control, proporcionados por el usuario, y en la inicialización de parámetros necesarios (*i.e.*, cronómetros y contadores para el tiempo de control y el tiempo de adquisición de datos). Enseguida se llevan a cabo el resto de las subrutinas, cada una con una función determinada: controlar, leer, desplegar o almacenar datos.

La subrutina de control de TOD se basa en un algoritmo retroalimentado proporcional-integral-derivativo (PID) cuyo diagrama de bloques se muestra en la **figura 4-2**. De esta forma, en la computadora se compara el valor de oxígeno disuelto deseado (*setpoint* o punto de control) con la lectura proporcionada por el sensor (elemento de medición). De acuerdo a esta diferencia o "error" se establece la acción de control sobre el proceso fermentativo. De esta manera los controladores de flujo másico actúan aumentado o disminuyendo los flujos individuales de oxígeno y de nitrógeno (variables manipuladas), para cambiar la composición del gas de alimentación, pero manteniendo el flujo total constante.

El programa utiliza la forma discretizada del control PID dada por la ecuación 4-1.

$$O_2\% = O_2\%_{n-1} + Kc\left[\left(1+\frac{\phi}{\tau_i}+\frac{\tau_d}{\phi}\right)E_n - \left(1+\frac{2\tau_d}{\phi}\right)E_{n-1} + \left(\frac{\tau_d}{\phi}\right)E_{n-2}\right] \qquad (4\text{-}1)$$

Donde:

$O_2\%$ = % flujo de oxígeno actual
$O_2\%_{n-1}$ = % flujo de oxígeno anterior
ϕ = tiempo de control
Kc = constante proporcional
τ_i = constante integral
τ_d = constante derivativa
E_n = error actual
E_{n-1} = error anterior
E_{n-2} = error anterior a dos tiempos

Las constantes de control (Kc, τ_i, τ_d), se determinaron a través de métodos de afinación convencionales (descritos en la sección 4.2.5) y se fijaron al inicio de los experimentos. Cuando era necesario, se modificaban en línea durante el transcurso del experimento.

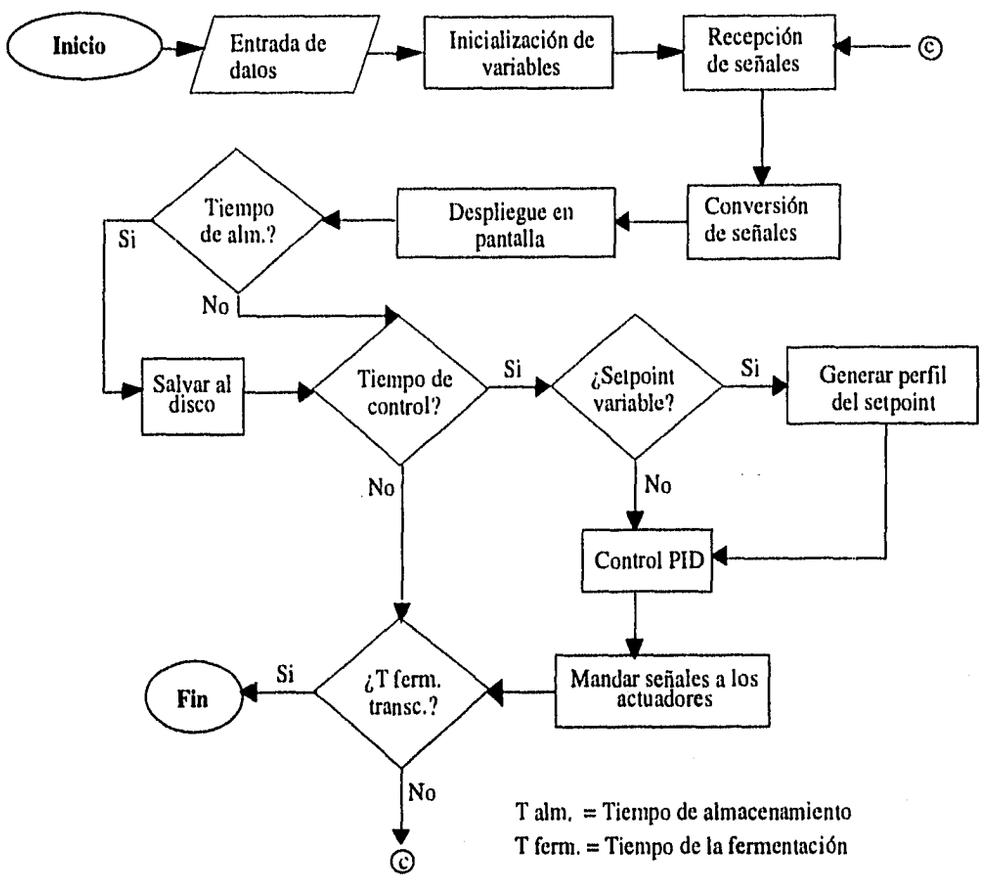


Figura 4-2. Diagrama de flujo del programa de control.

4.2 Caracterización del simulador

4.2.1 Determinación de la constante de tiempo del electrodo de TOD

Para determinar la constante de tiempo del electrodo, se midió la respuesta transitoria en función del tiempo, al pasar rápidamente el electrodo de un matraz con agua previamente deaireada con nitrógeno (0 % TOD), a otro con agua aireada y con agitación (100 % TOD), tal y como se esquematiza en la **figura 4-3**. A partir de la curva de respuesta, la constante de

tiempo se tomó como el tiempo necesario para obtener el 63.2 % de la respuesta del electrodo (sección A.1.2).

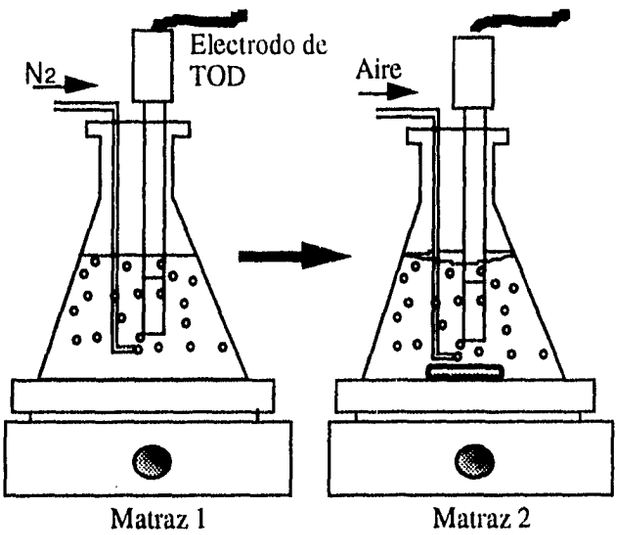


Figura 4-3. Arreglo experimental para la determinación de la constante de tiempo del electrodo de TOD.

4.2.2 Determinación de la constante de tiempo del sistema de fermentación

A diferencia del método para determinar la constante de tiempo del electrodo, en este caso no se cambia súbitamente de 0 a 100 % TOD. La técnica consiste en desorber el oxígeno con nitrógeno hasta 0 % TOD. Enseguida se renueva la aireación o bien se da un cambio escalonado en el flujo de oxígeno y se mide la respuesta transitoria de la variable de salida (TOD), hasta que se alcance un nuevo estado estacionario. La constante de tiempo se tomó como el tiempo necesario para alcanzar el 63.2 % de la respuesta final (sección A.1.3).

4.2.3 Respuesta del simulador a cambios escalonados en la variable de entrada

El estudio consistió en cambios escalonados en el flujo de oxígeno de 10 % de magnitud, y obtener la curva de reacción del proceso. Se utilizó medio de cultivo libre de células. El experimento se realizó probando velocidades de agitación de 100 a 850 rpm y flujo total de gases de 0.6 y 1.0 vvm. De la curva de reacción del proceso, se midió el tiempo muerto (Td), definido como el tiempo que tarda el sistema en responder ante la perturbación a la que fue sometido, la velocidad máxima de respuesta (VRS) y la constante de tiempo del sistema (τs).

4.2.4 Respuesta del simulador a cambios sinusoidales en el flujo de oxígeno a la entrada

El estudio consistió en someter al simulador a cambios sinusoidales en el flujo de oxígeno (variable de entrada) y obtener la respuesta en el oxígeno disuelto (variable de salida). Se utilizó agua a 29°C, flujo total de gases a la entrada de 600 cm^3/min y 600 rpm de agitación. La señal de salida (TOD) fue registrada en función del tiempo y comparada con la función seno de la entrada.

4.2.5 Determinación de las constantes de control

La determinación se realizó a través el método de la curva de reacción del proceso. El método consiste en someter el sistema a cambios escalonados en la variable de entrada (flujo de O_2) y medir la respuesta transitoria de la variable medida (TOD). Una curva de reacción del proceso típica se muestra en la **figura 4-4**. Para estimar el valor de las constantes se utilizó el criterio de Ziegler-Nichols (Bushell, 1988) para control PID, las cuales se definen como:

$$Kc = \frac{1.2}{T_d \cdot S^*} \tag{4-2}$$

$$\tau_i = 2 \cdot T_d \tag{4-3}$$

$$\tau_d = \frac{T_d}{2} \tag{4-4}$$

$$S^* = \frac{VRS}{M^0} \tag{4-5}$$

donde:

VRS = pendiente de la recta tangente en el punto de inflexión de la curva de reacción del proceso.

T_d= tiempo en el que la tangente intercepta a la recta del estado cuasiestable de la variable medida (% de TOD) de la curva de reacción del proceso.

M^0= magnitud del cambio de la variable manipulada (flujo de O_2).

Los cambios escalonados en el flujo de O_2, se realizaron en las tres fases de crecimiento celular (fase lag, exponencial y estacionaria). Las condiciones de cultivo fueron: aireación de 600 cm^3/min, 500 rpm de agitación , temperatura de 29°C y pH 7.0.

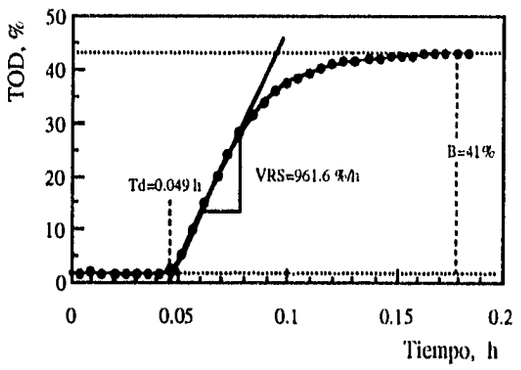


Figura 4-4. Curva típica de reacción del proceso.

El valor de la pendiente en el punto de inflexión (VRS), se obtuvo graficando la relación del incremento en TOD y el incremento en tiempo *vs* tiempo.

4.2.6 Generación de perfiles oscilantes de TOD

El programa de control descrito anteriormente, tiene la opción de fijar -en forma predeterminada- el perfil de oxígeno disuelto que se desea en la fermentación. Con el fin de obtener oscilaciones de TOD, se probaron perfiles predeterminados sinusoidales y cuadrados mediante la incorporación de subrutinas con la ecuación sinusoidal o bien algoritmos para generar ondas cuadradas. Para evaluar el comportamiento de la respuesta ante tales perfiles oscilatorios, se realizaron corridas del programa de control en igualdad de condiciones de operación y de control enumeradas en las **tablas 4-1 y 4-2**, respectivamente. El experimento se realizó en medio de cultivo libre de células y utilizando mezclas de aire-nitrógeno.

Para el perfil sinusoidal, el punto de control de TOD se calculó por medio de la siguiente ecuación sinusoidal:

$$TOD = E + A\,Sen\left(\frac{2\pi t}{\Omega}\right) \qquad (4\text{-}6)$$

Para el perfil cuadrado el algoritmo utilizado fue:

$$\begin{aligned} 0 \le t < \frac{\Omega}{2} &\Rightarrow TOD = E + A \\ \frac{\Omega}{2} \le t < 2\frac{\Omega}{2} &\Rightarrow TOD = E - A \\ 2\frac{\Omega}{2} \le t < 3\frac{\Omega}{2} &\Rightarrow TOD = E + A \end{aligned} \qquad (4\text{-}7)$$

etc.

donde:

A	Amplitud de la onda (%TOD)
E	Eje de oscilación (% TOD)
Ω	Período de oscilación (s)
T	Tiempo de fermentación (s)
π	3.1416

Variable de operación	Valor
Agitación	500 rpm
Aireación	0.6 vvm
Temperatura	29°C
Presión	30 psi

Tabla 4-1. Condiciones de operación

Constantes de control	Valor
Ganancia	2.5
Cte. integral	77 s
Cte. derivativa	51.8 s
Tiempo de control	20 s
Tiempo de adquisición	10 s
Eje	2.5 %
Amplitud	2.5 %
Período	400 s

Tabla 4-2. Condiciones de control

4.3 Proceso de producción de penicilino acilasa

4.3.1 Microorganismo

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* JM101 transformada con el plásmido pPA102 (Merino, 1992). El plásmido contiene un gene que le confiere a *E. coli* resistencia a kanamicina y también el gene de la enzima penicilino acilasa, denominado *pac*. La síntesis de la enzima

está regulada por el promotor *Lac* Z (**figura 4-5**). Esto permite la inducción exógena, utilizando análogos de la lactosa como el isopropil-tio-β-D-galactopiranósido (IPTG). Merino (1992), reporta con detalle la construcción del vehículo molecular.

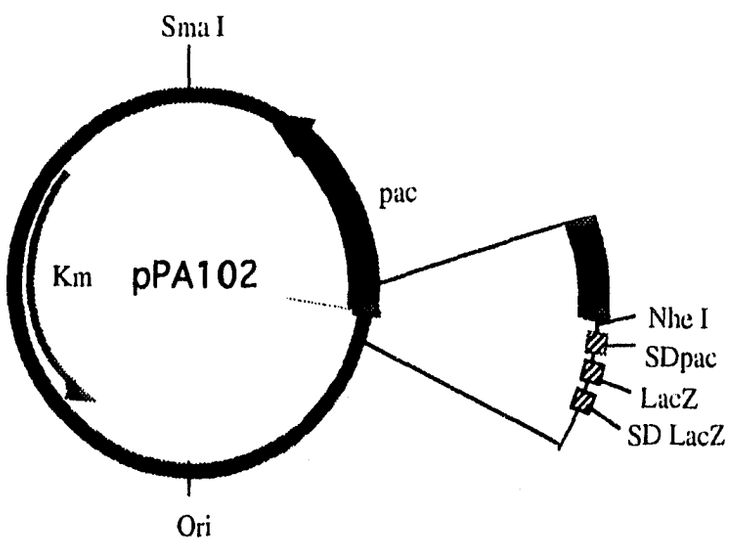


Figura 4-5. Mapa genético del plásmido pPA102 (Merino, 1992).

4.3.2 Medios de cultivo

Los medios para conservación y para cultivo en bioreactor se prepararon como se describe en las **tablas 4-3, 4-4 y 4-5**, respectivamente.

Reactivos:	g/L
NaCl (Baker)	10.0
Bactotriptona (Difco)	10.0
Extracto de levadura (Difco)	5.0
Kanamicina (Sigma)*	35.0 mg/L

Tabla 4-3. Medio Luria

Reactivos:	g/L
NaCl (Baker)	10.0
Bactotriptona (Difco)	10.0
Extracto de levadura (Difco)	5.0
Bacto-Agar (Difco)	15.0
Kanamicina (Sigma)*	35.0 mg/L

Tabla 4-4. Agar Luria

Reactivos :	g/L
Glucosa (Baker)	5.0
$(NH_4)_2HPO_4$ (Baker)	3.5
KH_2PO_4 (Baker)	3.5
$MgSO_4.7H_2O$ (Baker)	1.0
Tiamina (Sigma)*	4.0 µg/L
Kanamicina (Sigma)*	35 mg/L
Solución de elementos traza*	3.0 ml/L
IPTG* (Sigma)	25 µM

Tabla 4-5. Medio BSg

El medio de cultivo designado como BSgl, se prepara adicionando 5.0 g/L de extracto de levadura (Difco) al medio BSg.

La glucosa y el sulfato de magnesio deben esterilizarse por separado de las soluciones de fosfato, para evitar la caramelización de la fuente de carbono.

A los medios de cultivo BSg y BSgl se les ajustó el pH a 7.4 con NaOH 10N, y se esterilizaron en autoclave a 120°C por 15 minutos. Los reactivos marcados con un asterisco (*), se agregaron al medio estéril a temperatura ambiente, después de ser esterilizados por filtración (**apéndice C**).

4.3.3 Conservación del microorganismo

La cepa se conservó en liofilizados hasta su uso y se procesó como sigue: se resuspendió el liofilizado en 100 ml de medio Luria y se incubó por 8 h a 29°C y 250 rpm. Una vez crecida la cepa, se estriaron de 5 a 7 cajas con agar Luria, para luego ser incubadas a 29° C por 12 h.

Posteriormente, las cajas Petri se mantuvieron en refrigeración hasta su uso. Al término de un mes, a partir de la fecha de apertura del liofilizado, las cajas fueron desechadas y se repitió el mismo procedimiento.

4.3.4 Inóculos

El inóculo en todos los experimentos consistió en una azada de colonias aisladas de las placas descritas con anterioridad. Se inoculó 100 ml de medio BSgl contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se incubó de 10 a 12 h a 29°C y 250 rpm. La cantidad de inóculo utilizada par los experimentos en reactor, fue la necesaria para obtener una densidad óptica inicial entre 0.2 y 0.3.

4.3.5 Muestreo

Durante el transcurso de los experimentos, se tomaron muestras de 4 ml, las cuales se centrifugaron 10 min a 4,000 rpm en una centrífuga clínica (Dynac II). El sobrenadante se congeló para posteriormente medir glucosa y ácidos orgánicos. El *pellet* de células, se resuspendió en 4 ml de buffer de fosfatos (pH 7.8) y se mantuvo en refrigeración para analizar actividad enzimática (no excedió de 24 h para este análisis).

4.3.6 Métodos analíticos

4.3.6.1 Determinación de biomasa

La densidad óptica de los cultivos se midió en un espectrofotómetro (Beckman DU 650) a 620 nm y posteriormente se correlacionó con una curva estándar (**apéndice D.1**) para reportarse en peso seco (g/L).

Las unidades formadoras de colonias (UFC), se obtuvieron mediante diluciones exponenciales en solución salina y siembra en cajas Petri con agar Luria, con y sin kanamicina, simultáneamente.

4.3.6.2 Determinación de glucosa

Se midió fuera de línea en un analizador YSI modelo 2700 Select Biochemistry Analyzer (Yellow Spring Instrument Co., Inc).

Posteriormente, las cajas Petri se mantuvieron en refrigeración hasta su uso. Al término de un mes, a partir de la fecha de apertura del liofilizado, las cajas fueron desechadas y se repitió el mismo procedimiento.

4.3.4 Inóculos

El inóculo en todos los experimentos consistió en una azada de colonias aisladas de las placas descritas con anterioridad. Se inoculó 100 ml de medio BSgl contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se incubó de 10 a 12 h a 29°C y 250 rpm. La cantidad de inóculo utilizada par los experimentos en reactor, fue la necesaria para obtener una densidad óptica inicial entre 0.2 y 0.3.

4.3.5 Muestreo

Durante el transcurso de los experimentos, se tomaron muestras de 4 ml, las cuales se centrifugaron 10 min a 4,000 rpm en una centrífuga clínica (Dynac II). El sobrenadante se congeló para posteriormente medir glucosa y ácidos orgánicos. El *pellet* de células, se resuspendió en 4 ml de buffer de fosfatos (pH 7.8) y se mantuvo en refrigeración para analizar actividad enzimática (no excedió de 24 h para este análisis).

4.3.6 Métodos analíticos

4.3.6.1 Determinación de biomasa

La densidad óptica de los cultivos se midió en un espectrofotómetro (Beckman DU 650) a 620 nm y posteriormente se correlacionó con una curva estándar (**apéndice D.1**) para reportarse en peso seco (g/L).

Las unidades formadoras de colonias (UFC), se obtuvieron mediante diluciones exponenciales en solución salina y siembra en cajas Petri con agar Luria, con y sin kanamicina, simultáneamente.

4.3.6.2 Determinación de glucosa

Se midió fuera de línea en un analizador YSI modelo 2700 Select Biochemistry Analyzer (Yellow Spring Instrument Co., Inc).

4.3.6.3 Determinación de actividad enzimática

Se realizó a través del método del p-dimetilaminobenzaldehido (PDAB) reportado por Balasingham y col. (1972). El fundamento se basa en medir espectrofotométricamente el color formado por la reacción entre el grupo amino del ácido 6-amino penicilánico (generado por la hidrólisis enzimática de la penicilina G), con el carbonilo del PDAB (**figura 4-6**).

Para el análisis se colocaron 0.9 ml de las muestras en tubos de ensayo de 13 x 100 mm y se incubaron a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 0.1 ml de solución de penicilina G al 20 % en buffer de fosfatos pH 7.8 y se incubaron durante 10 minutos más. A continuación se tomaron 0.2 ml de cada muestra y se transfirieron a tubos para centrífuga, conteniendo previamente 4.8 ml de etanol absoluto (Baker), necesario para detener el avance de la reacción. Se adicionaron 2.5 ml del reactivo de PDAB a cada muestra, se agitaron y se centrifugaron a 4,800 rpm por 10 min. Una vez transcurridos 15 minutos a partir de la adición del PDAB, se midió la absorbancia a 415 nm utilizando como blanco solución buffer de fosfatos procesado de la misma manera que las muestras (**apéndice D.2**).

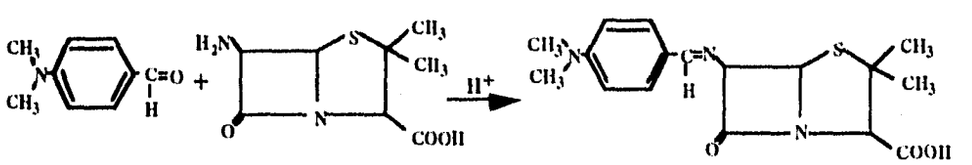


Figura 4-6. Reacción química del 6-APA con PDAB (Balasingham y col., 1972).

Para determinar la actividad enzimática de las muestras se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{Actividad Enzimática} = \frac{(\text{Den.Opt.}-b)(\text{dilución})(1{,}000)}{(m)(216.24)(10)(0.9)} = \left[\frac{\mu\text{moles de 6-APA}}{(\text{ml})(\text{min})}\right] = \left[\frac{U}{\text{ml}}\right]$$

donde:

Den. Opt. = Densidad óptica a 415 nm
m = Pendiente de la curva patrón
b = Ordenada al origen

216.24 = Peso molecular del 6-APA
10 = Tiempo de la reacción en minutos
0.9 = Volumen de la muestra analizada
U = Unidad de actividad enzimática

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce una micromol de 6-APA por minuto.

4.3.6.4 Determinación de ácidos orgánicos

La determinación de ácidos orgánicos se llevó a cabo a través de una técnica de cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC). Se utilizó la columna Fast fruit juice de 150 x 7.8 mm (Millipore), en un sistema de HPLC Waters 625 LC (Millipore) y como detector se empleó un refractómetro diferencial Waters 410. El flujo de la fase móvil (ácido fosfórico al 0.05%) fue de 1 ml/min y la temperatura de la columna de 60°C. Los tiempos de retención de las sustancias probadas se muestran en la **tabla 4-6**.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
A. Sulfúrico	2.20
A. Oxalacético	2.75
A. Fosfórico	3.20
A. Pirúvico	3.30
A. Glucosa	3.32
A. Málico	3.44
A. Succínico	4.13
A. Láctico	4.41
A. Fórmico	4.70
A. 3-Hidroxibutírico	4.77
A. Acético	5.12
A. Propiónico	6.07
Etanol	7.28
A. Butírico	7.54

Tabla 4-6. Tiempos de retención de diferentes compuestos.

Las sustancias detectadas en el medio de cultivo por este método fueron etanol y los ácidos acético, fórmico, succínico y láctico. El área de los picos de los compuestos mencionados fue integrada utilizando el programa Maxima (Millipore) y se correlacionó con la curva estándar correspondiente (**apéndice D.3**), para ser reportados en g/L. Solamente se cuantificó la concentración de los ácidos fórmico y acético, ya que la acumulación de los otros ácidos fue despreciable.

4.4 Necesidad de la presión de selección en cultivos en bioreactor

Namdev y col., (1993) reportaron la necesidad de utilizar presión de selección en el medio de cultivo, para asegurar la homogeneidad de la población recombinante. Con la finalidad de establecer si se puede prescindir de la presión selectiva que ejerce la kanamicina, se realizaron cultivos a 10 % de TOD utilizando medio BSg con kanamicina y se compararon con los cultivos correspondientes, en donde no se utilizó el antibiótico.

4.5 Cultivos por lote a tensión de oxígeno disuelto constante

Se realizaron cultivos por lote utilizando medio BSg sin kanamicina. El oxígeno disuelto se controló en diferentes experimentos a niveles constantes de 0.2, 0.8, 1, 3, 4, 10 y 40 % de TOD. El reactor utilizado fue el descrito anteriormente y el volumen de trabajo fue de 1,000 ml. La temperatura se controló a 29°C, mediante un sistema de termoresistencias acopladas al soporte del reactor y mediante circulación de agua en un intercambiador de calor. El pH se mantuvo controlado a 6.9± 0.2 mediante la adición automática de NaOH 2 N. El flujo total de gases a la entrada fue de 600 cm^3/min. Cuando fue necesario, se adicionó 0.2 ml de solución de antiespumante de silicón (Sigma) al 0.1 %, para controlar la espuma. Las condiciones de operación y las constantes de control iniciales para cada cultivo se muestran en la **tabla 4-7**.

Salvo que se indique lo contrario, los experimentos fueron únicos y par validar la reproducibilidad, se realizaron duplicados de algunos cultivos, mostrados en la **figura F-8** (ubicado en el **apéndice F**).

TOD del cultivo (%)	Agitación (rpm)	Gases utilizados	Kc (-)	τ_i (s)	τ_d(s)
0.0	450	N_2	---	---	---
0.2	230	N_2-aire	20	77	52
0.8	500	N_2-aire	5	77	52
1.0	500	N_2-aire	5	77	52
3.0	200	N_2-O_2	3	190	58
4.0	350	N_2-O_2	4	190	58
10	500	N_2-O_2	1.06	77	52
40	500	N_2-O_2	0.51	77	52

Tabla 4-7. Condiciones operacionales y parámetros de control para los cultivos a TOD constante.

4.6 Cultivos a tensión de oxígeno disuelto oscilante

Se realizaron diferentes cultivos por lote, en medio BSg sin kanamicina, variando el eje de oscilación y la amplitud de la onda, manteniendo constante el período de oscilación a 400 s. Este valor fue tomado, en vista de ser el período más pequeño, al que se puede oscilar con la configuración provista de cámaras de humedad. Las condiciones operacionales de los cultivos se muestran en la **tabla 4-8**. Los cultivos fueron experimentos únicos y para validar la reproducibilidad, se realizó un duplicado del cultivo a TOD oscilante (E = A = 2.5 % TOD y Ω = 400 s) ubicado en el **apéndice G**.

Eje(%)	Amplitud (%)	Gases utilizados
0.5	0.5	N_2-aire
2.5	2.5	N_2-aire
7.5	7.5	N_2-aire
15	5	N_2-O_2
35	5	N_2-O_2

Tabla 4-8. Condiciones operacionales de los cultivos con fluctuaciones de TOD.

En los cultivos a TOD oscilante y TOD constante, en donde se requería trabajar a tensiones por debajo de 10 %, se utilizaron mezclas de nitrógeno-aire con la finalidad de reducir la presión parcial de oxígeno a la entrada del bioreactor y obtener de esta forma controles más estables.

4.7 Estudios de maduración del precursor de PA en fase post-fermentativa

En algunos cultivos se prolongó el muestreo durante la fase estacionaria, a esta etapa se denominó incubación post-fermentativa. Para evaluar el efecto del pH, concentración de acetato y de oxígeno disuelto, sobre el aumento en la actividad específica de PA durante la incubación, se drenó caldo de cultivo al momento del agotamiento de glucosa. Las células recuperadas fueron incubadas bajo diferentes condiciones.

Para evaluar el efecto del pH, las células fueron centrifugadas, lavadas y resuspendidas en buffer de fosfatos pH 6, 7 y 8, respectivamente. Las células se incubaron a 29 °C y con aireación durante toda la noche en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Después de 12 horas a partir del inicio de la incubación, se determinó la concentración celular y la actividad enzimática.

Para la determinar el efecto del acetato sobre la maduración, una muestra de células se lavó y se resuspendió en buffer de fosfatos a pH 7 para eliminar el acetato. A otra muestra de células se le adicionó la cantidad de acetato de sodio necesaria para que la concentración final fuera de 1.7 g/L. Otro ensayo más consistió en células con la concentración de acetato remanente del cultivo. Las muestras se colocaron en matraces de 100 ml y se mantuvieron a 29 °C y con aireación durante toda la noche. Después de 12 horas a partir del inicio de la incubación, se determinó la concentración celular y la actividad enzimática.

Para evaluar el efecto del oxígeno, una fracción del caldo de cultivo se transfirió a matraces Erlenmeyer de 100 ml. Un matraz se mantuvo con atmósfera de nitrógeno (0 % O_2), y el otro con suministro de aire (21 % O_2). El resto del caldo de cultivo permaneció en el bioreactor con un suministro de 9.1 % de O_2. El pH no se controló en el experimento, pero permaneció entre 6.9 ± 0.2 y la temperatura se mantuvo a 29 °C. Después de 12 horas a partir del inicio de la incubación, se determinó la concentración celular y la actividad enzimática. No se utilizó agitación durante los experimentos, dado el bajo volumen de medio de cultivo, la aireación utilizada fue suficiente para homogeneizar la suspensión celular.

Capitulo V

Resultados y discusión

5.1 Caracterización dinámica del sistema de fermentación

5.1.1 Constante de tiempo del electrodo

El éxito de un sistema de control radica en la instrumentación disponible y de las características dinámicas de los mismos. De aquí la importancia de conocer el comportamiento dinámico del sensor de TOD.

Como se discutió en las secciones 4.2.1 y A.1.1, la forma más simple de caracterizar sensores, consiste en someter al electrodo de TOD a un cambio repentino y evaluar la respuesta transitoria obtenida. La **figura 5-1** muestra la curva de respuesta del electrodo de TOD ante un cambio súbito de oxígeno disuelto, así como la forma linealizada de la misma. Se observa que presenta la respuesta característica de los sistemas de primer orden, con una constante de tiempo (τ_ε) de 18 s. El electrodo se ubica entre los sensores denominados "lentos", característica común en los electrodos de TOD de tipo polarográfico (Lee y Tsao, 1979).

En la **tabla 5-1** se compara la constante de tiempo para diferentes electrodos de oxígeno disuelto reportados en la literatura. Se observa que la constante de tiempo reportada para el electrodo Ingold utilizado en este trabajo, es similar a la reportada por Träger y col. (1991) y muy similar a la reportada para otros electrodos polarográficos. Por el contrario, los microelectrodos como el "Orbisphere" y "Kimmich-Kruezer" entre otros, tienen una constante de tiempo mucho menor, sin embargo, no todos son esterilizables. Los microelectrodos se caracterizan por tener una área superficial reducida y una membrana muy delgada. Otros sensores, basados en mediciones de fluorescencia, se caracterizan por ser electrodos muy rápidos. Estos electrodos requieren de fluoróforos como las sales complejas de rutenio, cuya fluorescencia es función de la concentración de oxígeno (Bambot y col., 1994). Los fotosensores de TOD, representan una alternativa muy importante para medir TOD en simuladores muy dinámicos como el descrito en este trabajo. Sin embargo, los fluoróforos utilizados pueden resultar tóxicos a ciertas concentraciones para algunos microorganismos.

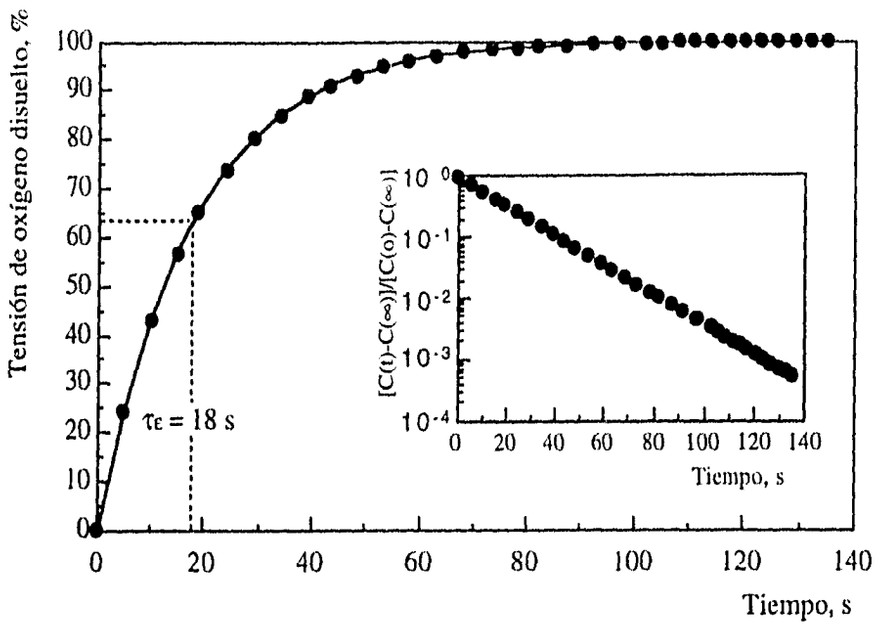


Figura 5-1. Curva de respuesta del electrodo de TOD ante un cambio súbito de TOD.

Electrodo	Principio	Cte. de tiempo, s	Referencia
Alfa Bassens	amperométrico	2-3	Albantov y Levin, 1994
Borkowski-Johnson	galvánico	20†	Lee y Tsao, 1979
Clark	polarográfico	5†	Lee y Tsao, 1979
Ingold	polarográfico	18	Träger y col., 1991
Ingold	polarográfico	18	Este trabajo
Instruments Lab.	polarográfico	27	Chen y col., 1985
Kimmich-Kruezer	polarográfico	0.13†	Lee y Tsao, 1979
Mancy	galvánico	1.86†	Lee y Tsao, 1979
Mackereth	galvánico	60 *	Lee y Tsao, 1979
Microelectrodo	polarográfico	0.03-0.01†	Lee y Tsao, 1979
Orbisphere	polarográfico	3	Träger y col., 1991
Sensor óptico	fluorimétrico	<1	Bambot y col., 1994

*: 90 % de la respuesta, †: constante de tiempo estimada a partir del 95 % de la respuesta ($\tau = t_{95}/3$).

Tabla 5-1. Constantes de tiempo para diferentes electrodos de TOD reportados en la literatura.

5.1.2 Constante de tiempo del simulador

Una vez establecida la dinámica del electrodo de TOD, es necesario conocer el comportamiento dinámico del simulador, ya que involucra en forma integra el comportamiento de los actuadores (controladores de flujo másico), la respuesta del electrodo, los aspectos de transporte de gas en la tubería y la trasferencia de oxígeno al medio líquido en el bioreactor.

La **figura 5-2** muestra la curva de respuesta del simulador ante un cambio escalonado. El tiempo se normalizó en todos lo casos, haciendo t = 0, el tiempo en el cual se inició el cambio escalonado. Se observa que la respuesta del sistema no es inmediata, sino que presenta un tiempo muerto de 90 s. Para obtener la constante de tiempo (tratándose de sistemas de primer orden) del simulador (τ_s) es necesario eliminar el tiempo muerto a la constante de tiempo aparente (τ_a) obtenida según la definición de las sección A.1.3, dando origen a la ec. 5-1.

$$\tau_s=\tau_a-Td \qquad (5\text{-}1)$$

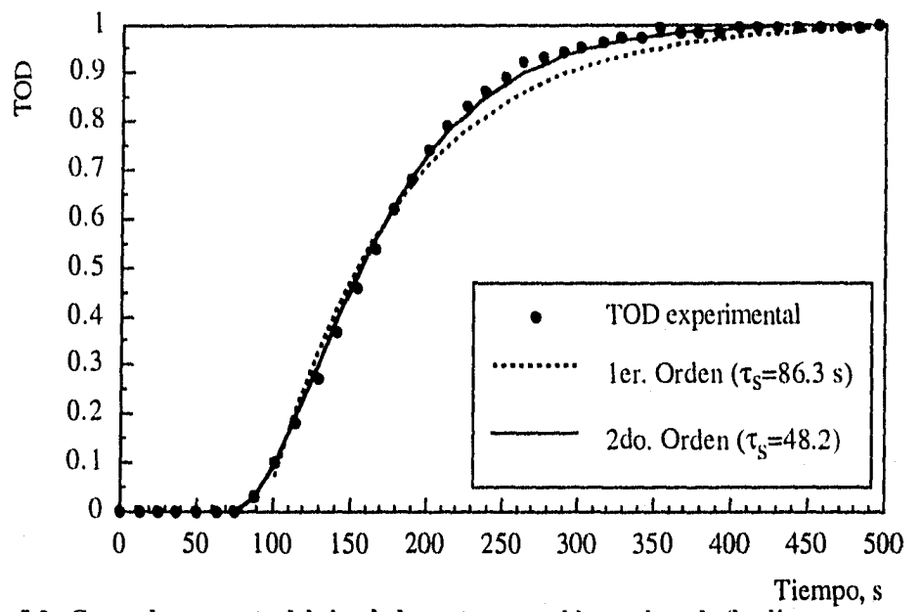


Figura 5-2. Curva de respuesta del simulador ante un cambio escalonado (las líneas representan el orden del modelo ajustado).

Suponiendo un comportamiento de primer orden (línea fragmentada de la **figura 5-2**), la constante de tiempo (τ_s) es de 86.3 s. Utilizando el criterio de los sistemas de segundo orden (línea continua de la **figura 5-2**), y eliminando el tiempo muerto, definido como el tiempo en

el cual el sistema no ha respondido (definición diferente para los sistemas de primer orden), la constante de tiempo del sistema (τ_s) es de 48.2 s. Se observa que el comportamiento dinámico es estrictamente de segundo orden, sin embargo una aproximación bastante buena consiste en el modelamiento como sistema de primer orden.

Dang y col. (1977) reportaron que la desviación hacia la forma sigmoidal, al inicio de la curva de respuesta de un sistema similar al descrito en este trabajo, se debe a que no se logra un cambio escalonado perfecto en el flujo de oxígeno. Esto es consecuencia del retraso originado por el recambio en la composición de los gases en las cámaras de humidificación, localizadas justo antes del bioreactor (**figura 4-1**).

Una curva de respuesta del simulador en donde se han eliminado dichas cámaras, se muestra en la **figura 5-3**. Con la nueva configuración, el tiempo muerto disminuyó de 90 a menos de 10 s y el simulador tendió a comportarse preferencialmente como un sistema de primer orden (τ_s = 27.5 s). Lo anterior sugiere que un retraso importante consiste en el transporte de gas en la tubería y en las cámaras de humidificación colocadas a la entrada del bioreactor. Sin embargo, las cámaras son necesarias para saturar de humedad el aire a la entrada del bioreactor y así disminuir las pérdidas por evaporación.

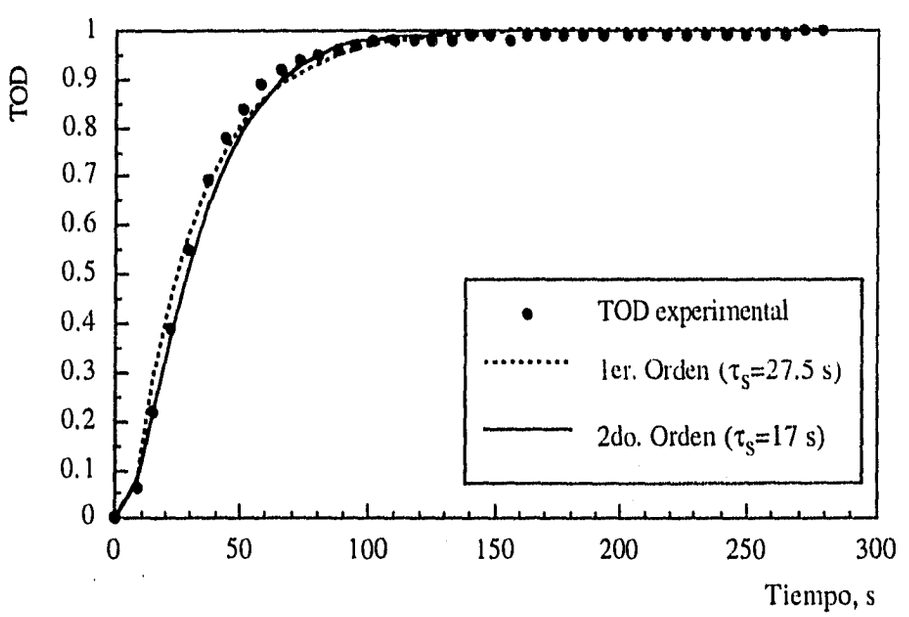


Figura 5-3. Curva de respuesta del simulador con cámaras de humidificación (las líneas representan el orden del modelo ajustado).

La **figura 5-4a** muestra una curva de respuesta del simulador (con cámaras de humidificación) al cambio escalonado, y la evolución de la velocidad de respuesta a lo largo del tiempo (**figura 5-4b**). Se observa que la velocidad es inicialmente cero y crece a un valor máximo de 0.28 %/s durante los primeros segundos, y luego decrece monótonicamente hasta cero. Si bien la constante de tiempo representa la velocidad con la que responde el simulador, la velocidad máxima de respuesta (VRS) indica cual es la velocidad más alta que el simulador puede lograr bajo ciertas condiciones (sin importar el orden del proceso). Lo anterior resulta de gran utilidad, como se verá más adelante, para caracterizar el simulador desarrollado.

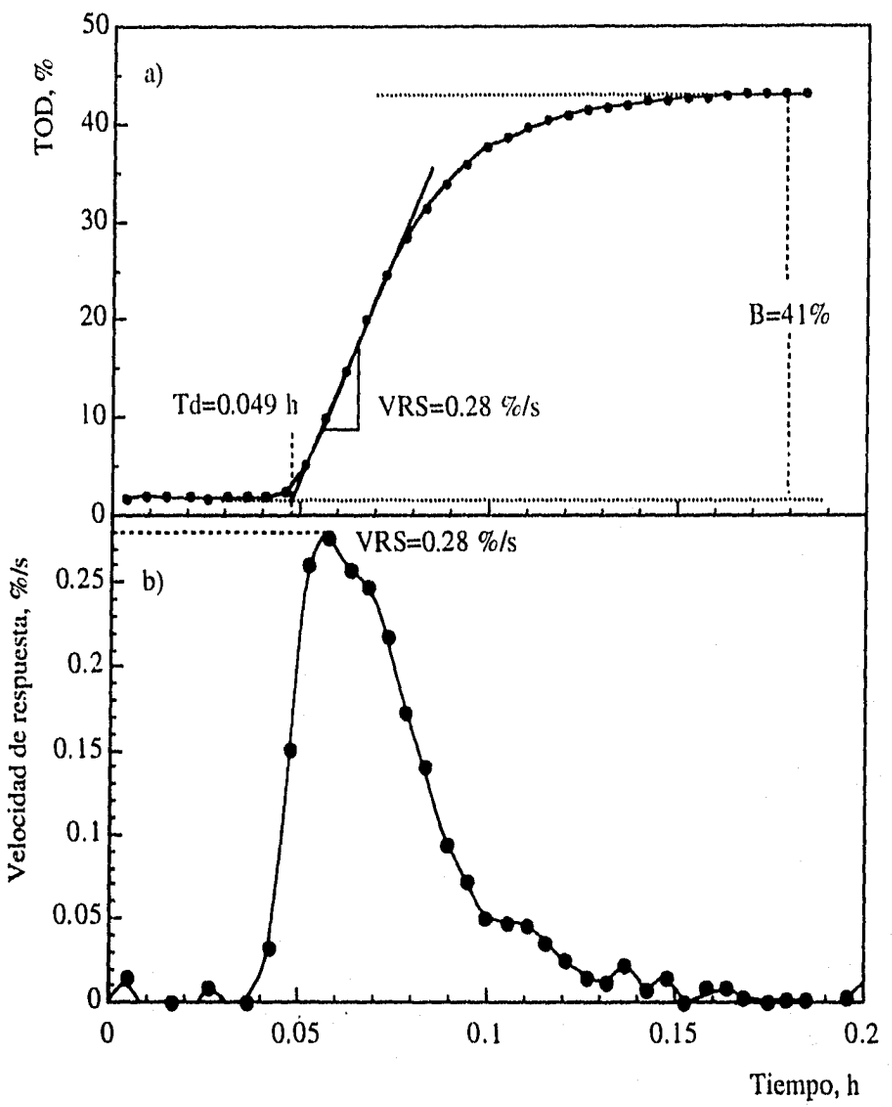


Figura 5-4. Estimación del tiempo muerto y de la VRS.

La **figura 5-5a** y **b** muestran la velocidad máxima de respuesta del simulador y el tiempo muerto (a flujos de 0.6 y 1 vvm) como una función del número de Reynolds. Se observa que existe una relación proporcional entre la VRS y el Reynolds por debajo de 11,000, mientras que a valores superiores, la VRS permanece constante. En la **figura 5-5b** se observa que existe una relación inversa entre el tiempo muerto y el Reynolds únicamente a valores por debajo de 11,000. Si se opera el simulador a números de Reynolds superiores a este valor, se asegura el régimen turbulento.

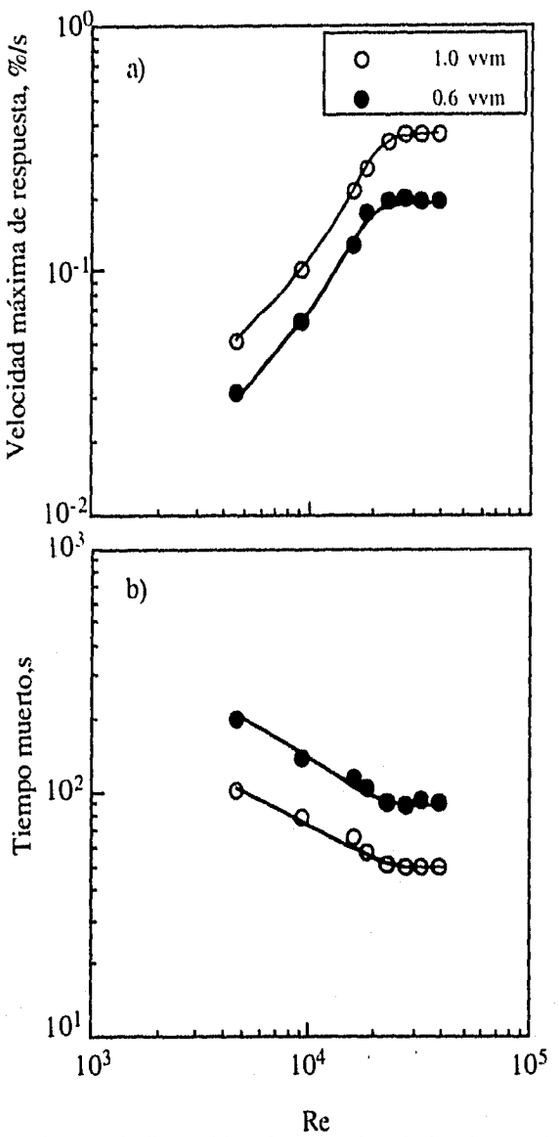


Figura 5-5. Efecto del número de Reynolds sobre la velocidad máxima de respuesta y el tiempo muerto del simulador.

Se observa además que al subir el flujo de 0.6 a 1 vvm (considerando en la región de régimen turbulento), la VRS aumenta de 0.2 a 0.4 %/s mientras que el tiempo muerto disminuye de 100 a 50 s. De esta forma, como consecuencia del aumento en la velocidad superficial del gas, se puede mejorar considerablemente los parámetros dinámicos del simulador.

5.1.3 Selección de las condiciones de operación del simulador

Como se describió en las secciones anteriores, es necesario establecer las condiciones operacionales más convenientes para operar el simulador. Una herramienta útil para seleccionar la velocidad de agitación, de aireación y configuración más adecuada, consiste en una evaluación del efecto que tienen las variables de proceso sobre los parámetros dinámicos del simulador.

La **figura 5-6** muestra el efecto de la agitación y la aireación sobre la VRS, la constante de tiempo (suponiendo un comportamiento de primer orden) y el tiempo muerto del sistema (sin cámaras de humidificación). Se observa que todos los parámetros dinámicos se ven altamente influenciados por la velocidad de agitación por debajo de 500 rpm. A velocidades de agitación superiores, dichas variables dinámicas permanecen prácticamente constantes. En la **figura 5-6** se muestra el efecto de la aireación (expresada como volumen de aire por unidad de volumen de medio de cultivo por tiempo) sobre las variables dinámicas. Se observa que al aumentar la aireación de 0.6 a 1.0 vvm, la velocidad máxima de respuesta incrementa de 0.19 a 0.36 %/s (**figura 5-6a**) lo que representa un aumento del 90 %. Por otra parte, el tiempo muerto disminuyó de 100 a 50 s, reducción que es altamente considerable (**figura 5-6c**).

Mediante la aireación de 1 vvm y agitación de 500 rpm, se logró reducir la constante de tiempo a 55 s, valor que está muy por arriba de τ_ε, por lo cual el electrodo de TOD es confiable como instrumento de medición (**figura 5-6b**). Impoolsup y col., (1989) reportaron una velocidad de agitación de 500 rpm y aireación de 1-1.5 vvm como condiciones óptimas para un bioreactor de 1 L, utilizado en estudios de escalamiento descendente.

Los resultados sugieren que las condiciones operacionales más adecuadas son: velocidades de agitación de más de 500 rpm y flujos de 1.0 vvm. Sin embargo, la formación continua de espuma, puede llegar a ser problemática en los cultivos celulares.

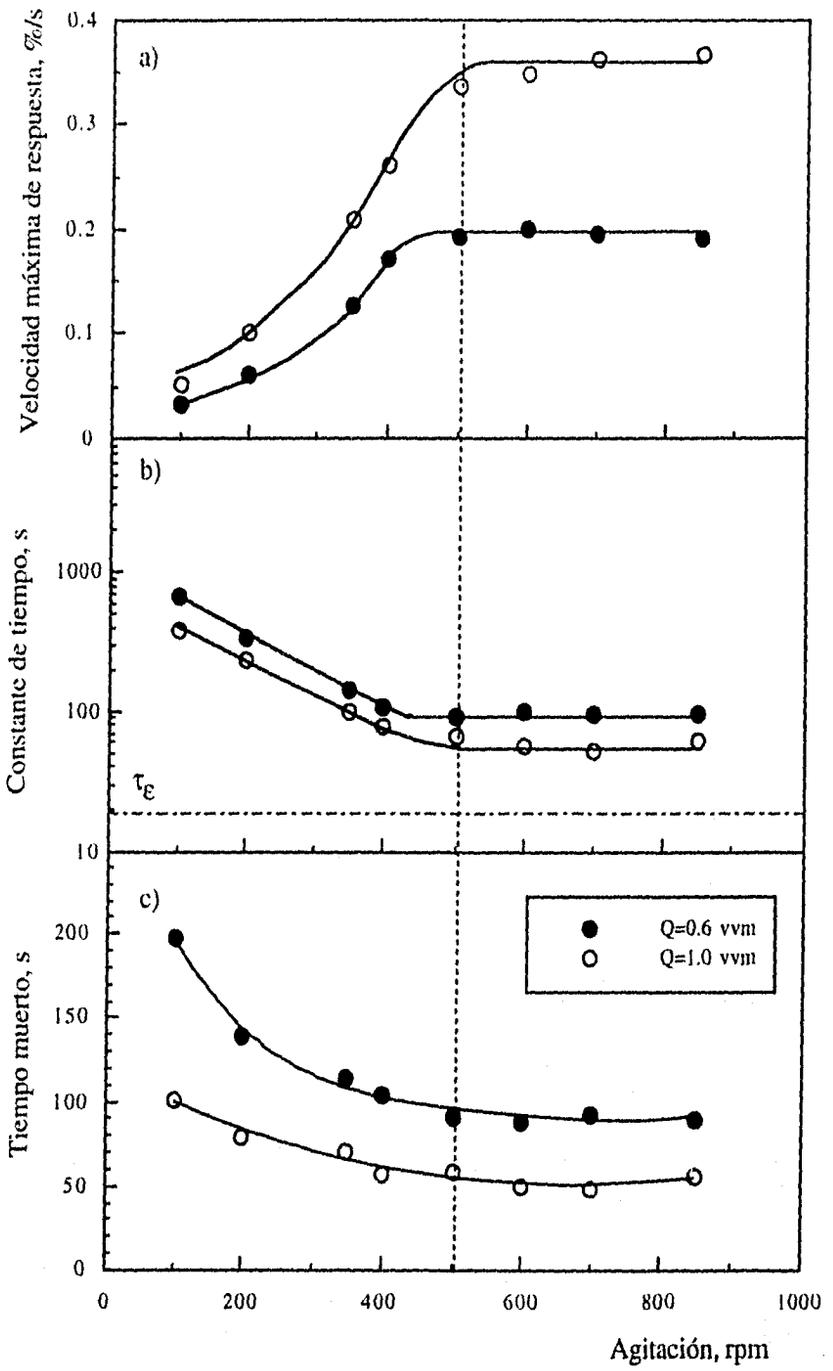


Figura 5-6. Efecto de la agitación y la aireación sobre los parámetros que caracterizan al simulador (configuración con cámaras de humedad). La línea punteada en el panel b representa la constante de tiempo del electrodo de TOD.

En la **figura 5-7** se muestra el efecto de la velocidad de agitación sobre los parámetros dinámicos del simulador con y sin cámaras de humidificación. En el experimento se utilizó un flujo de 0.6 vvm. Se observa que al desproveer de las cámaras de humidificación, la VRS aumenta de 0.19 a 0.71 %/s (**figura 5-7a**) lo que representa un aumento de 3 veces la velocidad de respuesta. El incremento en la dinámica se ve reflejado en la disminución de la constante de tiempo que disminuyó de 100 a 27 s (lo que representa un k_La de 130 h^{-1}, aproximadamente). Esta constante de tiempo, fue la más pequeña que se pudo lograr, en vista de que la respuesta del electrodo de TOD empieza a ser limitante (**figura 5-7b**). El tiempo muerto con la nueva configuración decreció de 100 a 5 s (**figura 5-7c**).

A partir de los resultados anteriores, se puede concluir que es preferible la configuración más dinámica (sistema sin cámaras) para procesos en donde se requiere de altas velocidades de respuesta (cultivos con TOD cambiante en tiempos cortos). La configuración con retraso (sistema con cámaras), se recomienda para procesos en donde la evaporación pueda ser considerable (temperatura de cultivo superior a 29 °C) y procesos que no requieran de altas velocidades de respuesta (cultivos a TOD constante). En los cultivos a TOD oscilante, se utilizó la configuración provista de las cámaras de humedad.

5.1.4 Respuesta del simulador a entradas sinusoidales

En la **figura 5-8** se muestra el comportamiento del simulador ante una función de entrada (flujo de oxígeno) sinusoidal. El eje de oscilación fue de 10.5 %, amplitud de 10.5 % de O_2, y período de 300 s. Se observa que la respuesta (TOD) es también oscilatoria con período de 300 s. Sin embargo, la curva de respuesta presentó desfase permanente de 60 s (72° aproximadamente) respecto a la onda de entrada. Un comportamiento similar fue reportado por Träger y col., (1991) quienes reportaron que tal comportamiento se debe a retrasos de eventos como el transporte de gas por las tuberías. En la **figura 5-9** se muestran las curvas de respuesta ante una función seno en el flujo de O_2, (amplitud de 10.5 % de O_2 , eje de 10.5 % de O_2) a períodos de onda de 600, 300, 100 y 30 s. Se observa que a medida que el período de la oscilación decrece de 600 a 30 s, la amplitud de la respuesta (TOD) tiende a disminuir. La **figura 5-10** resume el efecto del período de la onda de la función de entrada (flujo de O_2), sobre la amplitud de la onda a la salida (TOD) y el desfase entre ambas ondas. Se observa que a medida que período de la oscilación decrece, la amplitud en el oxígeno disuelto se aleja del valor deseado (50 % TOD). El desfase tiende a aumentar mostrando una relación de proporción inversa. De aquí cabe resaltar que el simulador generará respuestas desfasadas

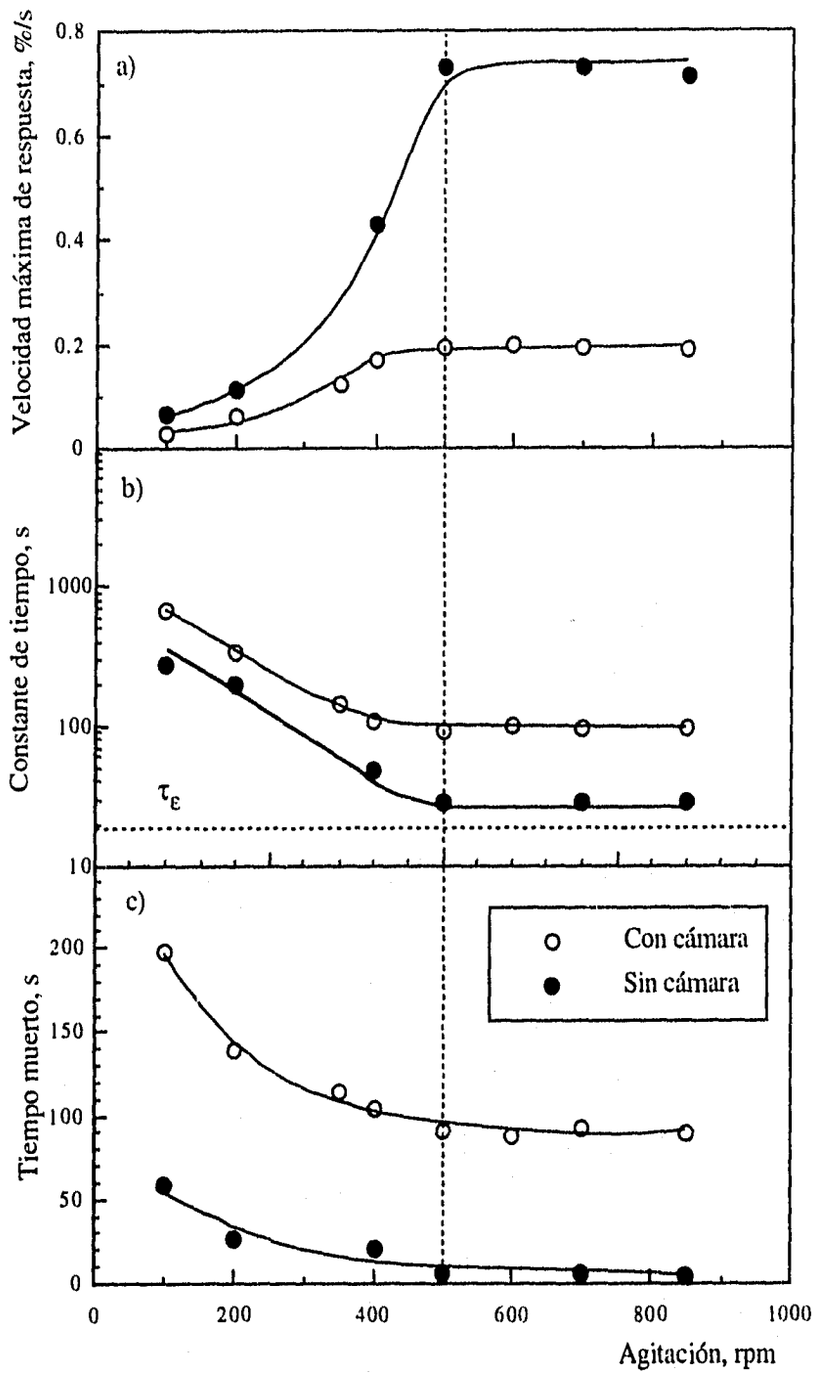


Figura 5-7. Efecto de las cámaras de humedad sobre los parámetros que caracterizan al simulador y aireación de 0.6 vvm. La línea punteada en el panel b representa la constante de tiempo del electrodo de TOD.

respecto a la función de entrada. Sin embargo, tal comportamiento es característico de los sistemas de primer orden, como lo demuestra la ecuación A-16 (sección A.1.4), que establece que a medida que el período de oscilación (Ω) tiende a infinito, la respuesta se trasforma en una función coseno (desfase de -90°).

Los resultados anteriores revelan que el simulador solo será capaz de generar oscilaciones de TOD a períodos de oscilación superiores a la constante tiempo.

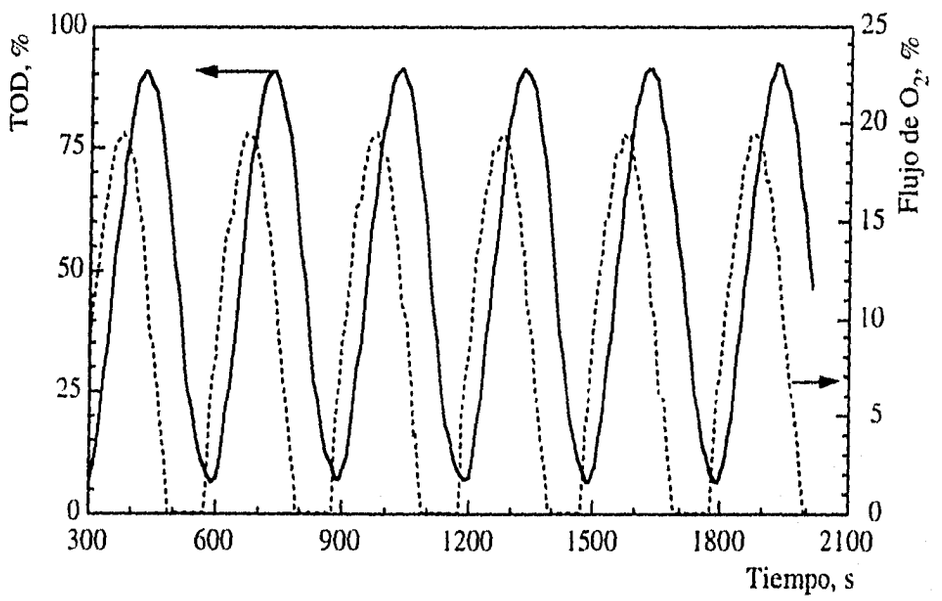


Figura 5-8. Respuesta del simulador a entradas sinusoidales.

La ecuación A-16 descrita en la sección A.1.4, resulta de gran utilidad ya que es capaz de predecir la señal de salida (considerando la dinámica del simulador en forma integrada), para situaciones donde se prefiera utilizar el simulador en modo de lazo abierto. Por ejemplo, Träger y col. (1991) reportaron que un sistema similar al descrito en este trabajo, solo fue capaz de generar oscilaciones de TOD por debajo de 10 % cuando el sistema se operaba en modo de lazo abierto.

La **figura 5-11** compara los valores de TOD obtenidos en forma experimental y los predichos por la ecuación A-16. Se observa que es posible predecir muy bien el comportamiento de la señal de respuesta del simulador a entradas sinusoidales.

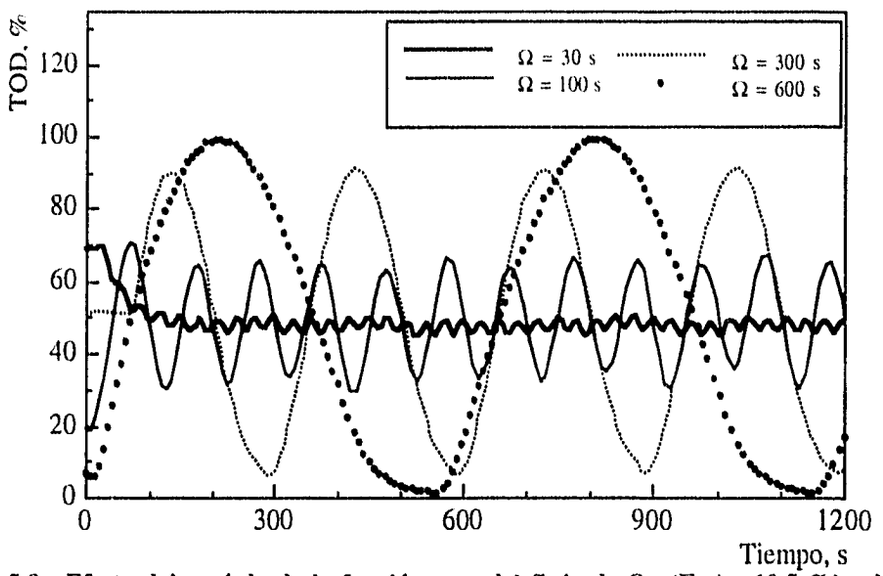


Figura 5-9. Efecto del período de la función seno del flujo de O_2 (E=A= 10.5 %) sobre la amplitud en la señal de salida (TOD).

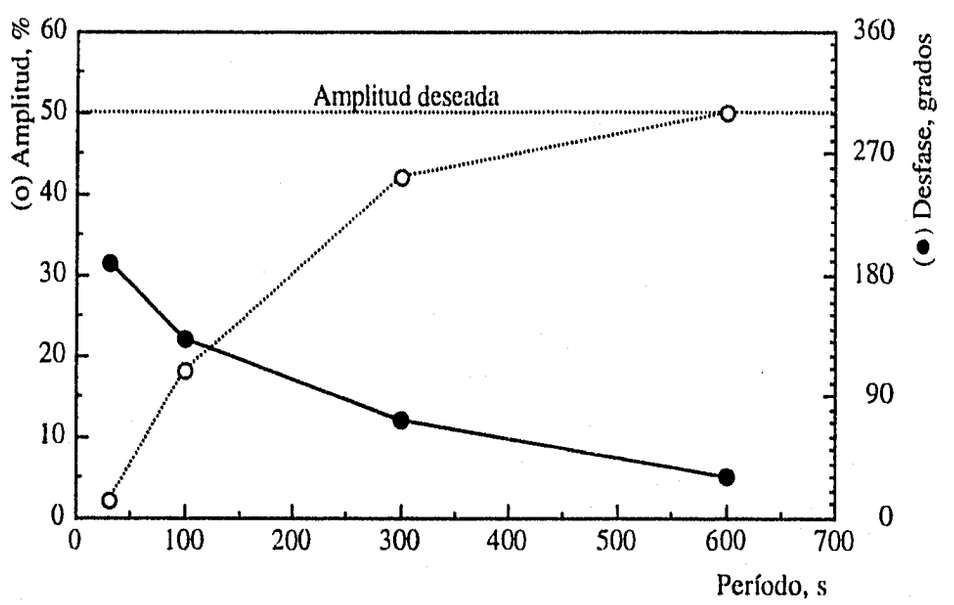


Figura 5-10 Efecto del período de oscilación de la función de entrada (flujo de O_2) sobre la amplitud de la onda de salida (TOD) y el desfase entre la entrada y la salida.

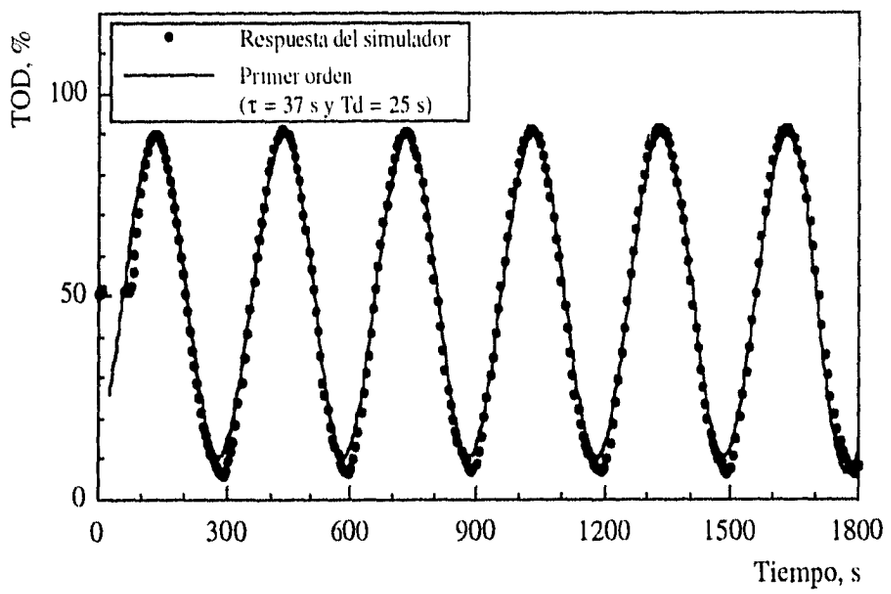


Figura 5-11. Comparación de la onda de respuesta experimental del simulador con la señal propuesta por la teoría de control (suponiendo un modelo de primer orden).

5.1.5 Generación de perfiles oscilantes

La **figura 5-12** muestra los perfiles oscilatorios originados mediante un *setpoint* cuadrado (a) y *setpoint* sinusoidal (b). En general, ambos perfiles resultaron adecuados para obtener respuesta de tipo oscilatorio. Se observa que la periodicidad y reproducibilidad es ligeramente mayor en la respuesta obtenida con la ecuación sinusoidal respecto de la obtenida con el perfil cuadrado.

El desfase entre el perfil a seguir (sinusoidal o cuadrado) y el valor medido se presenta en ambos casos; sin embargo, resultó de 20-22 s menor con el perfil sinusoidal.

La principal diferencia que se encontró entre ambos perfiles, fue la velocidad de respuesta, en donde resultó 0.02 %/s más rápido el perfil cuadrado (**figura 5-13**). Por lo tanto, en situaciones donde se requiera asegurar la mejor periodicidad, se recomienda usar el perfil sinusoidal (períodos de oscilación del orden de minutos), mientras que el perfil cuadrado será preferible cuando se requieran velocidades de respuesta rápidas (períodos de oscilación del orden de segundos).

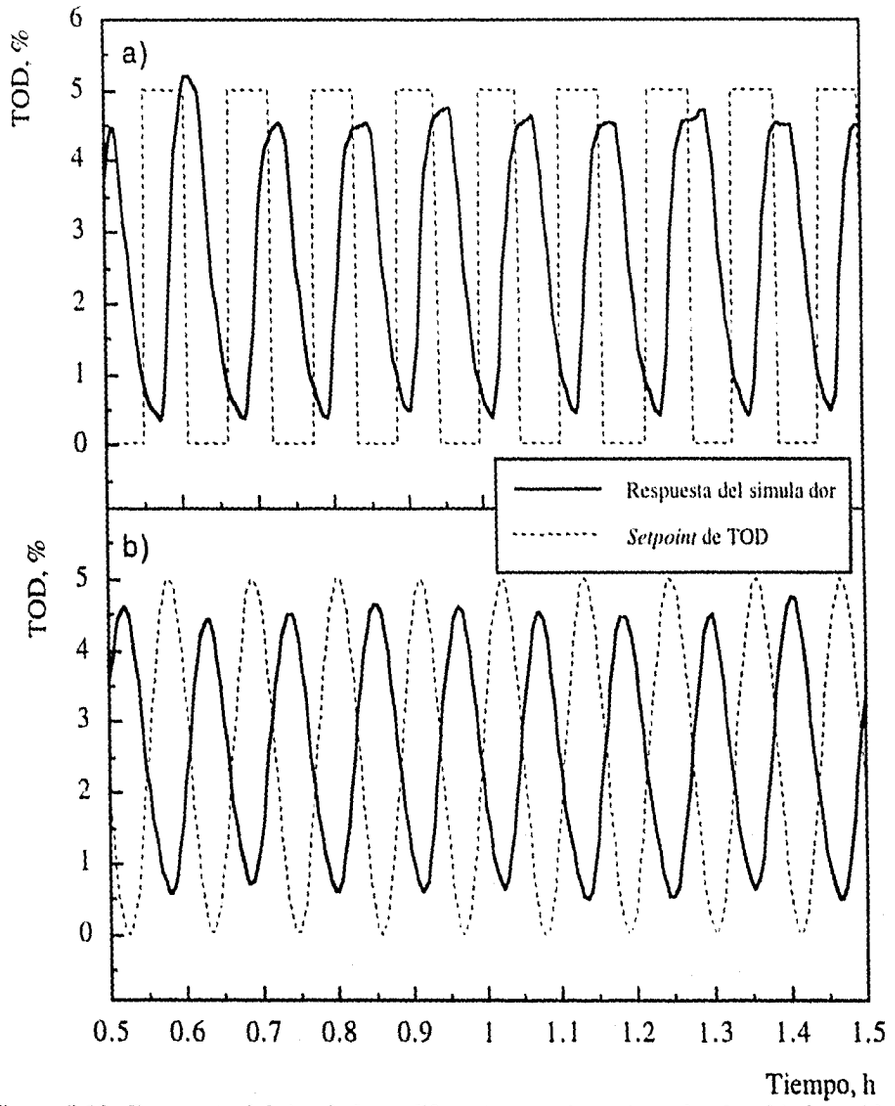


Figura 5-12. Respuesta del simulador a diferentes *setpoints*. a) cuadrado y b) sinusoidal.

5.1.6 Determinación de las constantes de control

La estimación de las constates de control (Kc, τ_i y τ_d) fueron estimadas como se describió en la sección 4.2.5. Para ello, se realizó un cultivo de *E. coli* en medio BSg controlando el proceso en modo de lazo abierto (**apéndice E**). La velocidad de agitación utilizada fue de 600 rpm y aireación de 0.6 vvm. A partir de las curvas de reacción del proceso realizadas en cada fase del cultivo (lag, exponencial y estacionaria), se obtuvieron las constantes de control

mostradas en la **tabla 5-2**. Se observa que, dependiendo de la fase de crecimiento en la que se encuentre el cultivo, hay variaciones en las constantes de control. Una estrategia más adecuada de control, consistirá en utilizar un algoritmo de control de tipo adaptativo (manual o automático), en donde se modifiquen las constantes de control con la finalidad de obtener controles más finos.

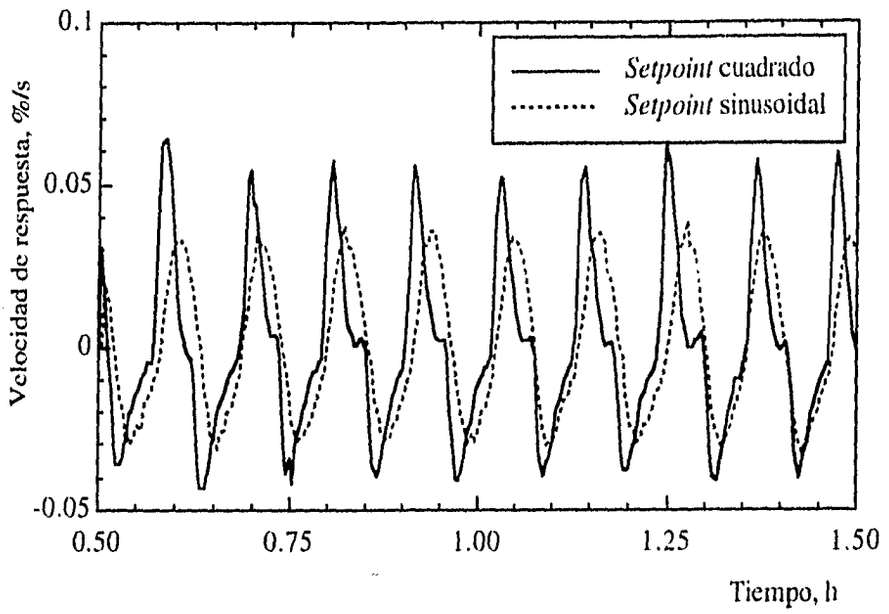


Figura 5-13. Comparación de la velocidad de respuesta del simulador a diferentes *setpoints*

Edad del cultivo	Kc (-)	τ_i (s)	τ_d (s)
Lag	0.3	350	88
Exponencial	0.8	90	22
Estacionaria	0.4	180	45

Tabla 5-2. Constantes de control propuestas para las diferentes edades del cultivo.

5.2 Cinéticas de crecimiento con y sin presión de selección

En la gran mayoría de los trabajos reportados en la literatura en donde el modelo biológico es de naturaleza recombinante, se menciona la necesidad de ejercer presión de selección mediante el uso de antibióticos marcadores, para garantizar una población homogénea (Caunt y col., 1989 y Namdev y col., 1993). Con la finalidad de establecer si era necesario o no tal criterio para la cepa utilizada en este trabajo, se realizaron cultivos simultáneos bajo las mismas condiciones, y ejerciendo presión de selección solo en uno de los cultivos. La **tabla 5-3** muestra los resultados cinéticos y de producción a 10 % de TOD. Se observa que el comportamiento es el mismo con y sin el antibiótico. Lo anterior sugiere que no hay segregación del plásmido durante los cultivos lote. Sí bien una forma más certera es mediante la cuantificación del número de copias, la similitud cinética y estequiométrica resulta un buen indicador, ya que se ha reportado que en el caso de pérdida segregacional de plásmidos, los cultivos tienden a aumentar su velocidad específica de crecimiento y a disminuir la producción del metabolito de interés (Namdev y col., 1993).

En base a los resultados obtenidos, se decidió eliminar la kanamicina de los cultivos lote, y solo se utilizó en la preparación de inóculos.

Parámetro	Con kanamicina	Sin kanamicina
μ (h^{-1})	0.36	0.36
q_S (h^{-1})	0.66	0.62
$Y_{x/s}$ (g/g)	0.54	0.58
X (g/L)*	2.30	2.27
PA (U/mg)*	0.09	0.09
Acetato (g/L)*	0.33	0.26
Formiato (g/L)*	0.00	0.00
UFC/ml*	35×10^{10}	33×10^{10}

Tabla 5-3. Comparación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos a 10 % TOD con y sin presión de selección, (*) valores medidos al agotamiento de glucosa.

5.3 Cultivos a TOD constante

Los cultivos a TOD constante, fueron de utilidad para conocer el efecto del oxígeno sobre el proceso de producción de PA y posteriormente con el fin de ser utilizados como punto de comparación con los cultivos a TOD oscilante. Se realizaron cultivos control desde 0.2 a 40 % de TOD y un cultivo anaerobio (0 % de TOD). El pH en todo los cultivos fue de 6.9±0.2.

En la **figura 5-14** se muestra la cinética de crecimiento a 40 % de TOD, el resto de los cultivos se encuentra en el **apéndice F**. En la **figura 5-14c** se muestra la cinética de crecimiento, consumo de glucosa y generación de ácido acético durante el cultivo. Se observa que la biomasa alcanzada al agotamiento de glucosa fue de 2.2 g/L y el acetato generado fue de 0.3 g/L. El panel a) muestra el perfil del flujo de gases a la entrada del bioreactor, necesario para mantener la tensión de oxígeno constante a 40 % (**figura 5-14b**). Se observa que el porcentaje de oxígeno aumenta durante el tiempo siguiendo un perfil exponencial, como consecuencia de la demanda de oxígeno por las células en crecimiento. Los datos adquiridos, pueden resultar de utilidad para estimar la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) en línea durante el cultivo y hacer estimaciones del estado del bioreactor. Se observa que justo al agotamiento de glucosa, ocurre una perturbación en el control de TOD, en ese punto, el porcentaje de aire a la entrada del bioreactor disminuye drásticamente indicando el fin de la fase exponencial (**figura 5-14a**). Respecto a la producción de PA (**figura 5-14d**), se observa que la actividad volumétrica aumentó en forma exponencial hasta 0.36 U/ml y la actividad específica aumentó en forma exponencial hasta 0.09 $U/mg_{cel.}$ cuando se agotó la glucosa. Este valor se tomó como punto de comparación entre los cultivos. Sin embargo, se observa que la actividad específica continua aumentando hasta (0.17 $U/mg_{cel.}$ en el período monitoreado hasta las 12 h). La producción de PA presentó una cinética parcialmente asociada al crecimiento.

La **figura 5-15** muestra un cultivo típico a 0.2 % de TOD, cabe hacer notar que el simulador desarrollado fue capaz de lograr controles muy finos de TOD tanto a niveles altos (40 %) como a niveles bajos como 0.2 % TOD. Característica poco común en los controladores comerciales (Aguilar-Aguila y col., 1993). Con el sensor utilizado fue posible medir y distinguir tensiones tan bajas como 0.2, 0.8 y 1 %. Un electrodo similar fue utilizado por Chen y col. (1985) para distinguir tensiones del mismo orden de magnitud que las descritas en este trabajo.

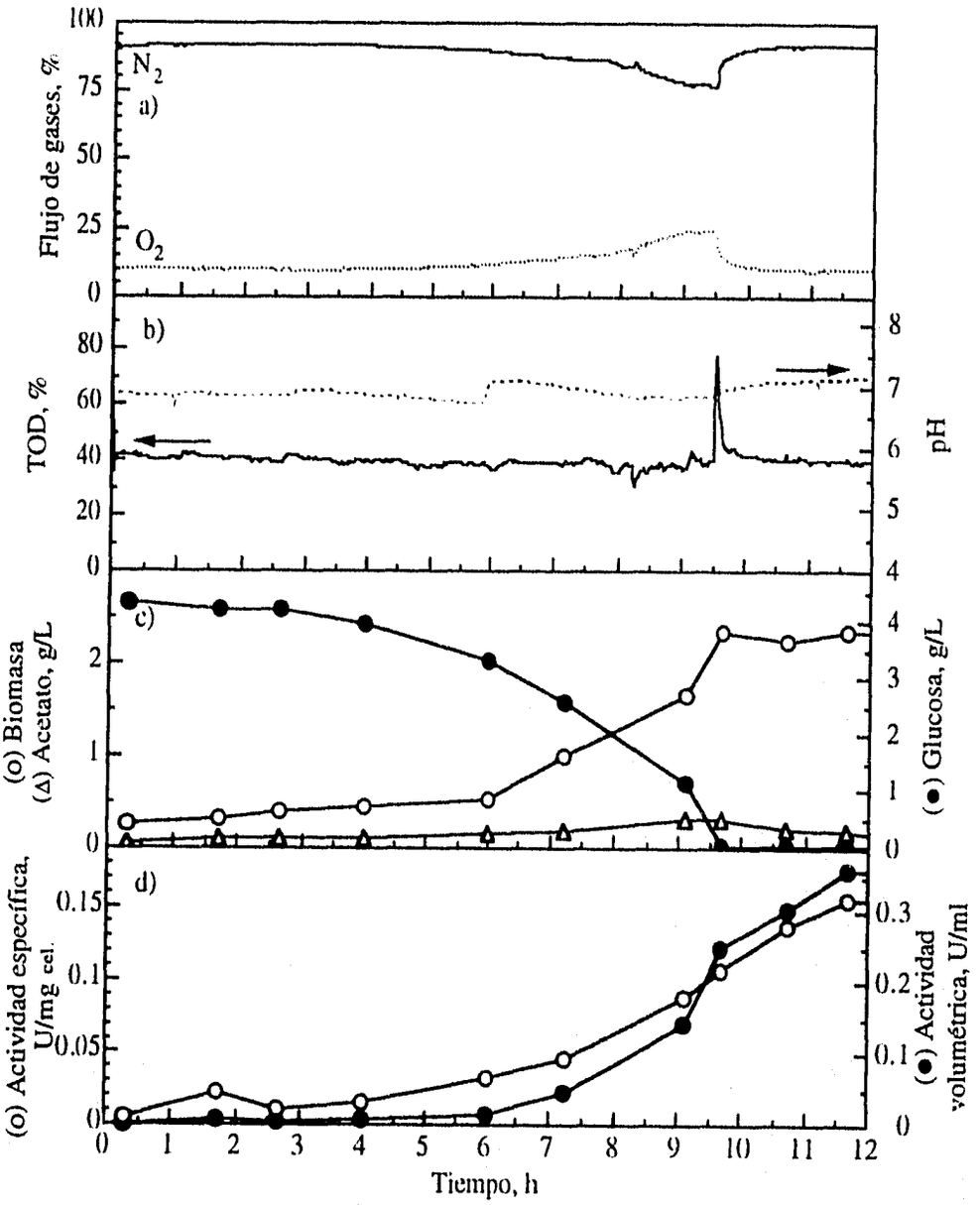


Figura 5-14. Cinética de crecimiento a 40% TOD.

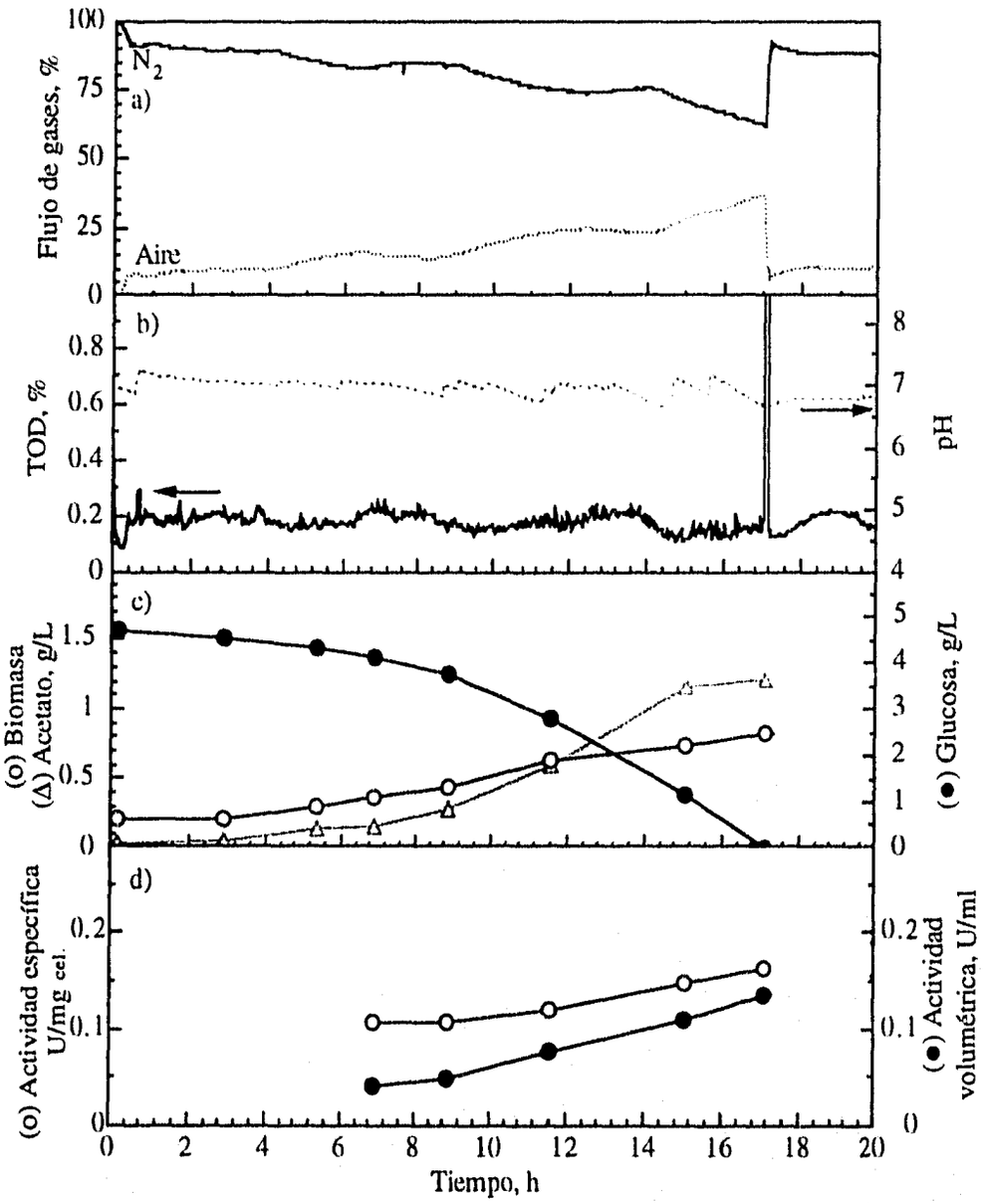


Figura 5-15. Cinética de crecimiento a 0.2% TOD.

La **figura F-8** (ubicada en el **apéndice F**) compara un cultivo a 40 % de TOD y un duplicado a las mismas condiciones. Se observa que en general existe buena reproducibilidad de los experimentos realizados.

La **figura 5-16** resume algunas cinéticas de consumo de sustrato y de formación de productos a diferentes tensiones de oxígeno, el resto se encuentra en el **apéndice F**. Se observa que a medida que se trabaja a tensiones más bajas, la velocidad de crecimiento es menor, hasta llegar a cero en el cultivo anaerobio (**figura 5-16a**).

La ausencia de crecimiento en condiciones anaerobias podría explicarse en base a que el medio de cultivo utilizado, no contiene selenio ni nitratos, sustancias clave en el metabolismo anaerobio de *E. coli*, o bien posiblemente se trate de una cepa mutante que no exprese la nitrato reductasa y/o la formiato hidrógeno liasa, enzimas del metabolismo anaerobio de *E. coli* (Lester y DeMoss, 1971).

En cuanto a la producción de PA (**figura 5-16c**), se observa que a tensiones de oxígeno altas (10 y 40 % TOD) se obtiene un aumento en forma exponencial, mientras que a tensiones bajas (0.2 y 1 % TOD) la actividad específica de PA se mantiene constante durante la fase exponencial, incluso más altos que los cultivos a 10 y 40 % TOD. Esto se debe a que a tensiones bajas como 0.2 y 1 % TOD (y por consiguiente, bajas velocidades específicas de crecimiento), las células son capaces de procesar el precursor de PA. Resultados similares fueron observados en el cultivo a 0.8 % TOD (**apéndice F**). Por el contrario no se presentó actividad de importancia en el cultivo anaerobio, debido a que no hubo crecimiento. Aunque usando otras enzimas, Li y col. (1992) encontraron que los cultivos anaerobios de diferentes cepas de *E. coli* recombinante, utilizadas para la producción de β-galactosidasa y β-lactamasa, mostraron actividad del mismo orden de magnitud que la actividad obtenida en cultivos aireados.

En la **figura 5-16d** se muestra la generación de ácido acético a diferentes tensiones de oxígeno. Se observa que a tensiones de 10 y 40 %, la producción es muy similar, y a medida que se tienen tensiones más bajas, la producción de acetato aumenta. Una discusión más detallada se hará más adelante.

En la **figura 5-17** se muestran los cromatogramas de a) soluciones estándar y b) la muestra al agotamiento de glucosa del cultivo a 0.2 % TOD. Se observa que la acumulación más importante fue de los ácidos acético y fórmico y en menor proporción succinato, lactato y etanol.

Estos metabolitos son comúnmente reportados en cultivos a bajos valores de TOD o bien en cultivos anaerobios para diferentes cepas de *E. coli* (Han y col., 1992 y Varma y col., 1993). Para fines prácticos, solo se cuantificaron los ácidos fórmico y acético, dado que la acumulación de los demás metabolitos no fue de importancia.

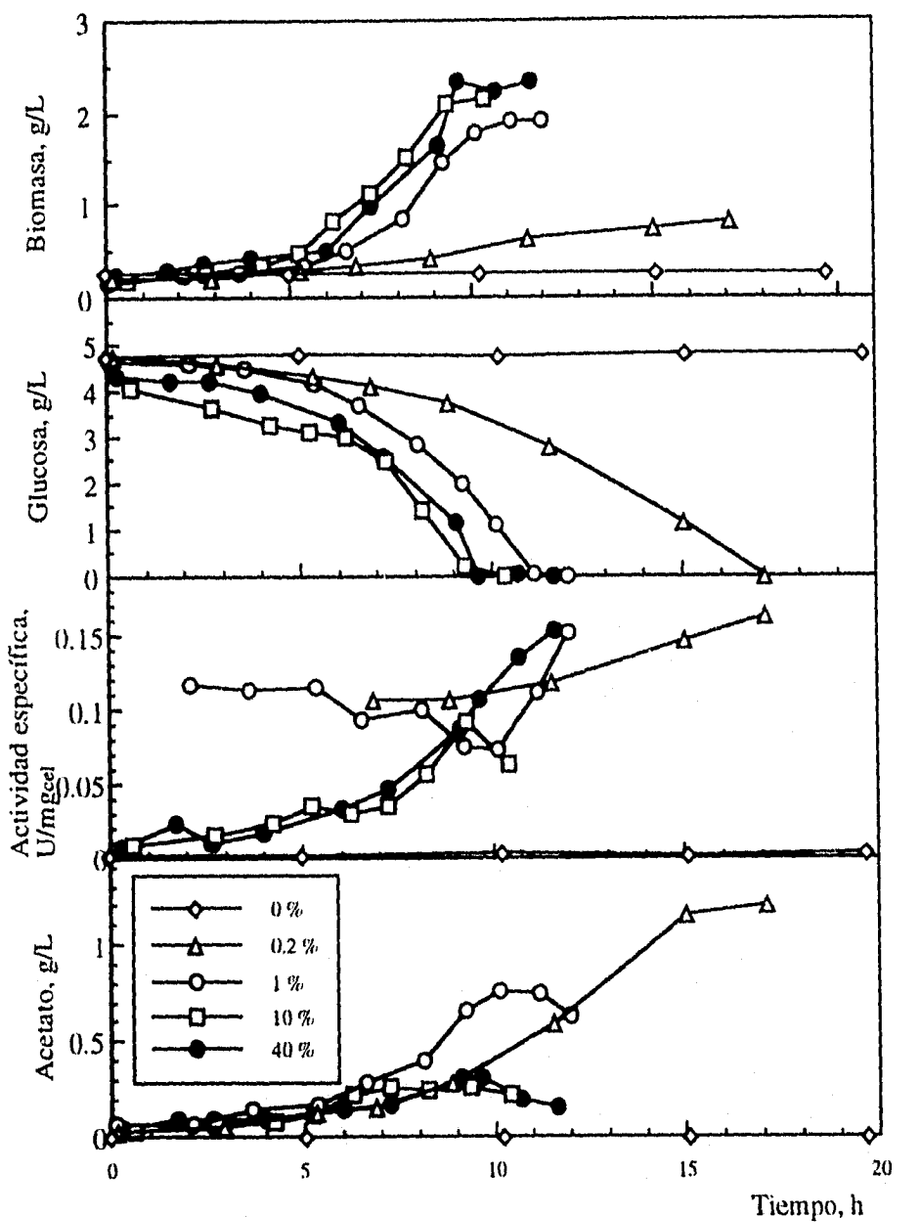


Figura 5-16. Cinéticas de crecimiento a diferentes niveles de TOD.

La **figura 5-18** muestra el efecto del oxígeno disuelto sobre la velocidad específica de crecimiento. Los datos mostraron un comportamiento de saturación tipo Monod cuyas constantes (μ_{max} = 0.38 h^{-1} y Ko_2 = 0.54 % TOD) fueron obtenidas mediante la regresión de Lineweaver-Burk (mostrada en el recuadro de la **figura 5-18**). Se observa que, por debajo de 10 % de TOD, el oxígeno empieza a ser limitante para el crecimiento y se vuelve más crítico a tensiones inferiores a 5 %.

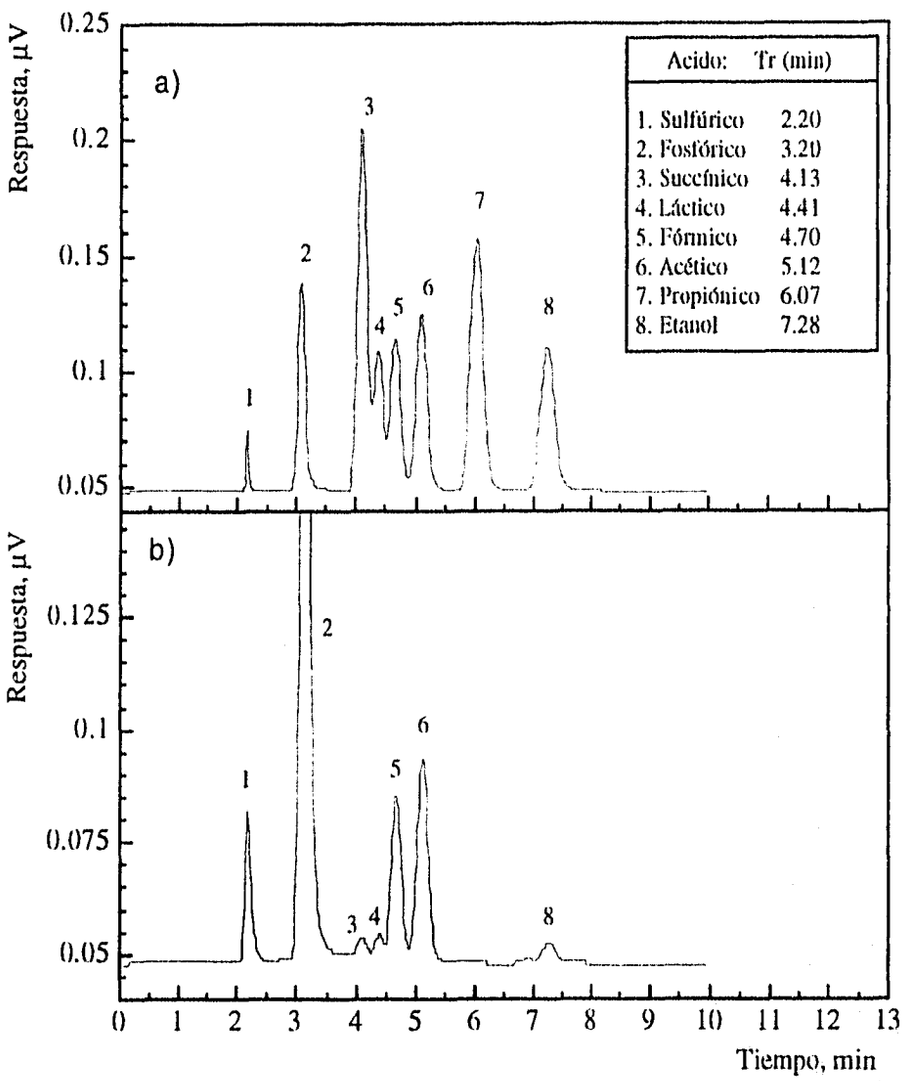


Figura 5-17. Cromatogramas de a) soluciones estándar y b) metabolitos presentes en una muestra al agotamiento de glucosa y 0.2 % TOD.

La **tabla 5-4** resume los valores de μ_{max} y Ko_2 obtenidas con la cepa JM101/ppA102 y otros datos reportados en la literatura. Las diferencias entre los valores se deben a las variaciones fenotípicas que identifican a cada cepa y también posiblemente a la composición del medio de cultivo.

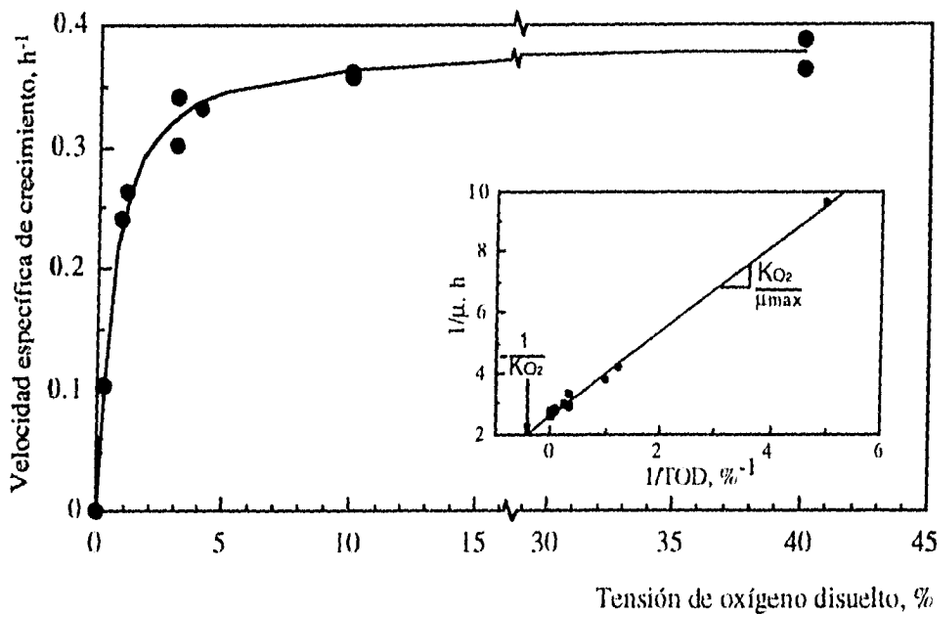


Figura 5-18. Efecto del oxígeno disuelto sobre la velocidad específica de crecimiento.

Cepa	μ_{max} (h^{-1})	Ko_2 (ppm)	Medio de cultivo	Referencia
JM101 (pPA102)	0.38	0.043	Glucosa/sales	Este trabajo
TB-1 (pUC19)	0.49	0.038	Luria	Li y col., (1992)
B/r-ATCC12401	1.01	0.013	Glucosa/sales	Chen y col., (1985)

Tabla 5-4. Constantes de Monod para diferentes cepas de *E. coli* con O_2 como sustrato limitante.

En la **figura 5-19** se muestra el efecto de la tensión de oxígeno sobre el rendimiento biomasa/sustrato en cultivos lote. Los datos mostraron un comportamiento de saturación descrito por la ecuación 5-2. Las constantes obtenidas por regresión lineal fueron: constante de saturación ($K_{X/S}$) de 0.67 % TOD y rendimiento máximo ($Y_{x/s(max)}$) de 0.58 $g_{cel}/g_{glucosa}$, valor que cae dentro de los valores teóricos reportados para microorganismos recombinantes. Por ejemplo, Da Silva y Bailey (1986) reportaron que el rendimiento máximo teórico para *E. coli*

recombinante con producto retenido (intracelular) es de 0.64 y de 0.42 $g_{cel}/g_{glucosa}$, para cepas cuyo producto es excretado al medio de cultivo.

$$Y_{x/s} = \frac{Y_{x/s(max)}[TOD]}{K_{x/s} + [TOD]} \qquad (5\text{-}2)$$

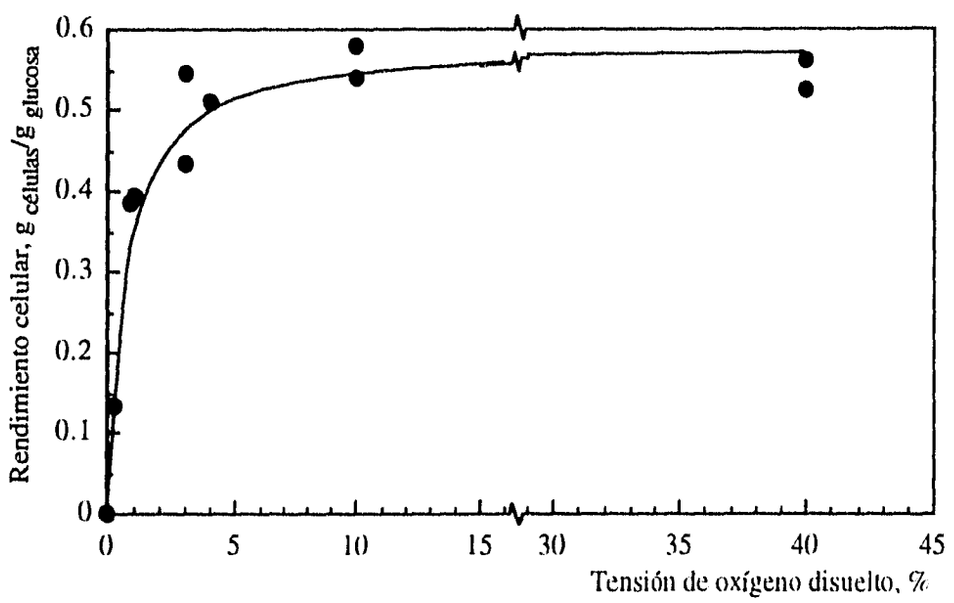


Figura 5-19. Efecto del oxígeno disuelto sobre el rendimiento celular.

En la **figura 5-20** se resume la producción de PA y ácidos orgánicos en el momento del agotamiento de glucosa de los cultivos a TOD constante. Se observa que en los cultivos no limitados por oxígeno, la actividad de PA fue de 0.09 $U/mg_{cel.}$, mientras que a tensiones inferiores a 5 %, la actividad aumentó hasta 0.165 $U/mg_{cel.}$ a 0.2 % de TOD, lo que representa un aumento del 80 % (**figura 5-20 a**). Un comportamiento similar fue observado por Gebauer y col. (1987) que reportaron que la actividad de PA en una *E. coli* silvestre, aumentó de 15 a 75 $U/g_{cel.}$ al disminuir la TOD de 45 a 5 %. Dicho aumento en la actividad de PA se debe al efecto de la velocidad específica de crecimiento (Ramírez y col., 1994a) que a su vez es función de la tensión de oxígeno en el medio de cultivo (**figura 5-18**).

De igual manera, la producción de los ácidos fórmico y acético se incrementó a tensiones bajas de oxígeno (**figura 5-20b**). Se observa que en cultivos no limitados por oxígeno, no hay producción de fórmico pero sí de ácido acético. La generación de acetato en tales condiciones,

se debe al "*Efecto glucosa*" (*Efecto Crabtree*) que se presenta a tensiones de oxígeno no limitantes de oxígeno, donde la degradación del sustrato se realiza simultáneamente por la vía oxidativa (producción de CO_2) y fermentativa (producción de acetato). Esta última vía está a cargo de la acetilCoA sintetasa que hidroliza el acetilCoA (proveniente de la descarboxilación oxidativa del piruvato) liberando acetato y coenzima A (**figura 2-1**). Mientras que la producción de acetato a tensiones de oxígeno limitantes (*Efecto Pasteur*) viene dada principalmente por la hidrólisis del piruvato (Doelle y col., 1982), esto explica la presencia de fórmico solo en cultivos limitados por oxígeno. Cabe resaltar que en el cultivo anaerobio no se obtuvo actividad de PA ni generación de ácidos orgánicos, debido a que las células no crecieron.

La **figura 5-21** muestra el efecto de la velocidad específica de crecimiento (correspondiente a cada tensión de oxígeno evaluada) sobre la producción de ácidos orgánicos, actividad específica de PA y rendimiento celular. Se observa que a medida que μ decreció de 0.38 a 0.1 h^{-1} (mediante la limitación por oxígeno), la producción de los ácidos acético y fórmico aumentó de 0.3 a 1.5 g/L y de 0 a 1.0 g/L, respectivamente (**figura 5-21a**). Han y col. (1992) reportaron que a altas tasas de dilución, la producción de acetato en quimiostatos se ve aumentada debido al *efecto Crabtree*, mientras que el aumento de ácidos orgánicos a μ bajas reportadas en este trabajo, se debe al *efecto Pasteur*.

El rendimiento celular se incrementó proporcionalmente en función de la velocidad específica de crecimiento (obtenida mediante la limitación de oxígeno), donde la pendiente corresponde a la velocidad específica de consumo de glucosa (q_s) que fue de 0.64 $g_{glucosa}/g_{cel}.h$ (**figura 5-21b**).

De igual forma, la actividad específica de PA aumentó de 0.09 a 0.165 $U/mg_{cel.}$ al decrecer la velocidad de crecimiento (**figura 5-21c**). Los resultados concuerdan con los trabajos de Ramírez y col. (1994a) quienes reportaron que la producción de PA estaba inversamente relacionada con la velocidad específica de crecimiento en cultivos exponencialmente alimentados (limitados por glucosa). El inconveniente de los cultivos tipo lote alimentado limitados por glucosa, es que requieren de bombas de flujo variable que son difíciles de escalar. Los cultivos lote con limitación de oxígeno, no requieren de equipo especial, pero tienen el inconveniente de que el rendimiento celular se ve afectado. Por ejemplo, al disminuir la velocidad específica de crecimiento de 0.38 a 0.1 h^{-1} (mediante limitación por oxígeno), el rendimiento celular decreció de 0.58 a 0.12 $g_{cel}/g_{glucosa}$.

Cabe remarcar que a velocidad de crecimiento de cero -correspondiente al cultivo anaerobio-, no se obtuvo actividad de PA, ni generación de ácidos orgánicos, debido a la ausencia de crecimiento celular.

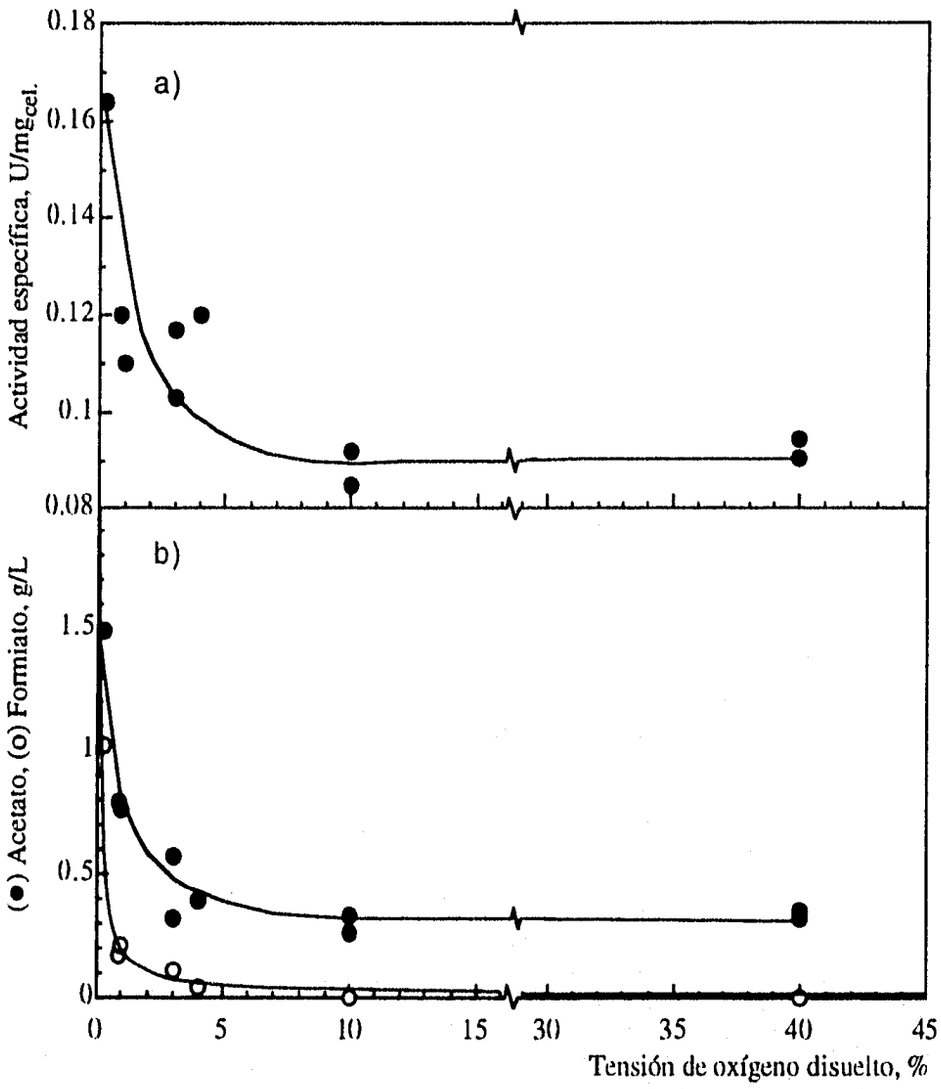


Figura 5-20. Efecto del oxígeno disuelto sobre la actividad enzimática de PA y la producción de ácidos orgánicos al agotamiento de glucosa. La actividad específica de PA en el cultivo anaerobio fue de 0 U/m$_{gcel.}$.

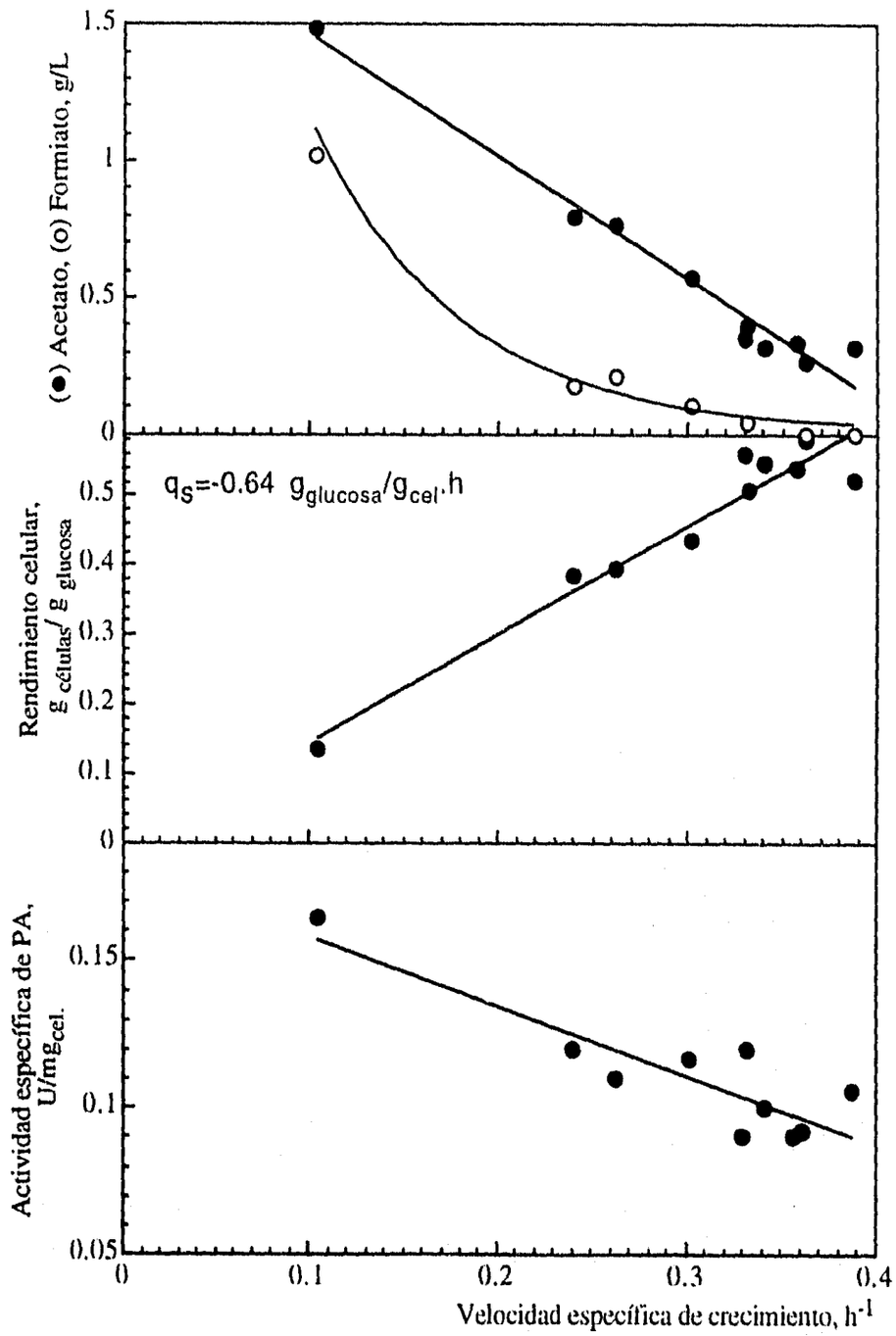


Figura 5-21. Efecto de la velocidad específica de crecimiento (obtenida mediante la limitación por oxígeno) sobre la producción de ácidos orgánicos, el rendimiento celular y la actividad específica de PA, medidos al agotamiento de glucosa.

5.4 Cultivos a TOD oscilante

Una vez establecidas las condiciones operacionales para el buen funcionamiento del simulador, como son, velocidades de agitación de 500 rpm y aireación de 0.6 vvm, se realizaron cultivos variando el eje y la amplitud de la oscilación. En todos los casos, el período se mantuvo constante a 400 s, debido a que es el período más pequeño que se puede utilizar con la configuración del simulador provisto de las cámaras de humedad. El *setpoint* utilizado fue el perfil cuadrado, por presentar respuestas más rápidas.

En la **figura 5-22** se muestra un cultivo típico de *E. coli* a TOD oscilante (E=2.5 %, A= 2.5 % y Ω =400 s), el resto de los cultivos se muestran en el **apéndice G**. La **figura 5-22a** muestra la composición de los gases a la entrada del bioreactor. Se observa un perfil oscilatorio, necesario para generar las fluctuaciones en el oxígeno disuelto. Se puede apreciar que a medida que transcurre el tiempo, el porcentaje de aire en la fase gaseosa aumenta en forma exponencial (un ampliación se muestra en la **figura 5-23**). El aumento exponencial se debió a la demanda de oxígeno por los microorganismos en crecimiento. Aproximadamente a las 11 h de cultivo, el porcentaje de aire de la fase gaseosa cae drásticamente, indicando el agotamiento de glucosa. Una evaluación puntual de la VCO de cultivos con fluctuaciones de TOD, mediante la medición del oxígeno en la fase gaseosa, podría resultar de gran utilidad para estimar en línea el estado del bioreactor, por ejemplo, el agotamiento de nutrientes, contaminaciones o cambios en el estadío metabólico. La **figura 5-22b** muestra el perfil de TOD durante el cultivo. En general, se lograron oscilaciones de 0 a 5 %, como era lo esperado. A las 2 h de cultivo, la amplitud de la onda cambió de 2.5 a 1 % de TOD, debido a que el controlador no fue capaz de satisfacer la demanda de oxígeno y a la vez mantener la TOD deseada. Tal comportamiento se debe a la rigidez de los controladores PID que asumen una dinámica constante durante todo el proceso. A las 3.5 h de cultivo, se modificaron las constantes de control, utilizando los valores propuestos para la fase exponencial (control adaptativo manual). Se observa que en ese momento, la amplitud de la onda cambió de 1 a 2.5 % TOD. Los controladores adaptativos automáticos, podrían ser un alternativa para eliminar eventos de esta naturaleza, ya que los algoritmos adaptativos evalúan la dinámica de los procesos continuamente y así se ajustan las constante de control más adecuadas de manera automática. En la **figura 5-24** se muestra una ampliación del perfil de TOD durante la fase exponencial y el *setpoint* que lo generó. Se observa que, en general, se logró oscilar entre 0.4 y 5 % (el *setpoint* fue: E= 2.5, A= 2.5 % de TOD). Sin embargo, la señal de salida presentó un desfase (respecto al *setpoint*) de entre 150 y 200 s, que para fines prácticos carece de importancia.

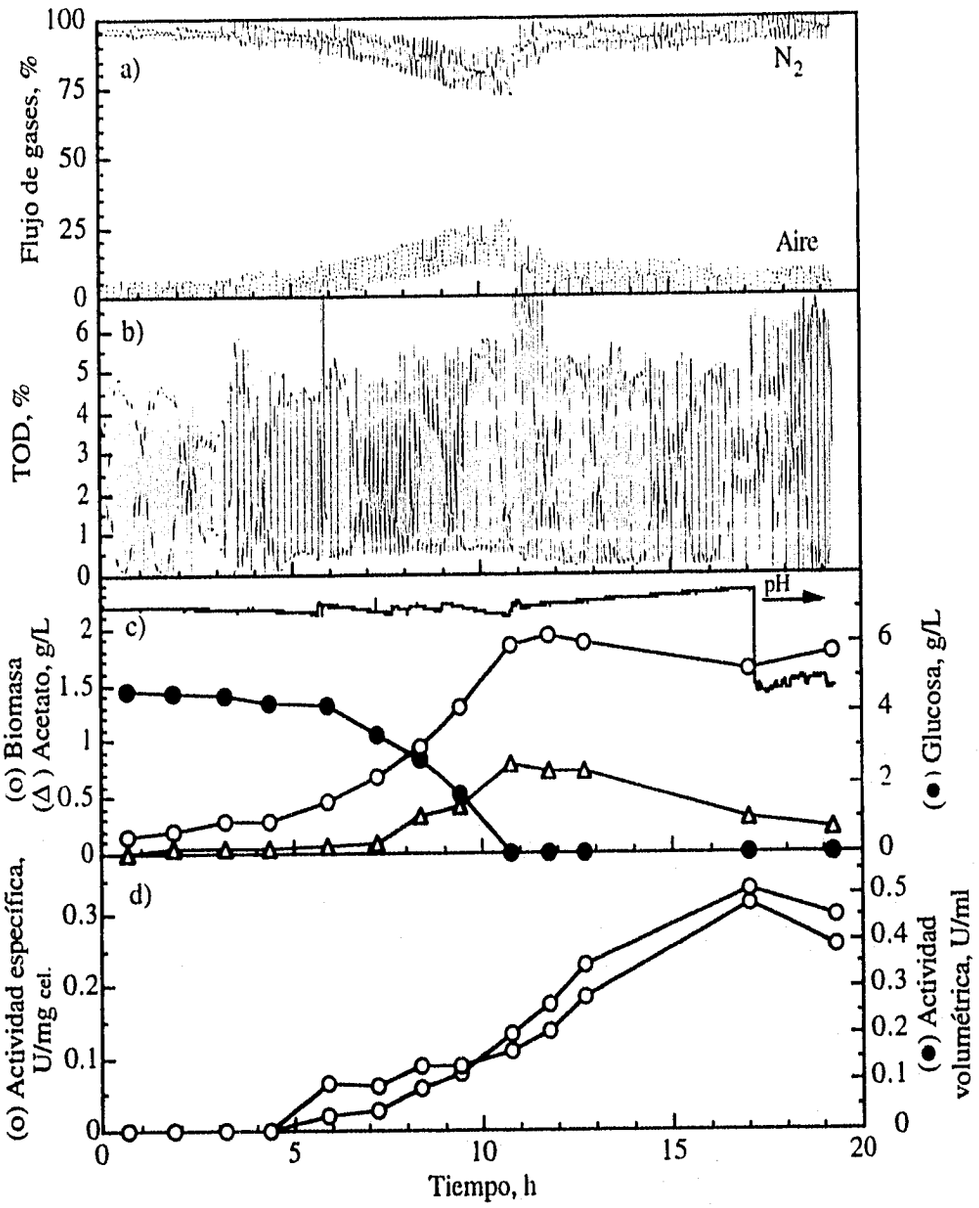


Figura 5-22. Cinética de crecimiento a TOD oscilante (E=2.5 %, A= 2.5 % y Ω =400 s).

La **figura 5-22c** muestra las cinéticas de crecimiento, de consumo de glucosa y de generación de acetato durante el cultivo a TOD oscilante. Se observa que la formación de acetato está asociada al crecimiento, alcanzando una concentración máxima de 0.75 g/L. La biomasa alcanzada al final de la fase exponencial fue de 2.9 g/L. En cuanto a la formación de producto, en la **figura 5-22d** se observa que la actividad específica de PA (al agotamiento de la glucosa) fue de 0.11 U/$mg_{cel.}$ y la actividad volumétrica de 0.21 U/ml. Cabe resaltar que la actividad enzimática continúa aumentando como consecuencia del procesamiento del precursor de PA, acumulado durante el crecimiento (situación que se discutirá más adelante). Sin embargo, debido a la diferencia de tiempos entre los cultivos a las distintas condiciones, se tomó arbitrariamente como punto de comparación el valor de actividad específica registrado al agotamiento de glucosa. Se observa que a las 15 h de cultivo, la actividad enzimática presentó un decaimiento como consecuencia de una perturbación en el control de pH (**figura 5-22c**).

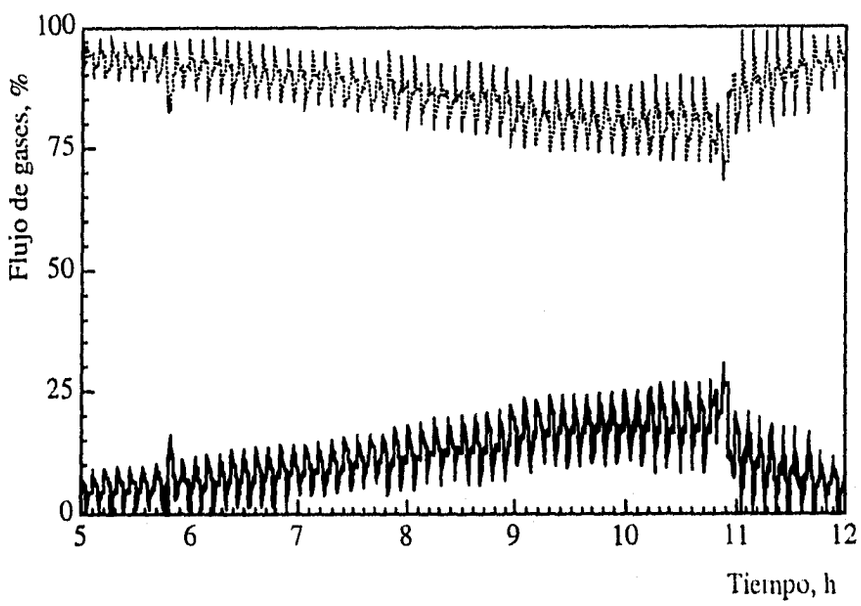


Figura 5-23. Composición de los gases a la entrada del bioreactor durante un cultivo a TOD oscilante (E = 2.5 %, A = 2.5 %, Ω = 400 s).

La **figura 5-25** resume los resultados de velocidad de crecimiento y rendimiento celular de los cultivos a TOD oscilante. La **figura 5-26** muestra los datos de producción de PA y ácidos orgánicos tanto a TOD constante como oscilante. Se observa que todos los parámetros de los cultivos con fluctuaciones (referidos al eje de oscilación), son muy similares a las tendencias de

los cultivos control (TOD constante) mostrados como línea continua. Lo anterior hace suponer que las oscilaciones de oxígeno disuelto no afectaron importantemente el comportamiento cinético del microorganismo durante la fase exponencial. Al parecer, el valor promedio de TOD (eje de oscilación) es el que determina el comportamiento del cultivo. Una estrategia de fermentación, basada en interrupciones programadas en la agitación o en la aireación (incluso en ambos), puede ser utilizada en bioreactores de gran escala, con la finalidad de reducir los consumos de energía durante el proceso de fermentación. Tal estrategia, permitiría reducir los costos de operación, sin afectar el rendimiento de los productos de interés. Por el contrario, como se discutirá más adelante, el uso de la interrupciones programadas de agitación o aireación, podrían incluso aumentar la producción de la PA.

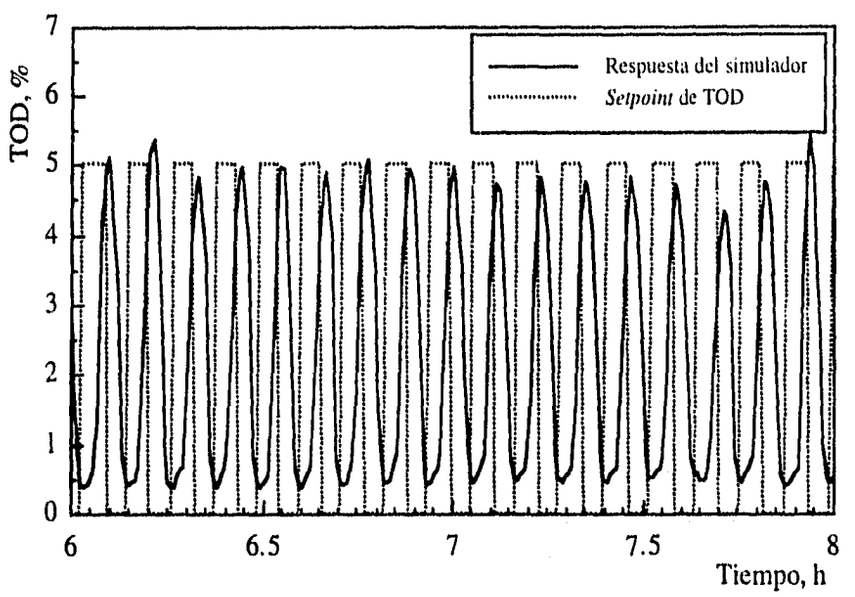


Figura 5-24. *Setpoint* cuadrado y respuesta del simulador durante un cultivo a TOD oscilante (E= 2.5 %, A= 2.5 % y Ω = 400 s).

Debido a la escasa información en donde se reporta la influencia del TOD oscilante sobre sistemas de expresión recombinante, no existe un patrón adecuado de comparación. Sin embargo, los resultados obtenidos con PA son congruentes con el trabajo de Namdev y col. (1993), que reportaron que la producción de β-galactosidasa por *E. coli* Dh5α/pUC19 no se afectó por la presencia de fluctuaciones al azar en la TOD. Por el contrario, en otro trabajo se reportó que la producción de β-galactosidasa de *S. cerevisiae* YN124/pLG669-z, aumentó al doble cuando los cultivos en quimiostato fueron sometidos a oscilaciones de TOD (Caunt y col.,

1990). Sin embargo, es importante remarcar que la PA es una enzima con propiedades muy particulares. La PA es de las pocas proteínas de procariotes que presentan procesamiento post-traduccional, no así la β-galactosidasa. Por otra parte, el comportamiento de los sistemas de expresión recombinante en eucariotes (por ejemplo levaduras) no es necesariamente extrapolable a otros procesos (*v.g.* organismos procariotes).

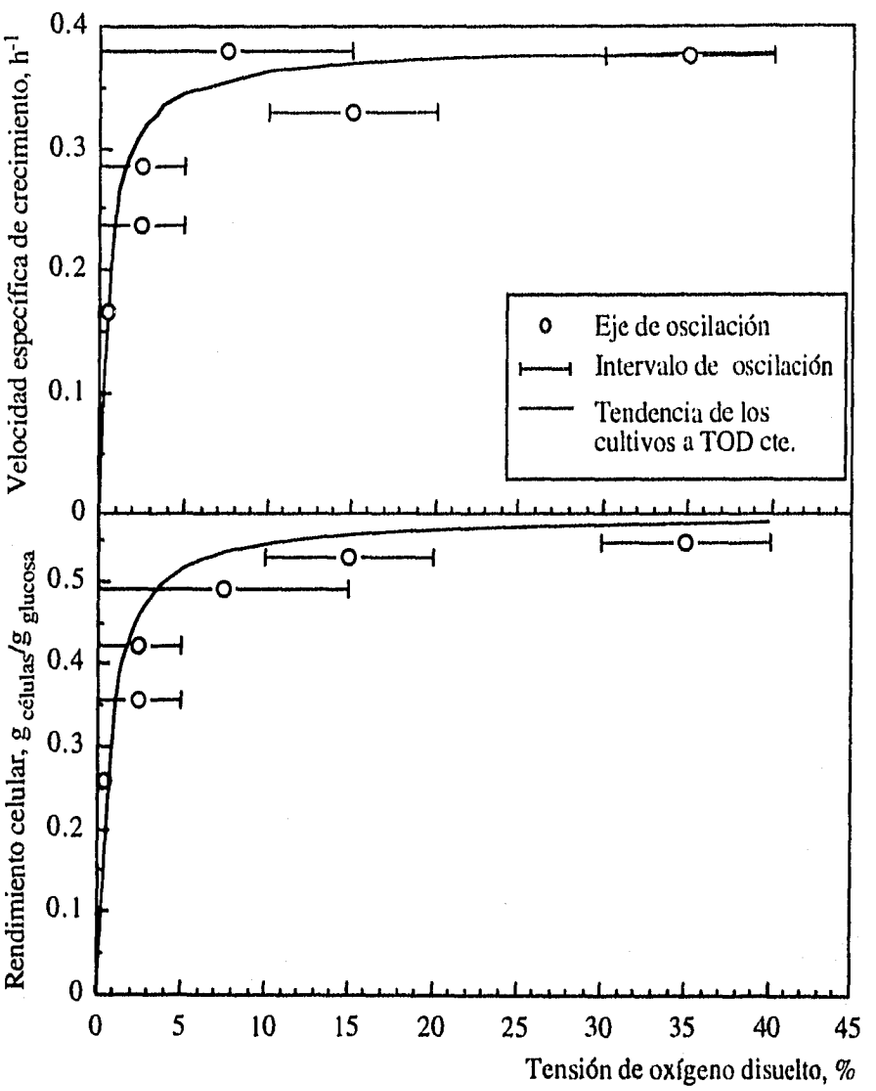


Figura 5-25. Efecto del eje de oscilación sobre la velocidad específica de crecimiento, el rendimiento celular y la actividad específica de PA al agotamiento de glucosa. La barra (|——|) indica los niveles de TOD a los cuales se osciló.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

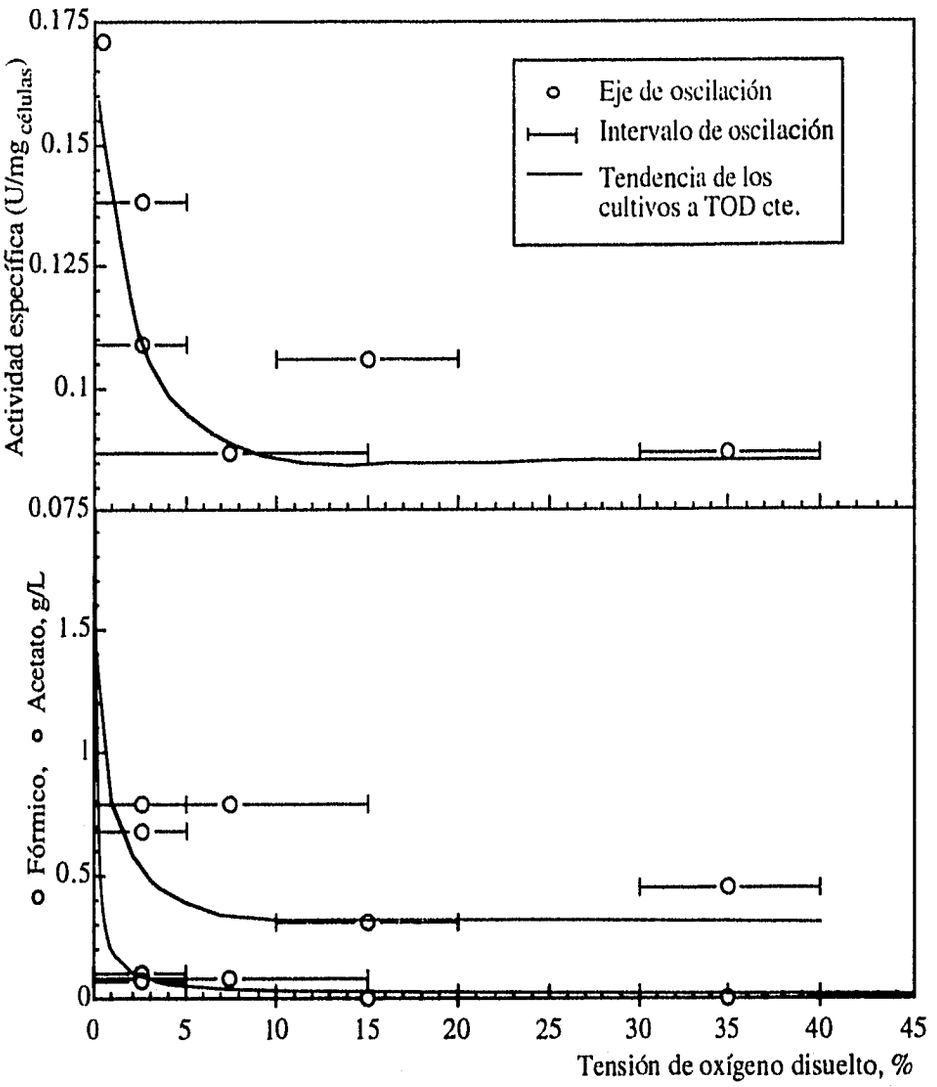


Figura 5-26. Efecto del eje de oscilación sobre la producción PA y ácidos orgánicos. La barra (|——|) indica los niveles de TOD a los cuales se osciló.

Con la finalidad de predecir cual es el comportamiento puntual del los cultivos con TOD oscilante, se modelaron estos cultivos mediante simulación numérica.

Para simular la cinética de crecimiento con fluctuaciones de oxígeno se utilizaron las ecuaciones fundamentales de crecimiento y formación de producto (ecuaciones 5-3, 5-4 y 5-5) y el algoritmo de resolución de ecuaciones diferenciales simultáneas de Runge-Kutta (**apéndice H**). La velocidad específica de crecimiento y el rendimiento celular fueron estimados puntualmente

para cada tensión de oxígeno, ya que como se demostró en la sección 5.3, ambos parámetros son función de la tensión de oxígeno. La velocidad de crecimiento fue estimada utilizando la ecuación de Monod con dos sustratos limitantes (glucosa y oxígeno) y el rendimiento fue calculado utilizando la ecuación 5-2. Las ecuaciones resultantes, una vez de incorporar el perfil oscilatorio de la TOD, son las enumeradas como 5-6 y 5-7, respectivamente. Las constantes de la ecuación de Monod fueron las estimadas en la sección 5.3 (para oxígeno) y las reportadas por Zamora (1994) para glucosa. Para la actividad enzimática (AE) se utilizó la cinética de Luedeking-Piret (α = 33 U/$g_{cel.}$ y β = 19 U/$g_{cel.}$.h), propuesta por Zamora (1994) y utilizando las constantes estimadas para el cultivo a TOD oscilante (E = A =2.5 %, P = 400 s).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \tag{5-3}$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu X}{Y_{x/s}} \tag{5-4}$$

$$\frac{dAE}{dt} = (\alpha\mu + \beta)X \tag{5-5}$$

$$\mu = \mu_{max}\left[\frac{S}{Ks+S}\right]\left[\frac{\left[E + ASin\left(\frac{2\pi t}{\Omega}\right)\right]}{Ko_2 + \left[E + ASin\left(\frac{2\pi t}{\Omega}\right)\right]}\right] \tag{5-6}$$

$$Y_{x/s} = Y_{x/s(max)}\left[\frac{\left[E + ASin\left(\frac{2\pi t}{\Omega}\right)\right]}{K_{x/s} + \left[E + ASin\left(\frac{2\pi t}{\Omega}\right)\right]}\right] \tag{5-7}$$

La **figura 5-27** muestra la simulación numérica de un cultivo a TOD oscilante. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas continuas los datos de la simulación. Se observa que existe buena similitud entre los valores experimentales y los obtenidos numéricamente. Cabe resaltar que la curva de crecimiento presenta un incremento escalonado, debido a las variaciones en la velocidad específica de crecimiento, la cual fue influenciada por el perfil oscilatorio del oxígeno disuelto. La **figura 5-28** muestra una ampliación de los datos y se puede apreciar mejor el crecimiento escalonado.

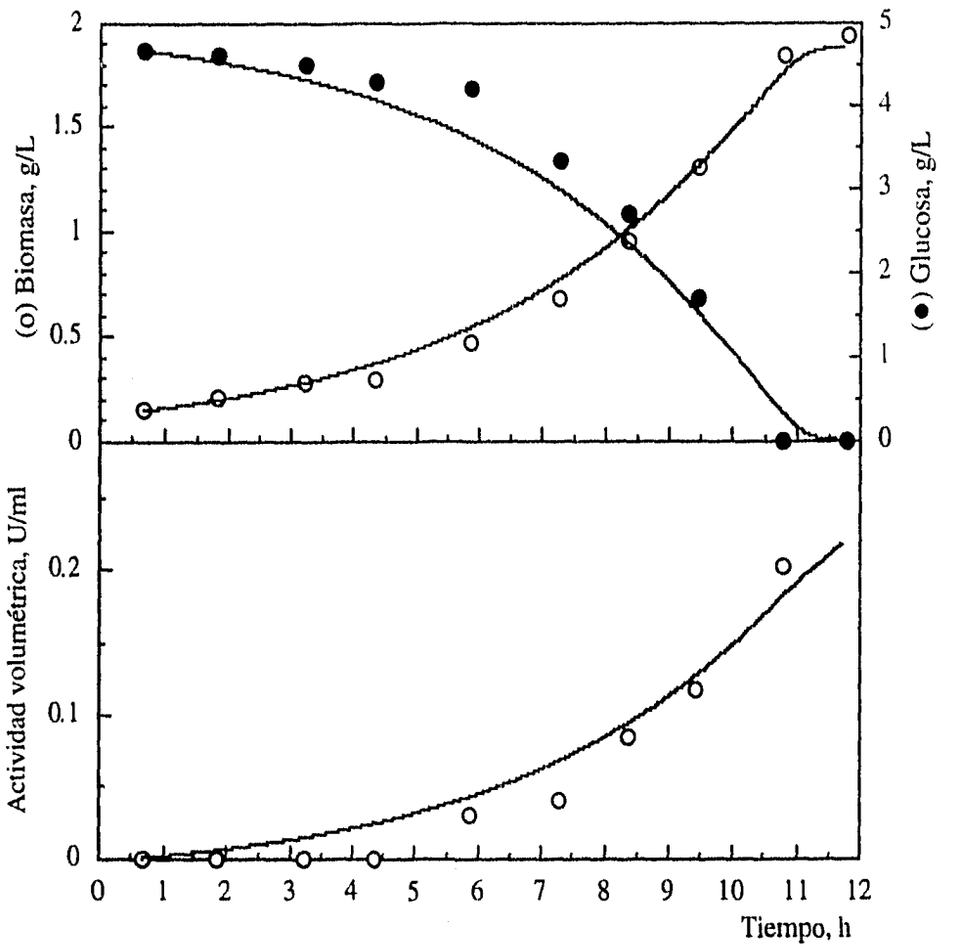


Figura 5-27. Simulación numérica de un cultivo a TOD oscilante (E= 2.5%, A = 2.5% y Ω = 400 s). Las líneas representan los datos de la simulación.

El modelamiento matemático predice que en realidad se obtiene un perfil oscilatorio en la velocidad específica de crecimiento (**figura 5-29**), originado por las fluctuaciones de TOD. La μ medida a través del muestreo de densidad óptica fue de 0.28 h^{-1}.

Shaforostova y col., (1973) reportaron la presencia de irregularidades en la μ de diferentes microorganismos (entre ellos *E. coli*). Demostraron que la μ durante la fase estacionaria no es un valor constante, sino que, por el contrario, presenta una tendencia oscilatoria, debido a la sincronía del crecimiento aún en condiciones no limitantes. Caunt y col. (1990), concluyeron que la estabilización de plásmido pLG669-Z en *S. cerevisiae*, fue el resultado de las oscilaciones de la velocidad específica de crecimiento, forzadas mediante cambios periódicos en el oxígeno

disuelto. Por otra parte, al comparar los tiempos característicos de las reacciones biológicas (control de m-RNA, inducción de enzimas, etc.), que oscilan entre 10 y 100 s (Sweere y col., 1987), se observa que son menores que el período de la oscilación de TOD (400 s) utilizado en este trabajo. Como se discutió en la sección 2.2.2, los fenómenos de transporte son los que controlan al sistema. Lo anterior explica la naturaleza oscilatoria de μ en función de las fluctuaciones de TOD. Tal efecto solo será visible en ventanas de tiempo muy pequeñas (*v.g.* μ puntual, acumulación de precursor de PA), ya que como se discutió anteriormente, las oscilaciones de TOD a 400 s, no afectan el comportamiento de los cultivos, cuando se analizan en ventanas de tiempo grandes (*v.g.* rendimiento celular, μ global).

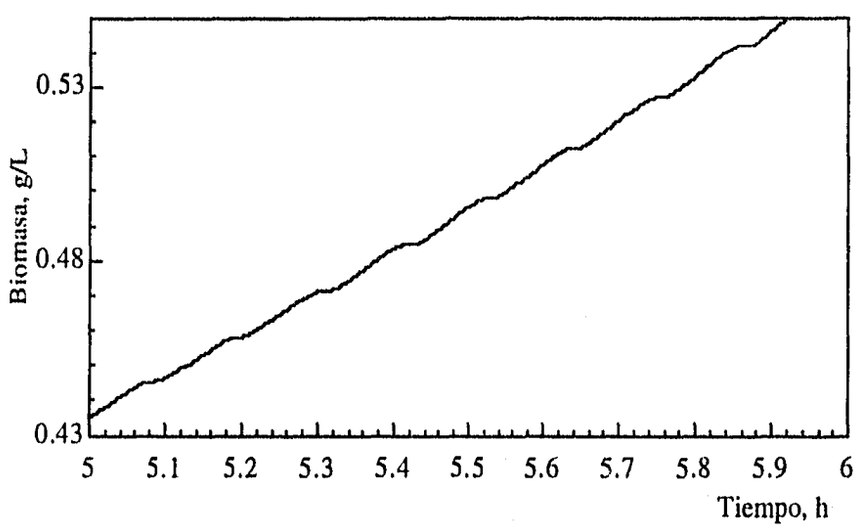


Figura 5-28. Crecimiento escalonado como consecuencia de las oscilaciones de TOD.

Una forma práctica de demostrar la presencia de condiciones cambiantes en la μ en cultivos con TOD oscilante, podría ser a través del monitoreo en línea la densidad óptica "*in situ*" con un sensor apropiado. Tales observaciones podrían confirmar o descartar el modelo propuesto por las ecuaciones 5-6 y 5-7.

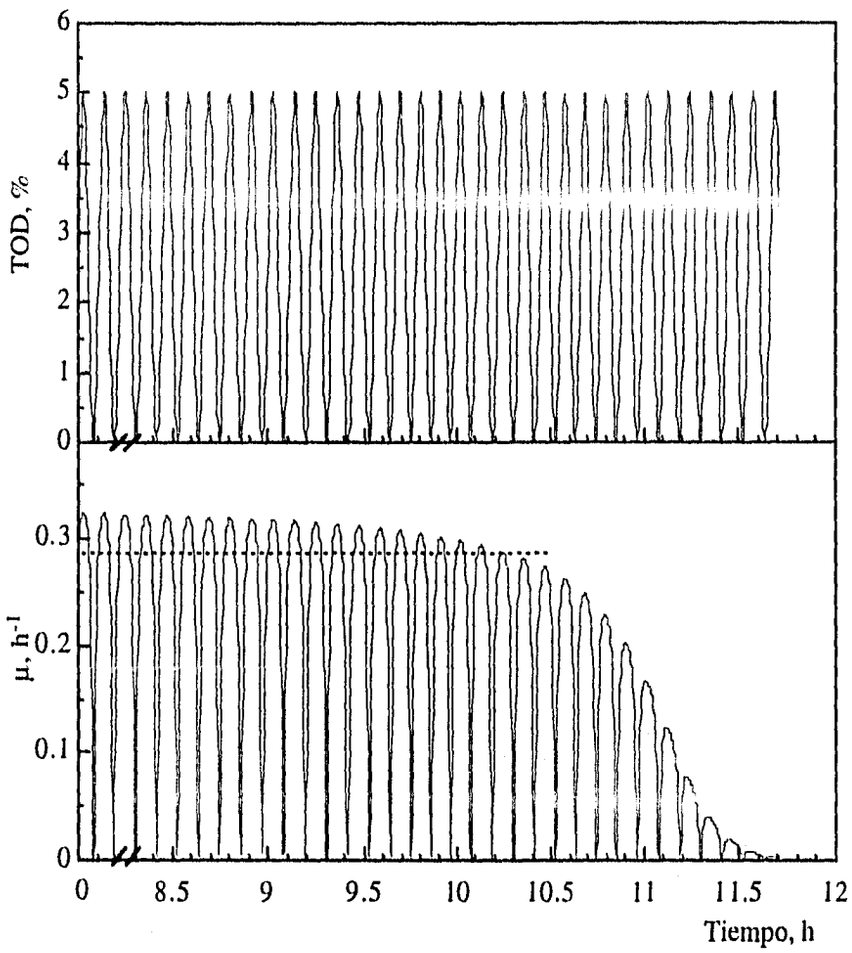


Figura 5-29. TOD oscilante y μ puntuales obtenidas para la simulación numérica del cultivo a TOD oscilante (E = 2.5%, A= 2.5% y Ω =400 s). La línea punteada (---) representa la μ experimental obtenida mediante los datos de biomasa medida cada hora.

5.5 Efecto de las condiciones de incubación sobre el procesamiento del precursor de PA

En la **figura 5-30** se muestra una cinética de crecimiento a 0.8 % TOD, en donde se prolongó el tiempo de cultivo hasta 26 h. Se observa que durante la etapa de crecimiento exponencial, la actividad volumétrica de PA sigue muy de cerca a la curva de crecimiento. Sin embargo, cuando el cultivo ha llegado a fase estacionaria, la actividad enzimática continúa aumentando en forma lineal. Nagalakshimi y Pai (1994), reportaron que la actividad específica de PA puede aumentar

incluso al doble debido a un aumento en la permeabilidad celular, ya sea por ruptura celular o por la adición de detergentes catiónicos como el bromuro de N-acetil trimetil amonio (CTAB). Tal aumento se debe a que al permeabilizar la membrana celular externa, se reducen los problemas difusionales del sustrato al interior del espacio periplásmico que es donde se lleva a cabo la reacción.

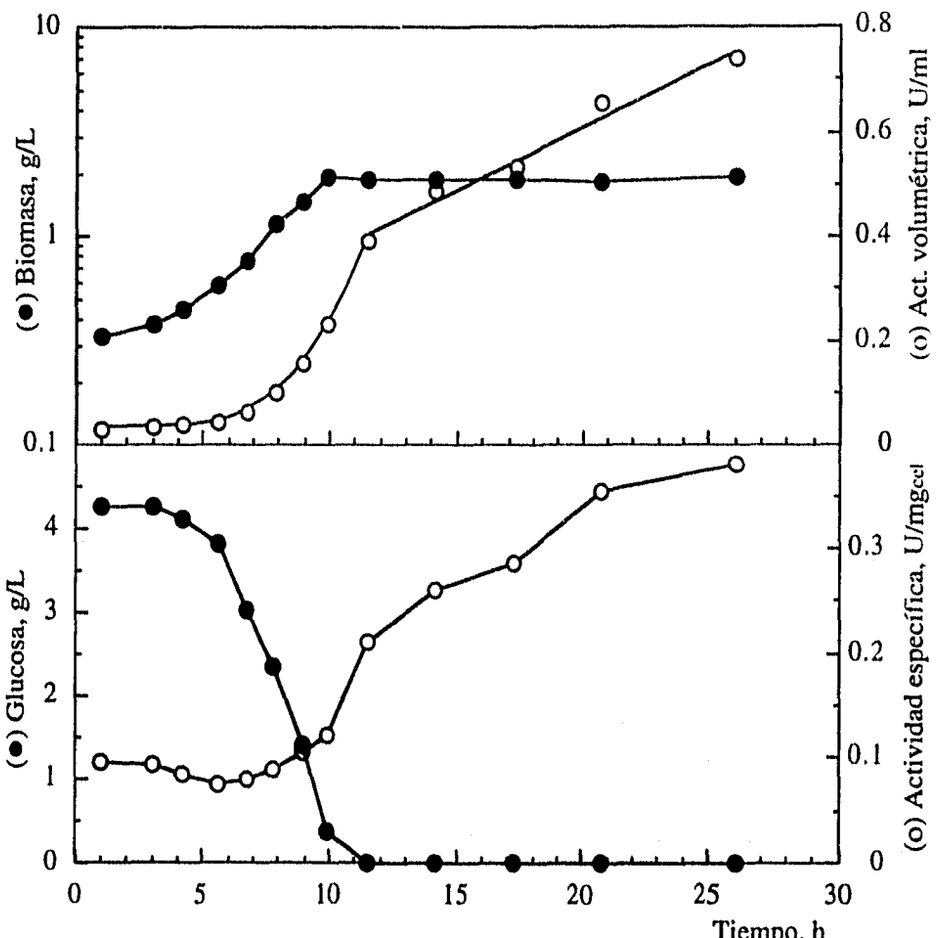


Figura 5-30. Aumento en la actividad enzimática en la fase estacionaria de un cultivo lote.

Con la finalidad de descartar si el aumento en la actividad de PA se debe a un aumento en la permeabilización de la membrana externa (debido a envejecimiento celular), se tomaron muestras durante las diferentes etapas del cultivo para la determinación de actividad enzimática. Una fracción de las muestras fue lisada mediante sonicación para liberar completamente el contenido periplásmico e intracelular antes de medir la actividad enzimática.

En la **figura 5-31** se muestra la actividad específica de PA de las muestras tanto de células lisadas (sonicadas) como células completas (no sonicadas). Se observa que la actividad específica fue aproximadamente un 3 % más alta en células sonicadas. Sin embargo, tal diferencia no es significativa. Lo anterior sugiere que el aumento en la actividad durante la fase estacionaria no se debe a lisis o permeabilización de la membrana celular.

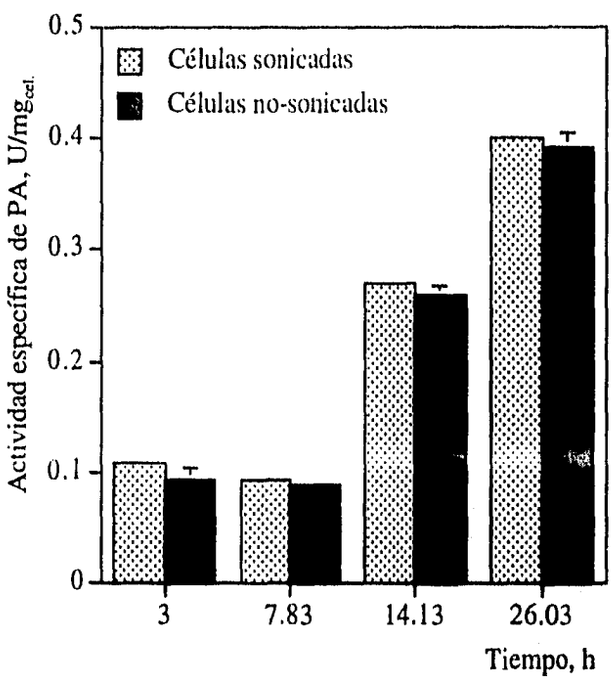


Figura 5-31. Efecto de la ruptura celular sobre la determinación de la actividad de PA. Las muestras no sonicadas corresponden al promedio de dos determinaciones independientes.

Con la finalidad de evaluar las condiciones que afectan o favorecen el procesamiento del precursor de PA, se drenó caldo de cultivo una vez que se agotó la glucosa. Las células obtenidas se colocaron en matraces y se incubaron por 12 h, a diferentes condiciones de pH, concentración de ácido acético y oxígeno.

La **figura 5-32** muestra los valores de actividad enzimática al agotamiento de glucosa (actividad residual) y la actividad obtenida después de la maduración (procesamiento) a pH 6, 7 y 8. Se observa que en los tres ensayos, la actividad específica de PA aumentó de 0.11 a 0.22 U/mg$_{cel.}$. Lo anterior sugiere que el pH, en el intervalo de 6 a 8, no influye en el procesamiento del precursor de PA.

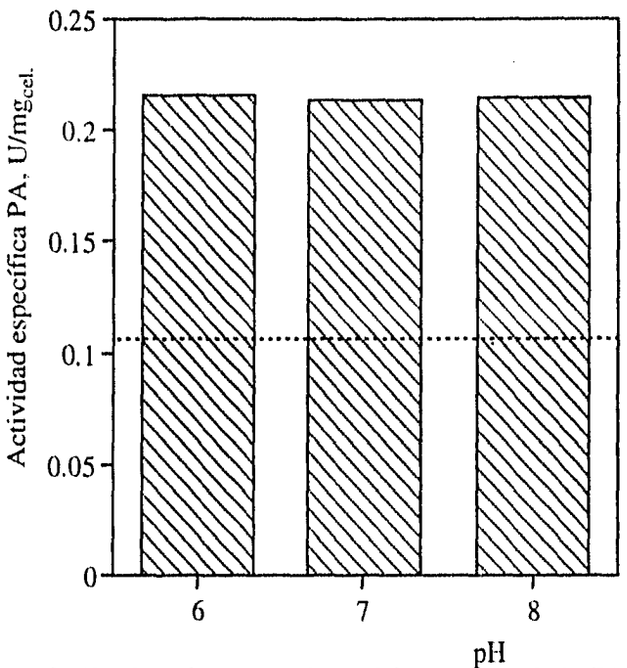


Figura 5-32. Efecto del pH sobre el procesamiento del precursor de la PA, (---) actividad al agotamiento de glucosa.

La **figura 5-33** muestra el efecto de la concentración de ácido acético sobre el procesamiento. Se observa que en ausencia de acetato, la actividad aumentó de 0.11 a 0.41 U/mg$_{cel}$. A medida que la concentración de acetato aumentó, la actividad específica disminuyó, por ejemplo, en presencia de acetato (1.7 g/L), la actividad aumentó de 0.11 a 0.33 U/mg$_{cel}$. En general, los resultados sugieren que el ácido acético tuvo un ligero efecto inhibitorio sobre el procesamiento.

La **figura 5-34** muestra el aumento en la actividad de PA durante la fase estacionaria de cultivos con diferentes composiciones de oxígeno a la entrada. Se observa que el matraz incubado en anaerobiosis (0 % de oxígeno), la actividad específica de PA se incrementó de 0.09 U/mg$_{cel.}$ a 0.11 U/mg$_{cel.}$, lo que representa un aumento del 27 %. Mientras que en el matraz aireado con 9.1 % de oxígeno en la fase gaseosa (40 % TOD aproximadamente), el incremento en la actividad fue de 0.09 U/mg$_{cel.}$ a 0.41 U/mg$_{cel.}$, que corresponde a un aumento de más del 300 %. Cuando las células se incubaron con 21 % de oxígeno (100 % TOD aproximadamente), se logró un incremento del mismo orden de magnitud que a 9.1 % de oxígeno.

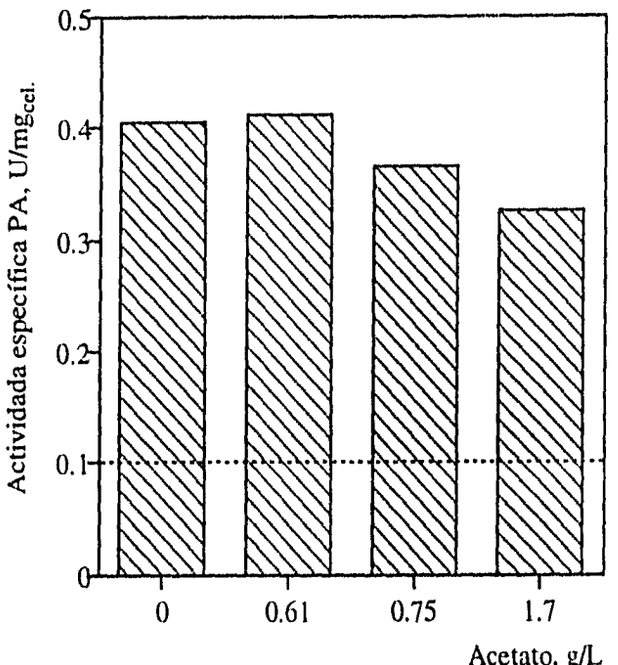


Figura 5-33. Efecto del acetato sobre el procesamiento del precursor de la PA, (---) actividad al agotamiento de glucosa.

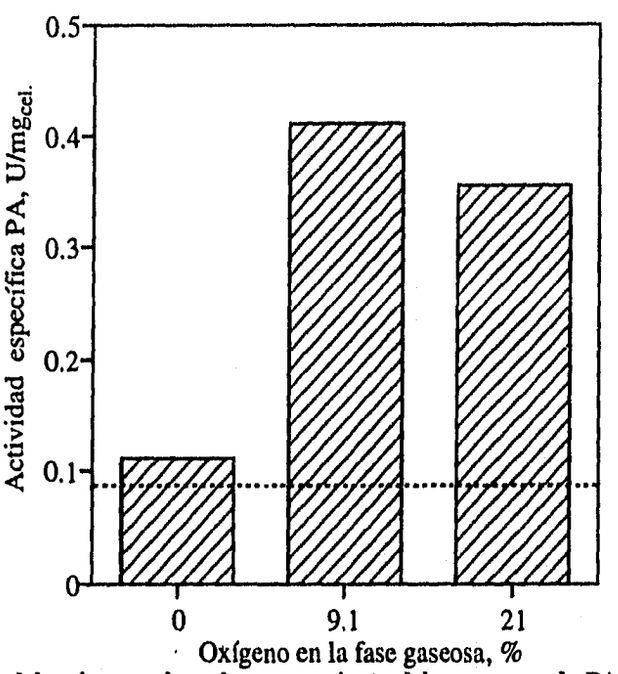


Figura 5-34. Efecto del oxígeno sobre el procesamiento del precursor de PA, (---) actividad al agotamiento de glucosa.

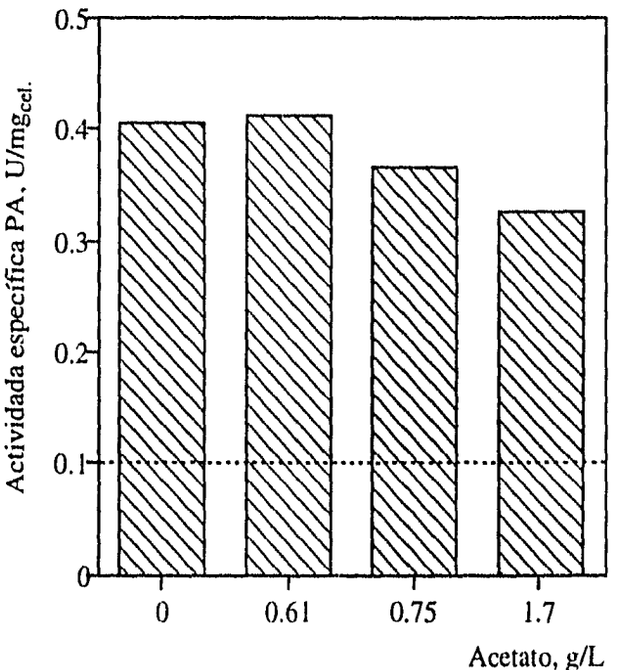


Figura 5-33. Efecto del acetato sobre el procesamiento del precursor de la PA, (---) actividad al agotamiento de glucosa.

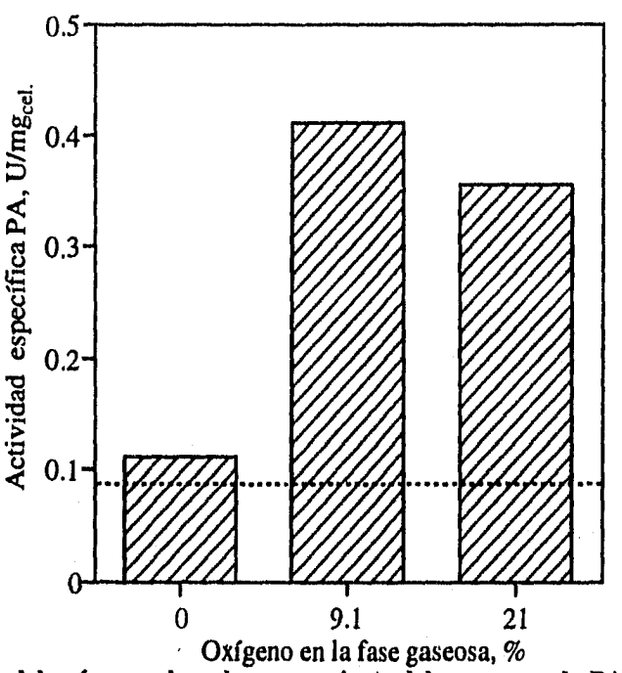


Figura 5-34. Efecto del oxígeno sobre el procesamiento del precursor de PA, (---) actividad al agotamiento de glucosa.

En base a los resultados, se puede concluir que, de los parámetros evaluados, el oxígeno interviene de manera más importante que otros parámetros como el pH y la concentración de metabolitos de desecho (*i.e.* el ácido acético). El mecanismo de acción del oxígeno sobre el procesamiento no está claro, posiblemente se trate de un efecto del potencial redox del medio de cultivo, ya que al cambiar la tensión de oxígeno se altera el par O_2/H_2O, que es el par redox más importante en el cultivo. Cabe enfatizar que los resultados, concuerdan con los demás cultivos realizados y que se muestran en los **apéndices F** y **G**.

A la fecha no hay reportes en donde se demuestre la importancia del oxígeno en el procesamiento post-traduccional de proteínas. Sin embargo, se sabe que la presencia de sustancias no metabolizables como el glicerol o la sacarosa favorecen la acumulación del precursor de PA en el espacio periplásmico (Scherrer y col.,1994).

5.6 Efecto conjunto del TOD oscilante y la maduración

Según los resultados mostrados en secciones anteriores, se puede concluir que a tensiones de oxígeno disuelto bajas, se favorece la producción de PA, sin embargo, el rendimiento celular es fuertemente afectado. Por otra parte, los estudios de maduración realizados en fase estacionaria, revelaron que el procesamiento se favorece de manera importante por tensiones de oxígeno altas. Un efecto combinado puede estar dado por condiciones cambiantes de oxígeno. Es decir, es posible favorecer la producción de la enzima y la acumulación del precursor mediante la exposición a tensiones de oxígeno bajas, y favorecer el proceso de maduración mediante tensiones altas de oxígeno disuelto.

La figura 5-35 compara la cinética de crecimiento y de producción bajo dos condiciones; la primera considerada como control, en donde el oxígeno disuelto se mantuvo constante a 40 % TOD y otro cultivo con fluctuaciones de oxígeno (E = 15 %, Ω = 400 s, A = 5 % durante la fase de crecimiento y A = 15 % para la fase estacionaria). Se observa que la curva de crecimiento, consumo de sustrato y actividad específica de PA (durante la fase exponencial) son muy similares. Sin embargo, en la fase estacionaria, el cultivo a TOD constante presentó un aumento en la actividad de PA de 0.09 a 0.14 $U/mg_{cel.}$, incremento que no es muy importante, mientras que el cultivo con fluctuaciones de TOD, mostró un aumento en la actividad de 0.09 hasta 0.4 $U/mg_{cel.}$, lo que representa un aumento de más del 300 %. La diferencia en los incrementos de actividad entre ambos cultivos, sugiere que, condiciones fluctuantes de TOD,

favorecen la síntesis y acumulación del precursor de PA. Tal aseveración está basada en los resultados de actividad enzimática. Sin embargo, la cuantificación del precursor de PA, sería una forma más rigurosa de demostrar que las oscilaciones de TOD influyen en la síntesis del precursor de PA.

En la **figura 5-36** se muestra un evento similar al descrito anteriormente. En este caso, el cultivo se mantuvo fluctuando entre 0 y 15 % TOD (E = 7.5 % y A = 7.5) y el control utilizado fue el cultivo a 10 % TOD. Nuevamente, se observó la misma velocidad específica de crecimiento (0.35 h^{-1}) entre ambos cultivos. El desfase entre las curvas, se debe muy posiblemente a las diferencias en la viabilidad de los inóculos. En cuanto a la formación de producto, se observa que el perfil de actividad específica es muy similar durante la fase exponencial: en ambos casos la actividad al agotamiento de glucosa fue de 0.09 $U/mg_{cel.}$. Sin embargo, en la etapa post-fermentativa, la actividad específica aumentó a 0.22 $U/mg_{cel.}$, para el cultivo control (10 % TOD). El cultivo a TOD oscilante, por otra parte, presentó un aumento de 0.09 a 0.48 $U/mg_{cel.}$, lo que representa un incremento de más de 400 %. De igual forma, la actividad volumétrica aumentó de 0.25 a 0.45 U/ml para el cultivo a TOD constante y de 0.25 a 0.95 U/ml para el cultivo a TOD oscilante. Los resultados anteriores, apoyan el modelo de la velocidad específica de crecimiento oscilatoria, propuesto por las ecuaciones 5-6 y 5-7. La estrategia de fermentación, que propone reducir la velocidad específica de crecimiento, mediante bajas tensiones de oxígeno y la exposición a altas tensiones de oxígeno para favorecer el procesamiento del precursor de PA, está respaldado por los resultados mostrados en las **figuras 5-35 y 5-36**. Resultados similares fueron observados por Ramírez y col (1994a), quienes reportaron una actividad específica de PA de 2 $U/mg_{proteína}$ en cultivos exponencialmente alimentados, donde la velocidad específica de crecimiento fue controlada a 0.01 h^{-1}, mediante la limitación por glucosa y manteniendo la TOD a 40 %.

Los resultados reportados en este trabajo sugieren, que condiciones cambiantes en la tensión de oxígeno (oscilaciones de TOD), favorecen la síntesis y procesamiento del precursor de la PA de manera importante.

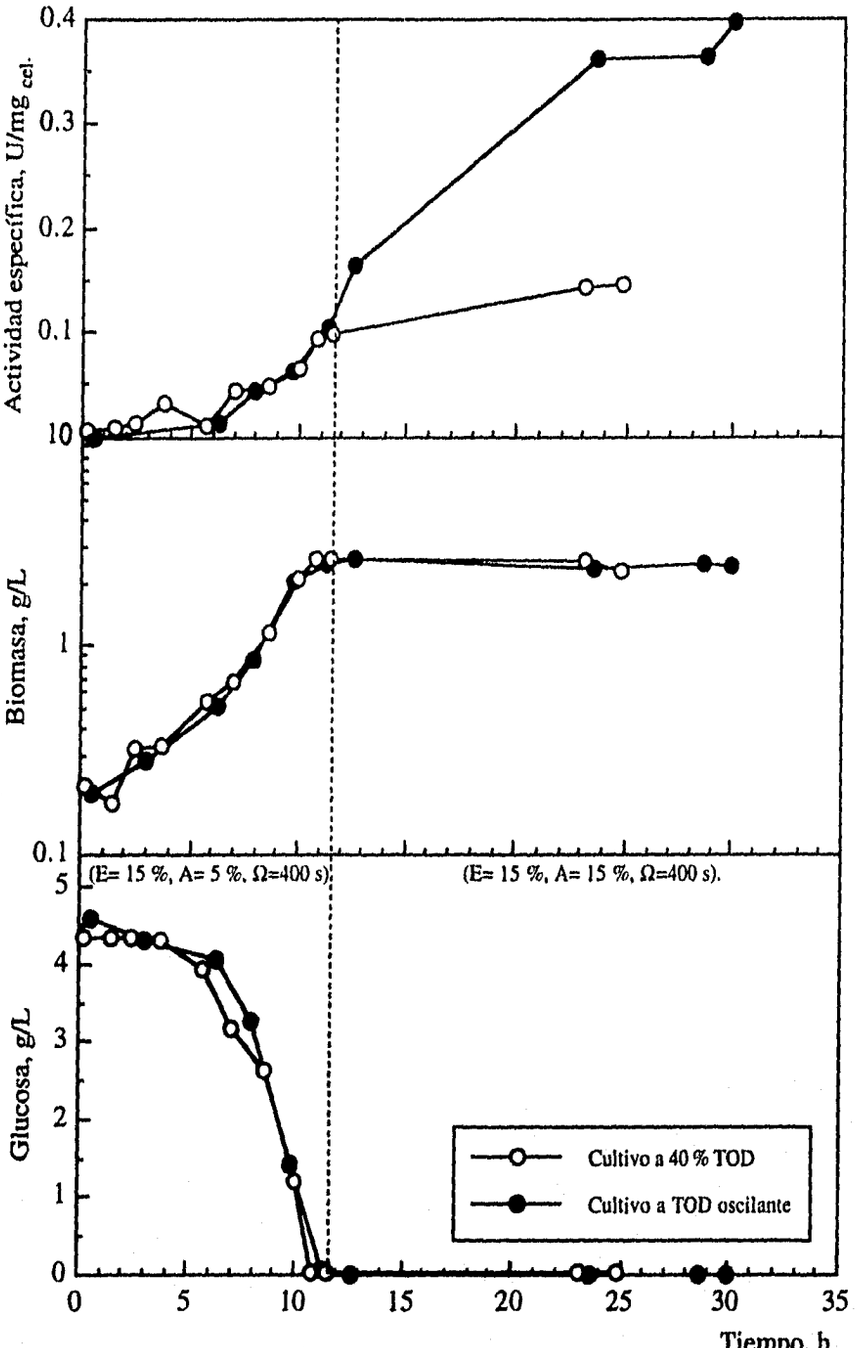


Figura 5-35. Comparación de la cinética de un cultivo a TOD constante a 40 % con un cultivo a TOD oscilante (E = 15 %, Ω = 400 s A = 5 % durante la fase de crecimiento y A = 15 % para la fase estacionaria).

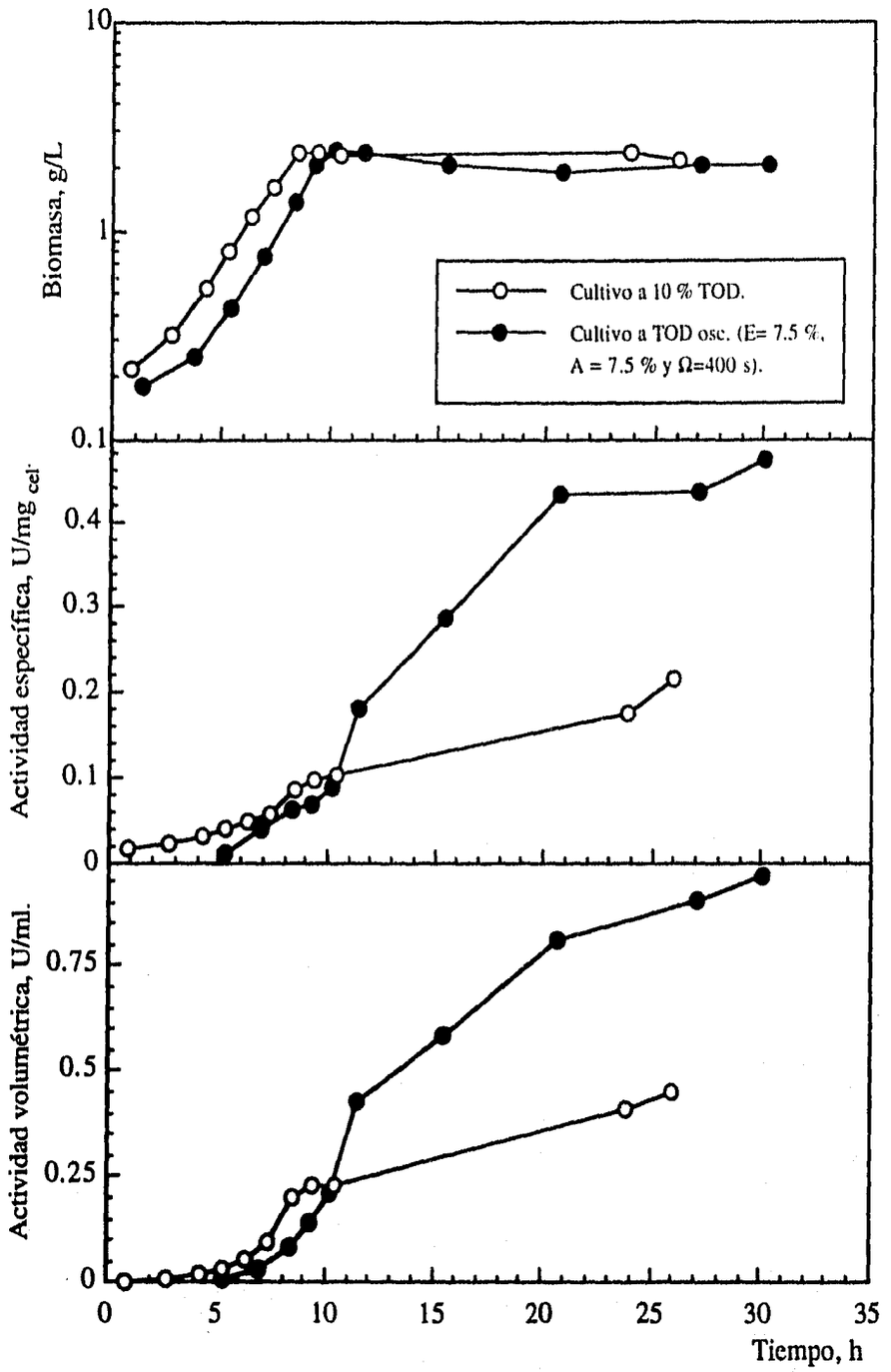


Figura 5-36. Comparación de la cinética de un cultivo a TOD constante de 10 % con un cultivo a TOD oscilante (E = 7.5 %, A = 7.5 % y Ω = 400 s).

Capitulo VI

Conclusiones y recomendaciones

Diseño y caracterización del sistema

El electrodo utilizado presentó un comportamiento dinámico de primer orden con una constante de tiempo (τ_E) de 18 s. El simulador desarrollado se caracterizó por tener una constante de tiempo de 27 s (k_La de 133 h^{-1}) por lo que solo será posible simular tiempos de circulación superiores a este valor. La limitación más importante está dada por el k_La (por ejemplo, para lograr simular un tiempo de circulación de 5 s, se requiere de un reactor con un k_La de más de 720 h^{-1}, valor que no es posible alcanzar con diseños convencionales). Sin embargo, los resultados que se pueden lograr con el simulador desarrollado, pueden ser de utilidad para obtener una aproximación del comportamiento bioquímico de los microorganismos ante la presencia de ambientes fluctuantes de oxígeno.

El simulador presentó su mejor desempeño utilizando el *setpoint* cuadrado, combinado con velocidades de agitación superiores a 500 rpm y aireación de 1,000 cm^3/min. Bajo tales condiciones de operación, el simulador se encuentra en la región turbulenta (Re >11,000), en donde presenta la máxima velocidad de respuesta que es capaz de alcanzar.

Con referencia a los aspectos de control, el simulador fue capaz de lograr perfiles oscilantes de TOD, presentando un desfase constante (inverso al período de oscilación que se quiera generar), lo cual carece de importancia para fines prácticos. La implementación del algoritmo PID permitió satisfacer la demanda de oxígeno durante las diferentes edades de los cultivos microbianos. Sin embargo, dadas las diferencias en el comportamiento dinámico en cada etapa,, la implementación de una subrutina de estimación continua de las constantes Kc, τ_I y τ_d (control adaptativo automático), sería de gran utilidad para garantizar controles de oxígeno más eficientes.

Aplicación del simulador al proceso de producción de PA

a) Cultivos a TOD constante

La velocidad específica de crecimiento al igual que el rendimiento celular, mostraron un perfil de saturación en función de la TOD del cultivo (μ_{max} = 0.38 h^{-1},K_{O_2} = 0.54 % TOD y

$Yx/s_{(max)}$ = 0.54 $g_{cel.}/g_{glucosa}$ y $K_{x/s}$ =0.67 % TOD, respectivamente). La actividad de PA (medida al agotamiento de glucosa) se favoreció a tensiones por debajo de 5 %, logrando el doble de la actividad respecto al valor alcanzado (0.09 $U/mg_{cel.}$) en los cultivos no limitados por oxígeno (tensiones superiores a 5 %). El incremento en la actividad enzimática, se debió a la disminución de la velocidad específica de crecimiento, mediante la limitación de oxígeno, resultados que concuerdan con los cultivos lote alimentados limitados por glucosa, reportados por Ramírez y col. (1994a).

La ausencia de crecimiento en el cultivo anaerobio, se pudo deber a la ausencia de selenio y nitrato en el medio de cultivo. Sin embargo, se recomienda descartar la posibilidad de que se trate de un cepa mutante que no exprese las enzimas involucradas en el metabolismo anaerobio.

La aparición de metabolitos secundarios (acetato y formiato pricipalmente) se debió al efecto *Pasteur*, que se presenta a tensiones de oxígeno por debajo de la concentración crítica, mientras que la generación de acetato a tensiones no limitantes se debió al efecto *Crabtree*.

b) Cultivos a TOD oscilante

La similitud entre las tendencias de los parámetros cinéticos y de producción de PA y de otros metabolitos (acetato y el ácido fórmico), tanto a TOD constante como oscilante (hasta antes del agotamiento de glucosa), sugieren que, las oscilaciones de oxígeno no afectaron el sistema de expresión recombinante durante la fase exponencial.

Se demostró que es posible favorecer la producción de PA mediante la manipulación de la velocidad específica de crecimiento, a través del control de la TOD. Sin embargo, utilizando tal criterio se ve afectado el rendimiento. Por otra parte, los estudios en fase estacionaria revelaron, que el oxígeno participa de manera muy importante en el procesamiento del precursor de PA. Una estrategia de cultivo que combine ambos efectos: control de la velocidad específica de crecimiento mediante la limitación por oxígeno y exposición a tensiones de oxígeno altas (para favorecer el procesamiento), hacen del perfil oscilante una herramienta de gran utilidad y fácil de escalar, para aumentar la producción de proteínas en microorganismos recombinantes.

Las fluctuaciones de TOD generados en bioreactores de escala laboratorio, son una herramienta de gran utilidad para evaluar el comportamiento de microorganismos con DNA recombinante.

Con base en los estudios de escalamiento descendente realizados en este trabajo, se concluyó que la presencia de gradientes de oxígeno disuelto en bioreactores de gran escala, pueden favorecer la producción de PA por *E. coli* JM101/pPA102.

El estudio de escalamiento descendente descrito en este trabajo, representa un esfuerzo pionero de los grupos nacionales de investigación, y es de los pocos a nivel mundial, donde el modelo biológico involucra DNA recombinante.

Capitulo VII

Bibliografía

Abel C., Hübner, U. and Schügerl., K. (1994). Transient behaviour of baker's yeast during enforced periodical variation of dissolved oxygen concentration. **J. Biotechnol. 32**: 45-57.

Aguilar-Aguila, A., Valentinotti, S., Galindo, E. y Ramírez, O. T. (1993). Desarrollo de un sistema amigable y versátil para la adquisición de datos y control de bioreactores. **Biotecnología 3** (5-6): S130-S139.

Albantov, A.F. and Levin, A.L. (1994). New functional possibilities for amperometric dissolved oxygen sensors. **Biosensors and Bioelectronics 9**: 515-526.

Amanullah, A., Emery, A. N. and Nienow, A. W. (1992). The effects of dissolved oxygen cycling on the biological performance of a culture of *Bacillus subtilis*. **The 1992 IChemE Research Event**, Birmingham, U.K.: 10-12.

Amanullah, A., Nienow, A.W., Emery, A. N. and Mc Farlane, C. M. (1993). The use of *Bacillus subtilis* as an oxygen sensitive culture to simulate dissolved oxygen cycling in large scale fermenters. **The 1993 IChemE Research Event,** Birmingham, U.K.: 182-184.

Anderson, C., LeGrys, G. A. and Solomons, G. L. (1982). Concepts in the design of large-scale fermenters for viscous culture broths. **Int. Chem. Eng. 37**: 43-49.

Balasingham, K., Warburton, D., Dunnill, P. and Lilly, D. (1972). The isolation and kinetics of penicillin amidase from *E. coli*. **Biochem. Biophys. Acta 276**: 250-256.

Bambot, S.B., Holavanahali, R., Lakowicz J.R. , Carter, G.M. and Rao, G. (1994). Phase fluorometric sterilizable optical oxygen sensor. **Biotechnol. Bioeng. 43**: 1139-1145.

Bhattacharya, S., Gupta, V. S., Prabhune, A. A., SivaRaman, H., Debnath, M. and Ranjekar, P. K. (1993). Studies of operational variables in batch mode for genetically engineered *E. coli* cells containing penicillin acylase. **Enzyme Microb. Technol. 15** (12): 1070-1073.

Burlingame, R. and Chapman, P. J. (1983). Catabolism of phenilpropionic acid and its 3-hydroxyderivate by *E. coli* . **J. Bacteriol. 155** (1): 113-121.

Buse, R., Qazi, G. N. and Onken, U. (1992). Influence of constant and oscillating dissolved concentrations on keto acid production by *Gluconobacter oxydans* subsps. *melanogenum*. **J. Biotechnol. 26**: 231-244.

Bushell, M. E. (1988). Computers in fermentation technology. **Progress in Industrial Microbiology 25**: 1-46.

Caunt P., Impoolsup, A. and Greenfield, P.F. (1989). The effect of oxygen limitation on stability of a recombinant plasmid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Lett. 11**(1): 5-10.

Caunt, P., Impoolsup, A. and Greenfield, P. F. (1990). A method for the stabilization of recombinant plasmid in yeast. **J. Biotechnol. 14**: 311-320.

Chen, J., Tannahill A. L. and Shuler M. L. 1985. Design of a system for the control of low dissolved oxygen concentrations: critical oxygen concentrations for *Azotobacter vinelandii* and *E. coli*. **Biotechnol. Bioeng.** 27: 151-155.

Choi, K. S., Kim, J. A. and Kang, H. S. (1992). Effects of site-directed mutations on processing and activities of penicillin acylase from *E. coli* ATCC 11105. **J. Bacteriol. 174** (19): 6270-6279.

Cortés, G. (1995). Simulación experimental de gradientes de oxígeno disuelto y su efecto sobre la producción de β-galactosidasa por *kluyveromyces fragilis*. **Tesis de Licenciatura** Escuela de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla:pp. 51-102

Da Silva, N.A. and Bailey, J.E. (1986). Theoretical growth yield estimates for recombinant cells. **Biotechnol. Bioeng. 28**: 741-746.

Dang, N. D. P., Karrer, D. A. and Dunn, I. J. (1977). Oxygen transfer coefficients by dynamic model moment analysis. **Biotechnol. Bioeng. 19**: 853-865.

Daumy, G. A., Danley, D. and McColl, A. S. (1985a). Role of protein subunits in *Proteus rettgeri* penicillin acylase . **J. Bacteriol. 163** (3): 1279-1281.

Daumy, G. A., Danley, D., McColl, A. S. and Vinick, F.J. (1985b). Experimental evolution of penicillin acylase from *E. coli* and *P. rettgeri*. **J. Bacteriol. 163** (3): 925-932.

Davison, B. H. and Stephanopoulos, G. (1986). Effect of pH oscillations on a competing mixed culture. **Biotechnol. Bioeng. 28**: 1127-1137.

Doelle, H. W., Ewings, K.N. and Hollywood, N.W. (1982). Regulation of glucose metabolism in bacterial system. **Adv. Biochem. Eng. 23**: 1-35.

Duggleby, H. J., Tolley, S. P., Hill, C. P., Dodson, E. J., Dodson, G. and Moody P. C. E. (1995). Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. **Nature 373**: 264-268.

Galindo, E. (1996). Mezclado y transferencia de oxígeno en fermentadores. **Escalamiento de procesos biotecnológicos.** Quintero, R. y López-Mungía, A. (Eds.) Universidad de las Naciones Unidas, Tokio, Japón. (En prensa).

Gebauer A., Scheper, T. and Schügerl, K. (1987). Penicillin acylase production by E. coli. **Biopr. Eng. 2**: 55-58.

Han, K., Lim, H. C. and Hong, J. (1992). Acetic acid formation in *E. coli* fermentation. **Biotechnol. Bioeng. 39**: 663-671.

Hopkins, D. J., Betenbaugh, M.J. and Dhurjati, P. (1987). Effects of dissolved oxygen shock on the stability of recombinant *E. coli* containing plasmid pKN401. **Biotechnol. Bioeng. 29**: 85-91.

Hörnsten, E.G. (1995). On culturing *E. coli* on a mineral salts medium during anaerobic conditions. **Biopr. Eng. 12**: 157-162.

Impoolsup, A., Caunt P. and Greenfield P.F. (1989). Stabilization of a recombinant yeast plasmid in non-selective medium by ciclic growth rate changes. **Biotechnol. Lett. 2(9)**: 605-608.

Karim, M. I. A., Lucas, R.J., Osborne, K.J. and Rogers, P.L. (1993). The effect of oxygen on the sporulation and toxicity of *Bacillus sphaericus* 2362. **Biotechnol. Lett. 15** (1): 47-50.

Kataoka, H., Sato S., Mukataka S., Namiki A.I., Yoshimura K. and Takahashi J. (1986). Effects of periodic change in pressure and dissolved oxygen concentration on the incubation characteristics of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biotechnol. Bioeng. 28**: 663-667.

Koning, B., Seewald, C. and Schugerl, K. (1981). Process engineering investigations of penicillin production. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12**: 205-211.

Larsson, G. and Enfors, S. O. (1985). Influence of oxygen starvation on the respiratory capacity of *Penicillium chrysogenum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol. 21**: 228-233.

Lee, F. J. S. and Hassan, H. M. (1987). Effect of oxygen tension on stability and expression of a killer toxin chimeric plasmid in a chemostat culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol. 27**: 72-74.

Lee, L. and Chang, N. H. (1988). High cell density continuos culture of *E. coli* producing penicillin acylase. **Biotechnol. Lett. 10 (11)**: 787-792.

Lee, Y. H. and Tsao, G. T. (1979). Dissolved oxygen electrodes. **Adv. Biochem. Eng. 13**: 35-86.

Lee, L. and Chang, N. H. (1990). High cell density culture of a recombinant *E. coli* producing penicillin acylase in a membrane cell recycle fermentor. **Biotechnol. Bioeng. 36**: 330-337.

Lester, R.L. and De Moss, J.A. (1971). Effects of molybdate and selenite on formiate and nitrate metabolism in *E. coli*. **J. Bacteriol 105** (3): 1006-1014.

Li, X., Robbins, J. W. and Talor, K. B. (1992). Effect of the levels of dissolved oxygen on the expression of recombinant proteins in four recombinant *E. coli* strains. **J. Ind. Microbiol. 9**: 1-10.

Manfredini, R., Cavallera, V., Marini, L. and Donati, G. (1983). Mixing and oxygen transfer in conventional stirred fermentors. **Biotechnol. Bioeng. 25**: 3115-3131.

Merino, P. E. (1992). Caracterización, manipulación y posible papel en la naturaleza del gene *pac* y su producto, la penicilino acilasa de *E. coli* . **Tesis de Doctorado**. Instituto de Biotecnología. Posgrado en Biotecnología, CCH-UNAM.

Mukataka, S., Kataoka, H. and Takahashi, J. (1980). Effects of vessel size and rheological properties of suspensions on the distribution of circulation times in stirred tank. **J. Ferment. Technol. 58** (2): 155-161.

Nagalakshimi V. and Pai, J. S. (1994). Permeabilization of *E. coli* cells for enhanced penicillin acylase activity. **Biotechnol.. Tech. 8** (6): 431-434.

Namdev, P. K., Irwin, N., Thompson, B. G. and Gray, M. R. (1993). Effect of oxygen fluctuations on recombinant *E. coli* fermentation. **Biotechnol. Bioeng. 41**: 666-670.

Neubauer, P., Häggström, L. and Enfors, S. O. (1995). Influence of substrate oscillations on acetate formation and growth yield in *E. coli* glucose limited fed-batch cultivations. **Biotechnol. Bioeng. 47**: 139-146.

Oliver, G., Valle, F., Rosetti, F., Gómez-Pedrozo, M., Santamaria, P., Gosset, G. and Bolívar, F. (1985). A common precursor for the two subunits of the penicillin acylase from *E. coli* ATCC11105. **Gene 40**: 9-14.

Oosterhuis, N.M.G. and Kossen, N.W.F. (1984). Dissolved oxygen concentration profiles in a production scale bioreactor. **Biotechnol. Bioeng. 26**: 546-550.

Oosterhuis, N.M.G., Kossen, N.M.F., Oliver, A.P.C. and Schenk, E.S. (1985). Scale-down and optimization studies of gluconic acid fermentation by *Gluconobacter oxydans*. **Biotechnol. Bioeng. 27**: 711-721.

Ospina, S.S., López-Mungía, A., González, R.L. and Quintero, R. (1992). Characterization and use of a penicillin acylase biocatalyst. **J. Chem. Technol. Biotechnol.. 53**: 205-214.

Quintero, R. (1987). **Ingeniería Bioquímica**: Teoría y aplicaciones, Ed. Alhambra Mexicana, Cap 5:pp. 81-95.

Ramírez, O. T., Zamora, R., Quintero, R. and López-Munguía, A. (1994a). Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: the case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. **Enzyme Microbiol. Technol. 16**: 895-903.

Ramírez, O. T., Zamora, R., Espinosa, G., Merino, E., Bolívar, F. and Quintero, R. (1994b). Kinetic study of penicillin acylase production by recombinant *E. coli* in batch cultures. **Proc. Biochem. 29**: 197-206.

Reuss, M. (1991). Structured modeling of bioreactors. **Ann. N.Y. Acad. Sci., 646:** 284-299.

Robas, N., Zouheiry, H., Branlat, G. and Branlat, C. (1993). Improved penicillin amidase production using a genetically engineered mutant of *E. coli* ATCC 11105. **Biotechnol. Bioeng. 41**: 14-24.

Ruiz-Herrera, J. and De Moss J. A. (1969a). Nitrate reductase complex of *E. coli* K-12: participation of specific formate dehydrogenase and cytochrome b_1 components in nitrate reduction. **J. Bacteriol. 99**: 720-729.

Ruiz-Herrera, J., Showe, M.K. and De Moss J. A. (1969b). Nitrate reductase complex of *E. coli* K-12: isolation and characterization of mutants unable to reduce nitrate. **J. Bacteriol. 97**: 1291-1297.

Scherrer, S., Robas, N., Zouheiry, H. and Branlant, G. (1994). Periplasmic aggregation limits the proteolytic maturation of the *E. coli* penicillin G acylase procursor polypeptide. **Appl. Microbiol. Biotechnol. 42**: 85-91.

Schewale, B.J. and Sivaraman, H. (1989). Penicillin acylase: enzyme production and its applications in the manufacture of 6-APA. **Process. Biochem. 24** (4): 145-154.

Schömer, U., Segner, A. and Wagner, F. (1984). Penicillin acylase from the hybrid strain *E. coli* **5K(pHM12)**: enzyme formation and hydrolysis of β-lactam antibiotics with whole cells. **Appl. Environ. Microbiol. 47**: 307-312.

Schumacher, G., Sizmann, D., Hang, H., Buckel, P. and Beck, A. (1986). Penicillin acylase from *E. coli* : unique gene-protein relation. **Nucl. Acids Res. 14**: 5713-5727.

Shaforostova, L. D., Ivanova, I. I., Shulgovskaya, E. M. and Rabotnova, I. L. (1973). Growth of microorganisms during exponential phase. **Biotechnol. Bioeng. 4** : 175-187.

Sizmann, D., Keilmann, C. and Böck, A. (1990). Primary structure requirements for the maturation *in vivo* of penicillin acylase from *E. coli* ATCC 11105. **Eur. J. Biochem. 192**: 143-151.

Slade, A., Horrocks, A. J., Lindsay, Ch. D., Dunbar, B. and Virden, R. (1991). Site-directed chemical conversion of serine to cysteine in penicillin acylase from *E. coli* ATCC11105. **Eur. J. Biochem. 197**: 75-80.

Strayer, L. (1990). Fosforilación oxidativa. En: **Bioquímica**. Ed. Reverté, S.A. Cap.17: pp. 403-432.

Suphantharika M., Ison, A.P., Lilly, M.D. and Buckland, B.C. (1994). The influence of dissolved oxygen tension on the synthesis of the antibiotic difficidin by *Bacillus subtilis*. **Biotechnol. Bioeng. 44**: 1007-1012.

Suphantharika, M., Ison, A. P. and Lilly, M.D. (1995). The effect of cycling dissolved oxygen tension on the synthesis of the antibiotic difficin by *Bacillus subtilis*. **Biopr. Eng. 12**: 181-186.

Sweere, A.P.J., Luyben, K.Ch. A.M. and Kossen, N.W.F. (1987). Regime analisys and scale-down: tools to investigate the performance of bioreactors. **Enzyme Microbiol. Technol. 9**: 386-398.

Takebe, H., Takane, N., Hiruta, O., Satoh, A., Kataoka, H. and Takana, H. (1994). Scale-up of bialaphos production. **J. Ferment. Bioeng. 78** (1): 93-99.

Taniguchi, S. and Itagaki, E. (1960). Nitrate reductase of nitrate respiration type from *E. coli*. Solubilization and purification from the particulate system with molecular characterization as a metalloprotein. **Biochem. Biophys. Acta 44**: 263-279.

Träger M., Qazi, G.N., Buse, R. and Onken, U. (1992). Influence of constant and oscillating dissolved oxygen concentration on *Aspergillus niger*. **J. Ferment. Bioeng. 74** (5): 282-287.

Träger, M., Hollmann, D., Buse, R. and Onken, U. (1991). Device for fermentations with oscillations of dissolved oxygen. **J. Ferment. Bioeng. 72** (1): 46-53.

Varma, A., Boesch, B.W. and Palsson, B. (1993). Biochemical production capabilities of *E. coli*. **Biotechnol. Bioeng. 42**: 59-73.

Yegneswaran, P.K., Thompson, B.G. and Gray, M.R. (1991). Effect of dissolved oxygen control on growth and antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus* fermentations. **Biotechnol. Prog. 7**: 246-250.

Zamora, R. (1994). Cultivos exponencialmente alimentados en la producción de la enzima penicilino acilasa por *E. coli* recombinante. **Tesis de Licenciatura**. Escuela de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla: pp. 44-70.

Zhou, W., Holzhauer- Rieger, K. Dors. M. and Schügerl, K. (1992). Influence of the dissolved oxygen concentration on the biosynthesis of cephalosporin C. **Enzyme Microbiol. Technol. 14**: 848-854.

Apéndices

A. Análisis de la respuesta transitoria

A.1 Sistemas de primer orden

Los sistemas de primer orden son aquellos en donde se puede modelar la salida o respuesta ante una perturbación a través de una ecuación diferencial de primer orden (ec. A-1). Físicamente, este tipo de sistemas se puede representar por un circuito F-C esquematizado en la **figura A-1**.

$$a_1 \frac{dC}{dt} + a_0 C = bF(t) \qquad \text{(A-1)}$$

Reagrupando:

$$\frac{a_1}{a_0}\frac{dC}{dt} + C = \frac{b}{a_0}F(t) \qquad \text{(A-2)}$$

Definiendo:

$$\tau = \frac{a_1}{a_0} \qquad \text{y} \qquad Kp = \frac{b}{a_0} \qquad \text{(A-3)}$$

Se obtiene:

$$\tau\frac{dC}{dt} + C = KpF(t) \qquad \text{(A-4)}$$

Donde τ es "la constante de tiempo del sistema" y está inversamente relacionada con la dinámica del sistema. Kp se denomina "ganancia del proceso" y nos dice que tanto se amplifica una señal ante una perturbación.

La función de transferencia, G(*s*) para los sistemas de primer orden, definida como la relación de la transformada de Laplace de la variable de salida, C(*s*) (variable dependiente) y la

transformada de Laplace de la variable de entrada, F(*s*) (variable independiente), viene dada por:

$$G(s) = \frac{C(s)}{F(s)} = \frac{Kp}{\tau S + 1} \qquad \text{(A-5)}$$

Expresión que resulta de la trasformada de Laplace de la ec A-4. Donde *s* es una variable definida en el plano de los números complejos.

A los procesos descritos por la ecuación (A-5) se les conoce como "sistemas con retraso exponencial de trasferencia" o "sistemas con retraso de primer orden".

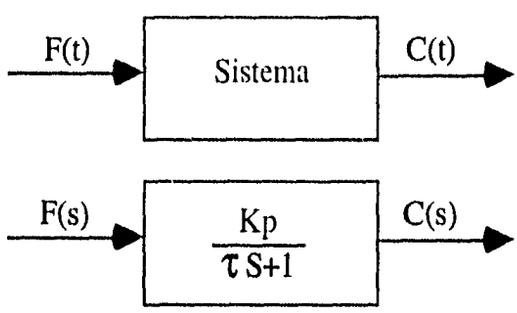


Figura A-1. Diagrama de bloques y función de transferencia de un sistema de primer orden.

A.1.1 Respuesta al escalón unitario de sistemas de primer orden

Si un sistema de primer orden en estado estacionario se somete a una perturbación (tipo escalón) en la variable de entrada, se obtendrá una respuesta en la salida hasta alcanzar un nuevo estado estacionario. La trasformada de Laplace de la función escalón unitario, F(*s*), (**figura A-2**), esta dada por:

$$\Im[F(t)] = F(s) = \frac{1}{S} \qquad \text{(A-6)}$$

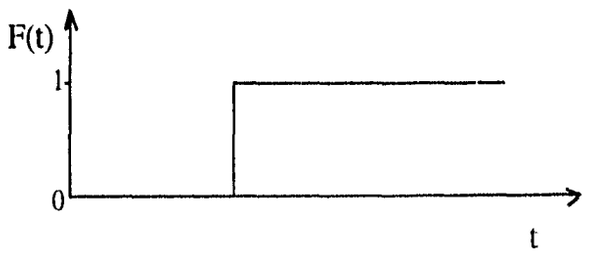


Figura A-2. Escalón unitario.

Sustituyendo la ecuación (A-6) en la ecuación (A-5) y normalizando para cualquier proceso (Kp=1) se obtiene:

$$C(s) = \frac{1}{\tau S + 1} \cdot \frac{1}{S} \qquad \text{(A-7)}$$

Resolviendo por fracciones parciales y aplicando la antitransformada de Laplace a la ecuación anterior, se obtiene:

$$C(t) = 1 - e^{-t/\tau} \quad \text{para} \quad t \geq 0 \qquad \text{(A-8)}$$

La ecuación A-8 describe la respuesta transitoria de cualquier sistema de primer orden ante cambios escalonados. Dicha expresión establece que inicialmente la salida C(t) es cero y finalmente se convierte en la unidad. Una curva de respuesta típica de estos sistemas se muestra en la **figura A-3**.

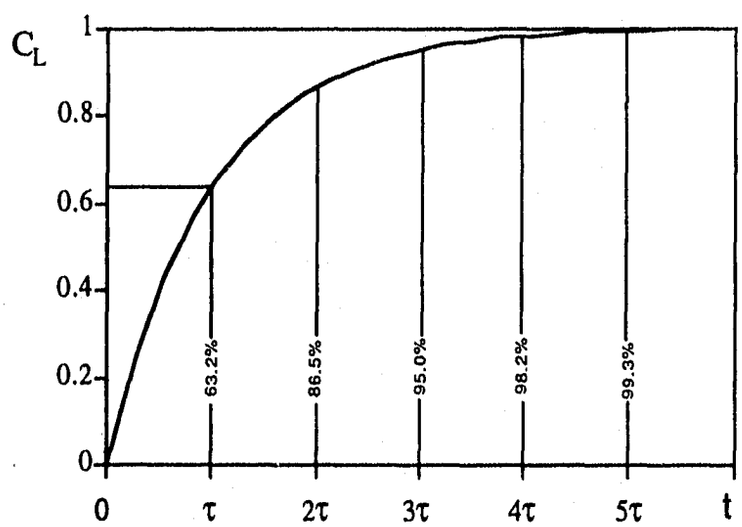


Figura A-3. Curva de respuesta exponencial de un sistema de primer orden.

A.1.2 Características de los sistemas de primer orden

Estos sistemas se caracterizan por:

1.- Cuando $t=\tau$ el valor de C(t) es 0.632, es decir la respuesta C(t) ha alcanzado el 63.2% de su variación total, esto se demuestra sustituyendo el valor de "t" en la ecuación (A-8).

$$C(t) = 1 - e^{-1} = 0.632 \qquad \text{(A-9)}$$

Para obtener la constante de tiempo de un proceso de primer orden bastará simplemente saber el tiempo que se tarda en alcanzar el 63.2 % del valor de la respuesta final (**figura A-3**) ante un cambio escalonado. La constante de tiempo (τ) nos dice que tan dinámico es el proceso (mientras más pequeña sea la constante de tiempo, más rápida será la respuesta del sistema).

2. La pendiente de la tangente en $t = 0$ es τ^{-1} dado que:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{1}{\tau} e^{-t/\tau}\Big|_{t=0} = \frac{1}{\tau} \qquad \text{(A-10)}$$

La salida alcanzaría el valor de $C(t) = 1$ en $t = \tau$ si mantuviera su velocidad inicial de respuesta (a esos sistemas se les llama sistemas puramente capacitivos). Sin embargo, de la ecuación (A-10) se observa que la pendiente de la curva de respuesta C(t) decrece monotónicamente desde τ^{-1} en $t = 0$ hasta cero en $t = \infty$.

3. De la **figura A-3** se observa que en una constante de tiempo la respuesta transitoria del sistema ha ido desde 0 hasta 63.2% del valor final. En dos constantes de tiempo, será de 86.5%, en $t= 3\tau$, 4τ, y 5τ, la respuesta alcanza el 95, 98.2 y 99.3, respectivamente. Entonces, para $t > 4\tau$, la respuesta faltante del máximo queda dentro del 2 %. La ecuación A-8 establece matemáticamente que el estado estacionario sólo se alcanza tras un tiempo infinito. Sin embargo, en la práctica, una estimación razonable de la respuesta transitoria es el tiempo que se necesita para alcanzar el 95 % de la respuesta final, es decir tres constantes de tiempo. A esto se le conoce como "tiempo de respuesta del sistema".

Para determinar experimentalmente si el sistema es o no de primer orden, se traza la curva de $\log[C(t)-C(\infty)]$ *vs* t. Si la curva resultante es una línea recta, el sistema es de primer orden. Se

hace notar que es más conveniente graficar [C(t)-C(∞)] / [C(0)-C(∞)] *vs* t en papel semilogarítmico (**figura A-4**).

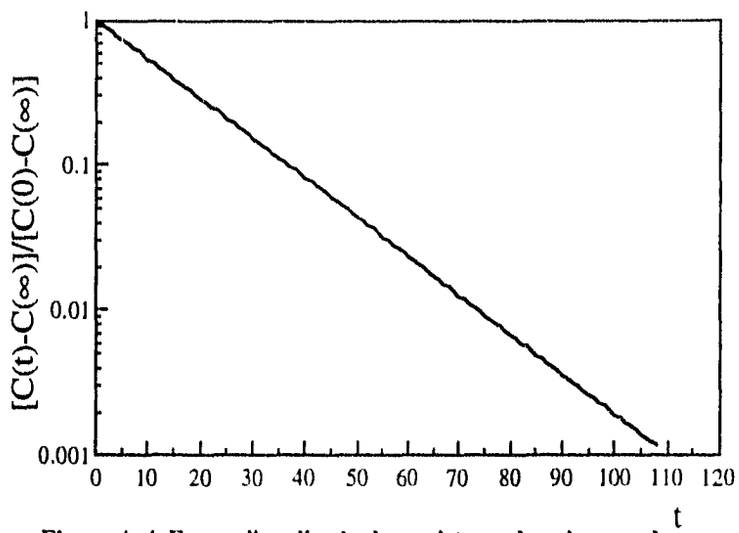


Figura A-4. Forma linealizada de un sistema de primer orden.

A.1.3 Estimación de la constante de tiempo en sistemas de fermentación

De un balance de oxígeno en un bioreactor se obtiene :

$$\frac{dC_L}{dt} + k_L a C_L = k_L a C_g^* - Q_{O_2} X \qquad \text{(A-11)}$$

Suponiendo un sistema libre de células ($Q_{O_2}X=0$) y dividiendo entre k_La:

$$\frac{1}{k_L a} \cdot \frac{dC_L}{dt} + C_L = C_g^* \qquad \text{(A-12)}$$

Para tales condiciones, la ecuación de salida ante un cambio escalonado viene dado por:

$$C_L = C_g^*(1 - e^{-k_L a \cdot t}) \qquad \text{(A-13)}$$

En la ecuación (A-13) se observa que el k_La es igual al inverso de la constante de tiempo (de la ecuación A-8). Lo anterior solo es válido si se desprecian otros eventos dinámicos (*i.e.* como la respuesta del electrodo, retrasos por transporte del gas etc.), de lo contrario la ecuación (A-13) debe ser expresada como:

$$C_L = C_g^*(1 - e^{-t/\tau_s}) \qquad \text{(A-14)}$$

Donde τ_S es la constante de tiempo del sistema.

A.1.4 Respuesta de los sistemas de primer orden a entradas sinusoidales

Al someter un sistema de primer orden a una entrada sinusoidal (dada por la ec. A-15), el sistema alcanzará un estado estacionario dinámico de naturaleza sinusoidal, con una frecuencia similar a la frecuencia de entrada, pero presentando desfase y una amplitud diferente.

Para un sistema descrito en la **figura A-1**y considerando una entrada sinusoidal del tipo:

$$F(t) = E + A\ \mathrm{Sen}\left(\frac{2\pi t}{\Omega}\right) \qquad \text{(A-15)}$$

La respuesta del sistema viene dada por:

$$C(t) = KpE + \frac{AKp}{\sqrt{1+\tau^2\left(\frac{2\pi}{\Omega}\right)^2}}\mathrm{Sen}\left[\left(\frac{2\pi}{\Omega}t\right) - \tan^{-1}\left(\frac{2\pi}{\Omega}\tau\right)\right] \qquad \text{(A-16)}$$

A este tipo de análisis se le conoce como métodos de frecuencia. El estudio puede realizarse utilizando control de lazo abierto y tiene la ventaja de que predice el comportamiento del sistema cuando se encuentre bajo control de lazo cerrado.

La ecuación A-16 establece que, para períodos grandes, la amplitud de C(t) es igual a Kp veces la amplitud (A) de la entrada y el desfase es inversamente proporcional al período (Ω). Para períodos pequeños de oscilación, la amplitud de la respuesta es pequeña y se aproxima a una relación proporcional. Por otra parte, el desfase tiende a -90° a medida que el período (Ω) tiende a cero.

A.2 Sistemas de segundo orden

Un sistema de segundo orden es aquel cuya salida C(t) puede ser modelada a través de una ecuación diferencial de segundo orden del tipo:

$$a_2\frac{d^2C}{dt^2}+a_1\frac{dC}{dt}+a_0C=bF(t) \qquad \text{(A-17)}$$

Definiendo:

$$\tau=\sqrt{\frac{a_2}{a_0}} \quad , \quad \zeta=\frac{a_1}{2\tau a_0} \quad y \quad Kp=\frac{b}{a_0} \qquad \text{(A-18)}$$

Donde τ es la constante de tiempo, ζ es el factor de amortiguamiento y Kp es la ganancia del proceso.

Sustituyendo las constantes de A-18 en A-17 y rearreglando:

$$\tau^2\frac{d^2C}{dt^2}+2\zeta\tau\frac{dC}{dt}+C=KpF(t) \qquad \text{(A-19)}$$

Aplicando la transformada de Laplace a la ecuación anterior :

$$G(s)=\frac{C(s)}{F(s)}=\frac{Kp}{\tau^2S^2+2\zeta\tau S+1} \qquad \text{(A-20)}$$

La ecuación A-20 es la función de transferencia que describe el comportamiento de los sistemas de segundo orden.

Este tipo de sistemas se presentan cuando:

1) Dos procesos de primer orden se encuentran acoplados en serie, denominados procesos multicapacitivos **(Figura A-5)**.

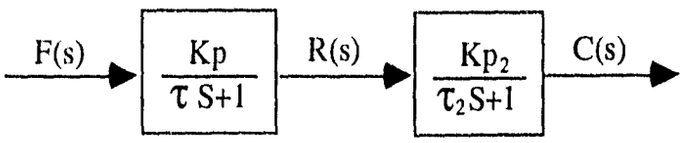


Figura A-5. Sistemas de primer orden acopladados en serie.

2) Un proceso de primer orden al que se le ha instalado un control de lazo cerrado (**figura A-6**).

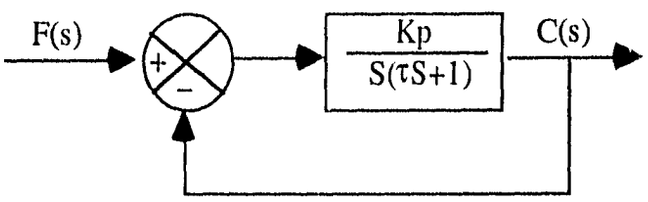


Figura A-6. Diagrama de un sistema con control retroalimentado.

3) Procesos de segundo orden por naturaleza (**figura A-7**).

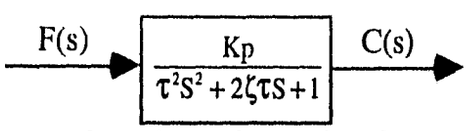


Figura A-7. Diagrama de un sistema de segundo orden propiamente dicho.

A.2.1 Respuesta de los sistemas de segundo orden a un cambio escalonado

Estos sistemas en estado estacionario, al ser sometidos a una perturbación tipo escalón, responden al cambio hasta alcanzar un nuevo estado estacionario, ya sea en forma oscilatoria o no. Sustituyendo la transformada del escalón unitario (ecuación A-6) en la ecuación A-20 se obtiene:

$$C(s) = \frac{Kp}{S(\tau^2 S^2 + 2\zeta\tau S + 1)} \qquad \text{(A-21)}$$

Si se aplica la antitransformada de Laplace a la ecuación A-21, se obtienen varias soluciones dependiendo del valor numérico del factor de amortiguamiento (ζ). Así se pueden obtener :

a) Sistemas no amortiguados ($\zeta = 0$).

Se les conoce como sistemas sin decaimiento y se caracterizan porque al ser sometidos a una perturbación, generan una respuesta oscilatoria permanente. Dicha respuesta viene dada por la ecuación A-22.

$$C(t) = 1 - \text{Cos}\left(\frac{t}{\tau}\right) \qquad \text{para} \quad t \geq 0 \qquad \text{(A-22)}$$

b) Sistemas subamortiguados ($0 < \zeta < 1$).

Son sistemas que responden acercándose a la respuesta estacionaria en forma oscilatoria y puede ser modelada por la ecuación A-23.

$$C(t) = 1 - \frac{e^{-t/\tau}}{\sqrt{1-\zeta^2}}\text{Sen}\left[\frac{t}{\tau} + \text{Tan}^{-1}\left(\frac{\sqrt{1-\zeta^2}}{\zeta}\right)\right] \quad \text{para} \quad t \geq 0 \qquad \text{(A-23)}$$

c) Sistemas con amortiguamiento crítico ($\zeta = 1$).

Son sistemas que se acercan al estado estacionario sin oscilar y se caracterizan por ser los sistemas de segundo orden más rápidos. La respuesta transitoria para estos sistemas viene dada por la ecuación A-2A.

$$C(t) = 1 - e^{-t/\tau}\left(1 + \frac{t}{\tau}\right) \qquad \text{para} \quad t \geq 0 \qquad \text{(A-24)}$$

c) Sistemas sobre amortiguados ($\zeta > 1$).

Son sistemas que resultan generalmente de procesos multicapacitivos (dos o más procesos de primer orden en serie).y se caracterizan por acercarse al estado estacionario sin oscilar y hacerse más lentos entre mayor sea el factor de amortiguamiento. La ecuación A-25 modela la respuesta transitoria de estos sistemas ante cambios escalonados.

$$C(t) = 1 - e^{-(\zeta - \sqrt{\zeta^2 - 1})t/\tau} \qquad \text{para} \quad t \geq 0 \qquad \text{(A-25)}$$

La representación gráfica de estos sistemas se muestran en la **figura A-8**. y la evolución de la velocidad de respuesta durante el tiempo en la **figura A-9**.

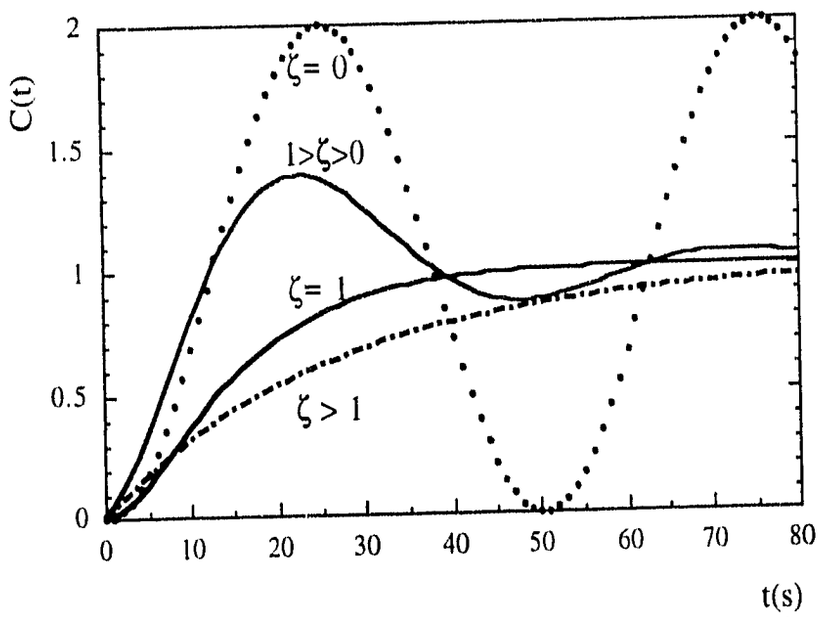


Figura A-8. Curvas de respuesta ante el escalón unitario de los sistemas de segundo orden.

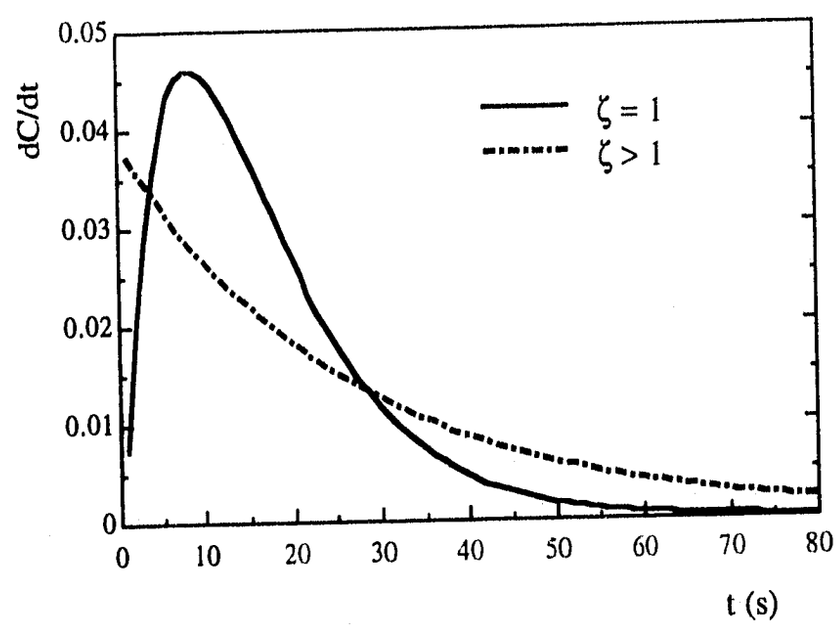


Figura A-9. Evolución de la velocidad de respuesta de sistemas de segundo orden (amortiguado críticamente ζ=1 y sobre amortiguado ζ>1).

A.2.2 Estimación de la constante de tiempo de sistemas de segundo orden con amortiguamiento crítico

Cuando se ha alcanzado una constante de tiempo ($t=\tau$), la ecuación A-24 se reduce a:

$$C(t) = 1 - 2e^{-1} = 0.264 \qquad \text{(A-26)}$$

Para obtener la constante de tiempo de un proceso de segundo orden con amortiguamiento crítico, bastará simplemente saber el tiempo que tarda en alcanzar el 26.4 % del valor de la respuesta final.

B. Programa de control y generador de ondas cuadradas de TOD en lenguaje QuickBasic

```
CLS:CLEAR
START:
  LIBRARY "TurboDrivers INTERFACE"
  LIBRARY "DATAMANIPULATION INTERFACE"
  CLS
    MENU 2,0,1,"":MENU OFF
    MENU 1,0,1,"INTERACTUAR"
    MENU 1,1,1,"CAMBIAR PARAMETROS":CMDKEY 1,1,"P"
    MENU 1,2,1,"DETENER ":CMDKEY 1,2,"D"
    MENU 1,3,1,"REINICIAR":CMDKEY 1,3,"R"
    MENU 1,4,1,"TERMINAR":CMDKEY 1,4,"T"
   ON MENU GOSUB INTERAC: MENU ON

PRINC:
     WINDOW 2,"PARAMETROS", (60,40)-(600,470),1
    INPUT "Nombre del Archivo (no repetir nombre ya usado)"; ARCHIVOS : PRINT
    INPUT "Intervalo de Adquisición de Datos (seg)";TI! : PRINT
    INPUT "Tiempo de la Fermentación (Hrs.)";TFH: PRINT
    INPUT "Flujo Total de Gases de Entrada en ccpm (no exceder de 1000)"; FG% : PRINT
    PRINT "Composición Inicial de los Gases de Entrada"
    INPUT "% N2 (sugerido:79%)"; N2I
    INPUT "% O2 (sugerido:21%)"; O2I:PRINT
    INPUT "Tiempo de Control (seg)"; delta!
    INPUT "% de Oxígeno Disuelto Deseado EJE";EJE! : PRINT
   INPUT"AMPLITUD DE LA ONDA";Amp
   INPUT"PERIODO DE LA ONDA";PER
    INPUT "Ganancia para Control O.D. (-1 para suprimir control)";GAINDO
    INPUT "Constante Integral para Control DO (1 E9 para suprimir control integral)"; TAUI
    INPUT "Constante Diferencial para Control DO (0 para suprimir control derivativo)"; TAUD: PRINT
   INPUT "pH Deseado";SPH!: PRINT
    INPUT "Duración del pulso para control de pH (seg.) (-1 para suprimir control)";GAINPH : PRINT
   INPUT "Banda de Tolerancia para pH (+/- pH)";TOLPH : PRINT
    ALFA=1.225
    SDO!=EJE!

   WINDOW CLOSE 2

CONSTANTES:
    TF=TFH*3600
    np=TF/TI
   REM SPODC ES LA VARIABLE ARREGLADA PARA GUARDAR AL DISCO EL SETPOIT CUADRADO
    DIM value%(15):DIM value!(15)
    DIM DOP!(np+10):DIM PHP!(np+10):DIM REDOXP!(np+10):DIM SPODC(np+10)
    DIM O2P!(np+10):DIM N2P!(np+10):DIM TRHP(np+10):DIM TEMPP(np+10)
    DIM ABSOP!(np+10):DIM FLUP!(np+10)
     ER%=0:slot%=1:value%(0)=0:LSB=10000/4096: ER%=0
    FOR bit%=0 TO 7
    CALL setDoutbit (bit%,1,slot%,VARPTR(ER%))
    NEXT bit%
     REM ***** DO = oxígeno disuelto *****
    REM ***** SPODC = Setpoint cuadrado de DOT*****
     REM ***** ABS = absorbancia por el sensor de biomasa*****
     REM ***** FLU = oxígeno disuelto por el fluorímetro *****
     REM ***** TR = tiempo de cultivo*****
    REM ***** PH = pH***
     REM ***** REDOX = potencial Redox *****
     REM ***** O2 = oxígeno fase gaseosa *****
     REM ***** N2 = nitrógeno fase gaseosa*****
```

```
      REM ***** TEMO = temperatura *****

      ARCHIVO1$="Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:"+ARCHIVO$+".DO"
      ARCHIVO2$="Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:"+ARCHIVO$+".PH"
      ARCHIVO3$="Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:"+ARCHIVO$+".REDOX"
      ARCHIVO4$="Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:"+ARCHIVO$+".O2"
      ARCHIVO5$="Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:"+ARCHIVO$+".N2"
      ARCHIVO6$="Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:"+ARCHIVO$+".TEMP"
      ARCHIVO7$="Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:"+ARCHIVO$+".TR"
      ARCHIVO8$="Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:"+ARCHIVO$+".SPODC"
      ARCHIVO9$="Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:"+ARCHIVO$+".ABS"
      ARCHIVO10$="Macintosh HD:USUARIOS:DATOS:"+ARCHIVO$+".FLU"

      SPO2%=((FG%*O2I*.05)/(ALFA))/LSB
      SPN2%=((FG%*N2I*.05)/(ALFA))/LSB
      CON1=1
      CON2=1
      E2!=0
      E3!=0
      IF np = 200 THEN COMP%=0
      IF np < 200 THEN COMP%=200/np*(-1)
      IF np > 200 THEN COMP%=np/200
      OPEN "O",#1,ARCHIVO1$: CLOSE #1
      OPEN "O",#2,ARCHIVO2$: CLOSE #2
      OPEN "O",#3,ARCHIVO3$: CLOSE #3
      OPEN "O",#4,ARCHIVO4$: CLOSE #4
      OPEN "O",#5,ARCHIVO5$: CLOSE #5
      OPEN "O",#6,ARCHIVO6$: CLOSE #6
      OPEN "O",#7,ARCHIVO7$: CLOSE #7
      OPEN "O",#8,ARCHIVO8$: CLOSE #8
      OPEN "O",#9,ARCHIVO9$: CLOSE #9
       OPEN "O",#10,ARCHIVO10$: CLOSE #10
     CALL PANTALLA

INICIO:
   TIEMPO0=TIMER
   FECHA$=DATE$
   dias=0
   TIEMPO1=TIMER+(dias*86400!)
    tiempo2=TIMER+(dias*86400!)
    REM  tiempo5 es el valor fijo para oscilar
   TIEMPO5=TIMER+(dias*86400!)
CICLO:
   IF FECHA$<DATE$ THEN dias=dias+1
   FECHA$=DATE$
   TRH=((TIMER-TIEMPO0)+dias*86400&)/3600
   IF CON2=1 THEN TRH1=TRH
   CALL CWRITE(145,64,SPO2%,slot%,VARPTR(ER%))
   CALL CWRITE(145,72,SPN2%,slot%,VARPTR(ER%))
     setad 0, 1, slot%,VARPTR(ER%)
     setad 1, 1, slot%,VARPTR(ER%)
     setad 2, 1, slot%,VARPTR(ER%)
     setad 3, 1, slot%,VARPTR(ER%)
     setad 4, 1, slot%,VARPTR(ER%)
     setad 5, 1, slot%,VARPTR(ER%)
     setad 6, 1, slot%,VARPTR(ER%)
     setad 7, 1, slot%,VARPTR(ER%)
     cread 0, 0, VARPTR(value%(0)), slot%, VARPTR(ER%)
     cread 1, 0, VARPTR(value%(1)), slot%, VARPTR(ER%)
     cread 2, 0, VARPTR(value%(2)), slot%, VARPTR(ER%)
     cread 3, 0, VARPTR(value%(3)), slot%, VARPTR(ER%)
     cread 4, 0, VARPTR(value%(4)), slot%, VARPTR(ER%)
     cread 5, 0, VARPTR(value%(5)), slot%, VARPTR(ER%)
```

```
    cread 6, 0, VARPTR(value%(6)), slot%, VARPTR(ER%)
    cread 7, 0, VARPTR(value%(7)), slot%, VARPTR(ER%)
    IF ER%<>0 THEN GOTO ErrorReport
  CALL ITOS (VARPTR (value%(0)),VARPTR (value!(0)),0,7)
   DO!=value!(7)*.0244-.3477
  IF DO!<0 THEN DO!=0
  IF DO!>100 THEN DO!=100
  forecolor 33:LOCATE 7,51 :PRINT USING "Oxigeno Disuelto (%): ###.#";DO!
  LOCATE 22,52:PRINT "Setpoint de OD(%):";SDO!
  LOCATE 21,50:PRINT"OD: ";EJE;" ± ";Amp;"  PERIODO";PER;"seg"
   PH!=value!(6)*.00337-.15802
  LOCATE 7,6:PRINT USING "pH= ##.##";PH!
  'REDOX!=(value!(3))*LSB*1.0377-.474
  'FORECOLOR 409:LOCATE 7,70:PRINT USING "p REDOX = #####.##";REDOX!
  LOCATE 22,4: PRINT "Gases (%):"
  O2!=(value!(5)*LSB)*20*ALFA/FG%
  forecolor 205:LOCATE 22,12:PRINT USING "O2:###.##";O2!
  N2!=(value!(4)*LSB)*20*ALFA/FG%
  forecolor 341:LOCATE 22,21:PRINT USING "N2:###.##";N2!
  TEMP!=.193*(value!(2))+7.374-.8
  forecolor 409:LOCATE 34,11:PRINT USING "Temperatura = ## °C";TEMP!
   ABSO!=value!(0)*.001218-.00101 32#
  forecolor 409:LOCATE 7,15:PRINT USING "Den. Optica.:###.###";ABSO!
  FLU!=value!(1)
  forecolor 33:LOCATE 8,52:PRINT  USING"% OD(fluor)=####.##";FLU!
  forecolor 33:LOCATE 4,80:PRINT DATE$:LOCATE 5,80:PRINT TIME$
  forecolor 137:LOCATE 21,4 :PRINT USING "Tiempo Transcurrido = ###.### Hrs";TRH:forecolor 33

    CALL TEXTSIZE (7)
     LOCATE 25,41: PRINT TFH
     LOCATE 43,41:PRINT  TFH
     LOCATE 43,102:PRINT  TFH
     LOCATE 24,102:PRINT TFH
    CALL TEXTSIZE (10)
 DOP!(CON1)=DO!
 PHP!(CON1)=PH!
 REDOXP!(CON1)=REDOX!
 O2P!(CON1)=O2!
 N2P!(CON1)=N2!
 TEMPP!(CON1)=TEMP!
 ABSOP!(CON1)=ABSO!
 FLUP!(CON1)=FLU!
 TRH2=TRH
 TRHP!(CON1)=(TRH1+TRH2)/2

  CALL plot (1,100,240,40,VARPTR (PHP!(0)),14,0,CON1,COMP%,0,1!,0)
  forecolor 409:CALL plot(1,100,240,40,VARPTR (ABSOP!(0)),14,0,CON1, COMP%,0,1!,0)
  forecolor 205:CALL plot (1,100,230,345,VARPTR (DOP!(0)),100,0,CON1,COMP%,0,1!,0)
  forecolor 341:CALL plot (1,100,230,345,VARPTR(FLUP!(0)),100,0,CON1,COMP%,0,1!,0)
   forecolor 409:call plot (1,100,230,345,varptr (redoxp!(0)),200,0,con1,comp%,0,1!,0)
  forecolor 205:CALL plot (1,290,420,40,VARPTR (O2P!(0)),100,0,CON1,COMP%,0,1!,0)
  forecolor 409:CALL plot (1,290,420,40,VARPTR (TEMPP!(0)),100,0,CON1,COMP%,0,1!,0)
  forecolor 341:CALL plot (1,290,420,40,VARPTR (N2P!(0)),100,0,CON1,COMP%,0,1!,0)
  forecolor 205:CALL plot (1,290,420,345,VARPTR (SPODC!(0)),10,0,CON1,COMP%,0,1!,0)
CON2=CON2+1
 tiempo3=TIMER+(dias*86400!)
IF MOUSE(0) <> 0 THEN CALL PANTALLA
IF TRHP!(CON1) > TF/3600 THEN GOTO FINAL
IF tiempo3-TIEMPO1 > = T1! THEN GOTO SALVAR
IF tiempo3-tiempo2 > = delta! THEN GOTO CONTROL
IF tiempo3-TIEMPO5> = PER THEN SETPOINTCUADRADO
GOTO CICLO
```

```
SETPOINTCUADRADO:

  IF ORI=1 THEN  SDO!=EJE!+Amp: ORI=0 ELSE  SDO!=EJE!-Amp: ORI=1
  'IF SDO!<0 THEN SDO!=0
  TIEMPO5=tiempo3
  GOTO CICLO

CONTROL:

    E1!=SDO!-DO!
    IF GAINDO = -1 THEN GOTO CONTROLPH
    IF E1!=0 THEN GOTO CONTROLPH
    SPO2%=SPO2%+GAINDO*(E1!*(1+delta!/TAU1+TAUD/delta!)-E2!*(1+2*TAUD/delta!)+E3!*TAUD/delta!)
    IF SPO2% < 0 THEN SPO2%=0:IF SPO2% > (5*FG%/ALFA)/LSB THEN SPO2%=(5*FG%/ALFA)/LSB
    SPN2%=(5*FG%/ALFA)/LSB-SPO2%
    IF SPN2% < 0 THEN SPN2%=0:IF SPN2% > (5*FG%/ALFA)/LSB THEN SPN2%=(5*FG%/ALFA)/LSB
    E3!=E2! : E2!=E1!
REM *** EL CONTROL DE PH SE BLOQUEO POR NO TENER REELEVADORES***
CONTROLPH:
    PULSO1=TIMER+(dias*86400!)
    IF GAINPH=-1 THEN tiempo2=TIMER+(dias*86400!):GOTO CICLO
    IF PHP!(CON1) > SPH! + TOLPH GOTO ACIDO
    IF PHP!(CON1) < SPH! - TOLPH GOTO ALCALI
     tiempo2=TIMER+(dias*86400!)
    GOTO CICLO

        ACIDO:
         PULSO2=TIMER+(dias*86400!)
         CALL setDoutbit (0,0,slot%,VARPTR(ER%)):LOCATE 22,34:PRINT "CONTROLANDO!!!"
        IF PULSO2-PULSO1 < GAINPH THEN GOTO ACIDO
         CALL setDoutbit (0,1,slot%,VARPTR(ER%)):LOCATE 22,34:PRINT "                "
          tiempo2=TIMER+(dias*86400!)
        GOTO CICLO

       ALCALI:
        PULSO2=TIMER+(dias*86400!)
         CALL setDoutbit (1,0,slot%,VARPTR(ER%)):LOCATE 22,34:PRINT "CONTROLANDO!!!"
        IF PULSO2-PULSO1 < GAINPH THEN GOTO ALCALI
         CALL setDoutbit (1,1,slot%,VARPTR(ER%)):LOCATE 22,34:PRINT "                "
          tiempo2=TIMER+(dias*86400!)
        GOTO CICLO

SALVAR:
    SPODC!(CON1)=SDO
    OPEN "A",#1,ARCHIVO1$:OPEN "A",#2,ARCHIVO2$:OPEN "A",#3,ARCHIVO3$:OPEN
    "A",#4,ARCHIVO4$
    OPEN "A",#5,ARCHIVO5$:OPEN "A",#6,ARCHIVO6$:OPEN "A",#7,ARCHIVO7$
    OPEN "A",#8,ARCHIVO8$:OPEN "A",#9,ARCHIVO9$:OPEN "A",#10,ARCHIVO10$
    WRITE #1, DOP!(CON1):WRITE #2, PHP!(CON1):WRITE #3, REDOXP!(CON1):WRITE #4, O2P!(CON1):WRITE
#5, N2P!(CON1)
    WRITE #6, TEMPP!(CON1):WRITE #7, TRHP!(CON1)
    WRITE #8, SPODC!(CON1)
    WRITE #9, ABSOP!(CON1):WRITE #10, FLUP!(CON1)
    CLOSE #1: CLOSE #2: CLOSE #3: CLOSE #4 :CLOSE #5: CLOSE #6: CLOSE #7:CLOSE #8
    CLOSE #9:CLOSE #10
    CON1=CON1+1
    CON2=1
    TIEMPO1=TIMER+(dias*86400!)
    DOS!=0:PHS!=0:REDOXS!=0:O2S!=0:N2S!=0:TEMPS=0
    GOTO CICLO

FINAL:
     WINDOW 3,"",(215,100)-(420,300),5
```

```
      BEEP : BEEP : BEEP : BEEP
      CALL TEXTFACE (1)
      PRINT
      PRINT "EL TIEMPO DE FERMENTACION"
      PRINT
      PRINT "       HA TERMINADO"
      CALL TEXTFACE (0)
       BUTTON 1,1,"TERMINAR",(20,145)-(180,160),1
       BUTTON 2,1,"CONTINUAR",(20,175)-(180,190),1
        r%(0)=175
        r%(1)=20
        r%(2)=190
        r%(3)=180
        inSetRect r%(0),-4,-4
        PENSIZE 3,3
        FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
        PENNORMAL
  DIALOGO=DIALOG(0)
  WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
    DIALOGO=DIALOG(0)
  WEND
    INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
    BOTON=DIALOG(1)
    IF BOTON=1 THEN CLS: WINDOW CLOSE 3: SYSTEM
    IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS: WINDOW CLOSE 3: CALL PANTALLA: GOTO EXTRA

INTERAC:
      NUMMENU=MENU(0): IF NUMMENU <> 1  THEN RETURN
      ARTMENU=MENU(1)
      ON ARTMENU GOSUB PARAM, DETENER, REINICIAR, TERMINAR
      RETURN

PARAM:
       WINDOW 4,,(135,70)-(380,430),2
      CALL TEXTFACE (1)
      PRINT "     Parámetro a modificar:"
      CALL TEXTFACE (0)
       BUTTON 1,1,"Tiempo de Adquisición",(20,35)-(210,50),1
       BUTTON 2,1, "Tiempo de Fermentación",(20,55)-(210,70),1
       BUTTON 12,1, "Tiempo de Control",(20,75)-(210,90),1
       BUTTON 4,1,"Eje de oscilación",(20,95)-(210,110),1
       BUTTON 13,1, "Amplitud",(20,115)-(210,130),1
       BUTTON 11,1, "Periodo",(20,135)-(210,150),1
       BUTTON  8,1,"Ganancia DO",(20,155)-(210,170),1
        BUTTON 6,1,"Constante Integral",(20,175)-(210,190),1
        BUTTON 7,1,"Constante Diferencial",(20,195)-(210,210),1
       BUTTON 3,1,"Flujo de Gases",(20,215)-(210,230),1
       BUTTON 5,1,"pH Deseado",(20,235)-(210,250),1
       BUTTON 9,1,"Pulso para Control de pH",(20,255)-(210,270),1
       BUTTON 10,1,"Tolerancia pH",(20,275)-(210,290),1
       BUTTON 14,1,"OK",(150,335)-(200,350),1

        r%(0)=335
        r%(1)=150
        r%(2)=350
        r%(3)=200
        inSetRect r%(0),-4,-4
       PENSIZE 3,3
       FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
       PENNORMAL
 DIALOGO=DIALOG(0)
 WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
   DIALOGO=DIALOG(0)
```

```
  WEND
      INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
      BOTON=DIALOG(1)
      IF BOTON=14 OR DIALOGO=6 THEN WINDOW CLOSE 4: RETURN
      ON BOTON GOSUB TADQ, TFER, FLG, OXI, PHD, CTAUI, CTAUD, GANDO, GANPH,
TOLEPH,PERIODO,TCONTROL,AMPLITUD
      WINDOW CLOSE 4:
      RETURN
      ON BOTON GOSUB TADQ, TFER, FLG, OXI, PHD, CTAUI, CTAUD,
GANDO,GANPH,TOLEPH,PERIODO,TCONTROL,AMPLITUD

TADQ:
        CLS
        PRINT USING "Actual: ###.## seg."; TI!
        INPUT "Tiempo de Adquisición"; TI!
        GOTO PARAM
TFER:
        CLS
        PRINT USING "Actual: ###.## Hrs."; TFH
        INPUT "Tiempo de Fermentación"; TFH
        np = TFH*3600/TI
        CON1 = 1
        CON2 = 1
        GOTO PARAM
FLG:
        CLS
        PRINT USING "Actual:  ###.## SLPM"; FG%
        INPUT "Flujo Total de Gases"; FG%
        GOTO PARAM
OXI:
        CLS
        PRINT USING "Actual: ###.## %"; EJE!
        INPUT "% de Oxígeno Desado"; EJE!
        GOTO PARAM
PHD:
        CLS
        PRINT USING "Actual: ###.##"; SPH!
        INPUT "pH Desado"; SPH!
        GOTO PARAM
CTAUI:
        CLS
        PRINT USING "Actual: ###.## seg."; TAUI
        INPUT "Constante Integral"; TAUI
        GOTO PARAM
CTAUD:
        CLS
        PRINT USING "Actual: ####.##"; TAUD
        INPUT "Constante Derivativa"; TAUD
        GOTO PARAM
GANDO:
        CLS
        PRINT USING "Actual: ###.##"; GAINDO
        INPUT "Ganancia para DO"; GAINDO
        GOTO PARAM
GANPH:
        CLS
        PRINT USING "Actual: ###.## seg."; GAINPH
        INPUT "Pulso de Acido/Base"; GAINPH
        GOTO PARAM
TOLEPH:
        CLS
        PRINT USING "Actual: ###.##"; TOLPH
        INPUT "Tolerancia para pH"; TOLPH
```

```
        GOTO PARAM
TCONTROL:
        CLS
         PRINT USING "Actual: ###.##"; delta!
         INPUT "Tiempo de control";delta!
        GOTO PARAM
AMPLITUD:
        CLS
         PRINT USING "Actual: ###.##"; Amp
         INPUT "Amplitud  de la onda"; Amp
        GOTO PARAM
PERIODO:
        CLS
         PRINT USING "Actual: ###.##"; PER
         INPUT "Periodo de la onda "; PER
        GOTO PARAM

DETENER:
        WINDOW 5,,(215,100)-(420,300),3
      CALL TEXTFACE (1)
      PRINT
       PRINT"  El sistema se ha detenido"
      PRINT
       PRINT"      momentaneamente"
      CALL TEXTFACE (0)
        BUTTON 1,1,"Continuar",(5,175)-(200,190),1
        r%(0)=175
        r%(1)=5
        r%(2)=190
        r%(3)=200
         inSetRect r%(0),-4,-4
        PENSIZE 3,3
        FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
       PENNORMAL
 DIALOGO=DIALOG(0)
 WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
   DIALOGO=DIALOG(0)
 WEND
     INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
     CLS: WINDOW CLOSE 5
     RETURN

REINICIAR:
     BEEP
       WINDOW 6,,(215,100)-(420,300),2
     PRINT
     CALL TEXTFACE (1)
     PRINT"   ¿REALMENTE DESEA"
     PRINT"         REINICIAR ? "
     CALL TEXTFACE (0)
       BUTTON 1,1,"Reiniciar",(5,135)-(200,150),1
       BUTTON 2,1,"Continuar",(5,175)-(200,190),1
       r%(0)=175
       r%(1)=5
       r%(2)=190
       r%(3)=200
        inSetRect r%(0),-4,-4
      PENSIZE 3,3
      FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
     PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
  DIALOGO=DIALOG(0)
```

```
 WEND
      INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
      BOTON=DIALOG(1)
      IF BOTON=1 THEN CLEAR:GOTO START
      IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS: WINDOW CLOSE 6: CALL PANTALLA
      RETURN

TERMINAR:
      BEEP
        WINDOW 7,,(215,100)-(420,300),2
      PRINT
      CALL TEXTFACE (1)
      PRINT "   ¿ REALMENTE DESEA"
      PRINT "         TERMINAR ? "
      CALL TEXTFACE (0)
        BUTTON 1,1,"Terminar",(5,135)-(200,150),1
        BUTTON 2,1,"Continuar",(5,175)-(200,190),1
        r%(0)=175
        r%(1)=5
        r%(2)=190
        r%(3)=200
         inSetRect r%(0),-4,-4
        PENSIZE 3,3
        FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
        PENNORMAL
  DIALOGO=DIALOG(0)
  WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
    DIALOGO=DIALOG(0)
  WEND
       INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
      BOTON=DIALOG(1)
      IF BOTON=1 THEN SYSTEM
      IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS: WINDOW CLOSE 7: CALL PANTALLA
      RETURN

EXTRA:
      WINDOW 8,,(215,100)-(420,300),2
     PRINT "  Tiempo Adicional de "
     PRINT "     Fermentación"
     PRINT USING "(No Exceder de ####.## Hrs.)";TF/3600
     INPUT TA
     TF = TF + TA
     np = TF/TI
     CON1 = 1
     CON2 = 1
     WINDOW CLOSE 8
     CALL PANTALLA
     GOTO INICIO

PANT:
     SUB PANTALLA STATIC
       WINDOW 1,,(0,20)-(650,480)
     CALL TEXTFONT (0)
     CALL TEXTSIZE (13)
     CALL TEXTFACE (25)
   forecolor 409
   LOCATE 1,7: PRINT " UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO"
   LOCATE 2,14: PRINT "INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA"
   LOCATE 3,12: PRINT "©A. DE LEON"
   forecolor 33
     CALL PENSIZE (3,3)
  CALL MOVETO (10,70): CALL LINETO (620,70): CALL LINETO (620,450):
  CALL LINETO (10,450): CALL LINETO (10,70)
```

```
    REM PH 25-75:260-290
     CALL grid(2,100,240,40,210,14,10,10,17)
   REM OD*
     CALL grid(2,100,230,345,515,10,13,10,17)
   REM FLUJO DE GASES*
     CALL grid(2,290,420,40,210,10,13,10,17)
   REM SETPOINT DE OD*
     CALL grid(2,290,420,345,515,10,13,10,17)

   CALL PENSIZE (1,1)
   CALL TEXTFONT (1)
   CALL TEXTSIZE (10)
   CALL TEXTFACE (8)
   CALL TEXTSIZE (7)
   CALL TEXTFONT (1)
   CALL TEXTFACE (0)
  REM ESCALA PH
  LOCATE 11,4: PRINT "14"
  LOCATE 25,6: PRINT "0"

  REM O.D.
  LOCATE 11,67: PRINT "100"
  LOCATE 24,67: PRINT "0"
  'LOCATE 24,102:PRINT 25
  REM FLUJO DE GASES
  LOCATE 30,4: PRINT "100"
  LOCATE 43,6: PRINT "0"

  REM SETPOINT DE O.D.
  LOCATE 30,65: PRINT "10"
  LOCATE 43,67: PRINT "0"
  CALL TEXTSIZE(10)
  END SUB
ErrorReport:
  LOCATE 15,1
  BEEP
  PRINT" Unfortunately, we incurred a cread() error (er%="ER%")        "
  PRINT"  and must return to the main menu.  Please press the          "
  PRINT"SPACE BAR to continue.                                         "
  WHILE(" " <> INKEY$)
  WEND
  RETURN

'BYPASS:
     ARCHIVO$="ART": TI!=1: FG%=600: N2I=95:O2I=5:SOD!=50:delta!=20
     GAINDO=1:TOLDO=10:GAINPH=5:TOLPH=1:SPH!=7:ALFA=1.225
     GOTO CONSTANTES
```

C. Preparación de soluciones

C.1 Kanamicina (35 mg/ml)

Generalmente la kanamicina comercial (Sigma) viene como mezcla base, por lo que es necesario verificar la concentración antes de preparar la solución acuosa. Por ejemplo, suponiendo que el producto comercial tiene una concentración de 677 µg de kanamicina por mg de reactivo, se necesitan 0.5169 g de kanamicina y aforar a 10 ml con agua destilada. La solución así preparada se esteriliza en frío a través de un filtro Millipore de 0.22 µm de diámetro de poro. La solución estéril debe mantenerse en refrigeración y al mes de su preparación debe ser remplazada. Para obtener la concentración de trabajo (35 mg/L), se adicionan 1 µl del preparado por ml de medio de cultivo.

C.2 IPTG (100 mM)

Pesar 0.2383 g de IPTG (Sigma), aforar a 10 ml con agua destilada y esterilizar en frío a través de un filtro Millipore de 0.45 µm. Para obtener una concentración de 25 µM en el medio de cultivo, adicionar 250 µl por litro de medio de cultivo.

C.3 Tiamina (0.1%)

Pesar 0.01 g de tiamina (Sigma), aforar a 10 ml con agua destilada y esterilizar con filtro Millipore de 0.22 µm. La solución estéril debe mantenerse en refrigeración y al mes de su preparación debe ser remplazada. Adicionar 40 µl de la solución así preparada por cada litro de medio de cultivo.

C.4 Elementos traza

Los elementos traza se prepararon según la **tabla C-1**. La solución una vez preparada, se mantuvo en refrigeración. Una fracción de la solución se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min y se mantuvo en refrigeración hasta su uso. Se recomienda agregar la solución de elementos traza al medio de cultivo hasta el momento de su uso, con la finalidad de prevenir la precipitación de las sales.

Compuesto	g/L
$FeCl_3$ (Baker)	27.0
$ZnCl_2$ (Baker)	2.0
$CoCl_2.6H_2O$ (Baker)	2.0
$Na_2MoO_4.2H_2O$ (Baker)	2.0
$CaCl_2.2H_2O$ (Baker)	1.0
$CuCl_2.2H_2O$ (Baker)	1.0
H_3BO_3 (Baker)	0.5
HCl concentrado (Baker)	100 ml/L

Tabla C-1. Composición de la solución de elementos traza.

C.5 Buffer de fosfatos (pH 7.8)

Se prepara con 42.5 ml de NaH_2PO_4 0.1 M y 457.5 ml de Na_2HPO_4 0.1 M aforando a 1 litro y checando el pH con un potenciómetro.

C.6 Solución de PDAB

Disolver 1 g de PDAB en 50 ml de etanol al 60 % (v/v), agregar luego 0.5 ml de H_2SO_4 concentrado y aforar a 1 L con etanol 60% (v/v).

C.7 Solución de penicilina G al 20 %

Disolver 0.2 g de penicilina G en 1 ml de buffer de fosfatos pH 7.8.

D. Curvas estándar

D.1 Curva estándar de peso seco

100 ml de medio BSgl fueron inoculados con células e incubadas por 12 h. Se tomaron muestras de este cultivo y se hicieron diluciones con agua destilada, de tal forma que se obtuvieran diferentes suspensiones celulares con densidad óptica entre 0 y 0.8. La absorbancia de las muestras fue leída a 620 nm. Después, se procedió a centrifugar 40 ml de cada una de las suspensiones celulares a 3,500 rpm por 20 minutos. El *pellet* fue resuspendido en 40 ml de solución salina al 0.9%, posteriormente las muestras se filtraron en membranas Millipore (0.22 µm de diámetro), previamente desecadas y de peso conocido. Los filtros con células se deshidrataron a 60°C hasta peso constante. La curva estándar de peso seco utilizada se muestra en la **figura D-1**.

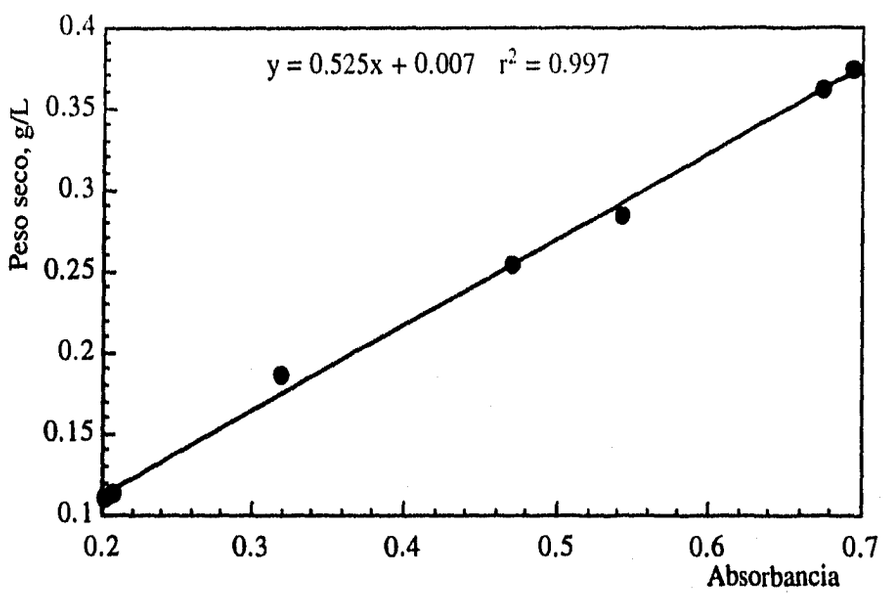


Figura D-1. Curva estándar de peso seco.

D.2 Curva estándar de actividad enzimática de PA

Cada vez que se prepararon soluciones, se realizó una nueva curva estándar de actividad, usando una solución patrón de 6-APA (Sigma) a 2.5 g/L en buffer de fosfatos y efectuando diluciones progresivas como se muestra en la **tabla D-1**.

Estándar	1	2	3	4	5	6
6-APA dilución	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	---
6-APA (mg/L)	1.25	0.6250	0.3125	0.1563	0.0781	---
Alícuota (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	---
Etanol (ml)	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
PDAB (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Buffer pH 7.8	----	----	----	----	----	0.2

Tabla D-1. Elaboración de la curva estandar para la determinación de actividad enzimática.

Una curva de calibración típica se muestra en la **figura D-2**. Todas las curvas de calibración mostraron poca variación entre sí y las regresiones fueron muy similares.

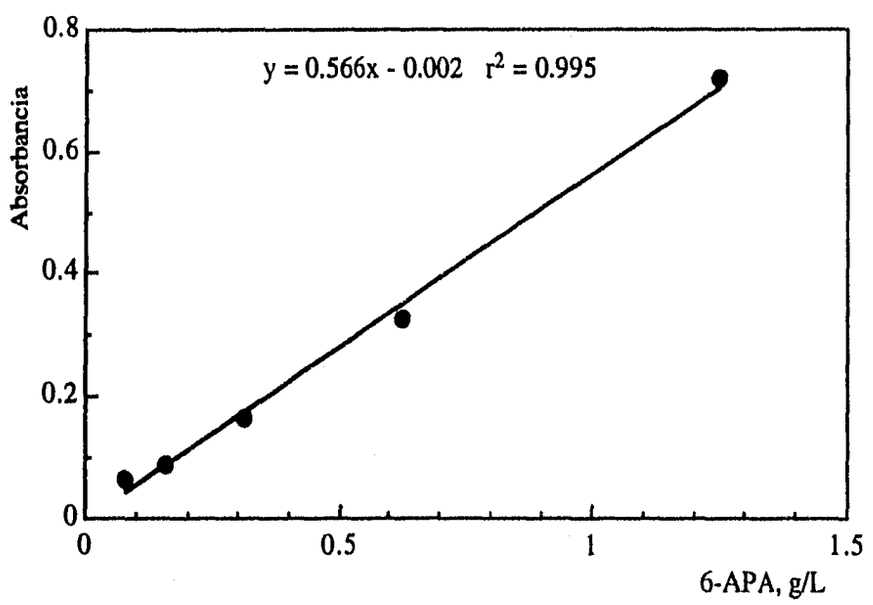


Figura D-2. Curva estandar de actividad enzimática de PA

D.3 Curva estándar de ácidos orgánicos

Se preparó una solución patrón de ácido acético 10 g/L, a partir de la cual se prepararon diferentes estándares, como se muestra en la **tabla D-2**.

Estándar	Ac. acético (g/L)	V patrón (µl)	V final (ml)	Área (µv/s)
1	0.25	250	10	123712
2	0.50	500	10	243096
3	1.00	1000	10	510489
4	1.50	1500	10	768618
5	2.00	2000	10	995692

Tabla D-2. Preparación de la curva estándar de acetato.

Las curva estándar para el ácido fórmico se realizó de igual manera que la descrita para el ácido acético.

Las curvas de calibración de los ácidos acético y fórmico se muestran en las Figura D-3 y D-4 respectivamente.

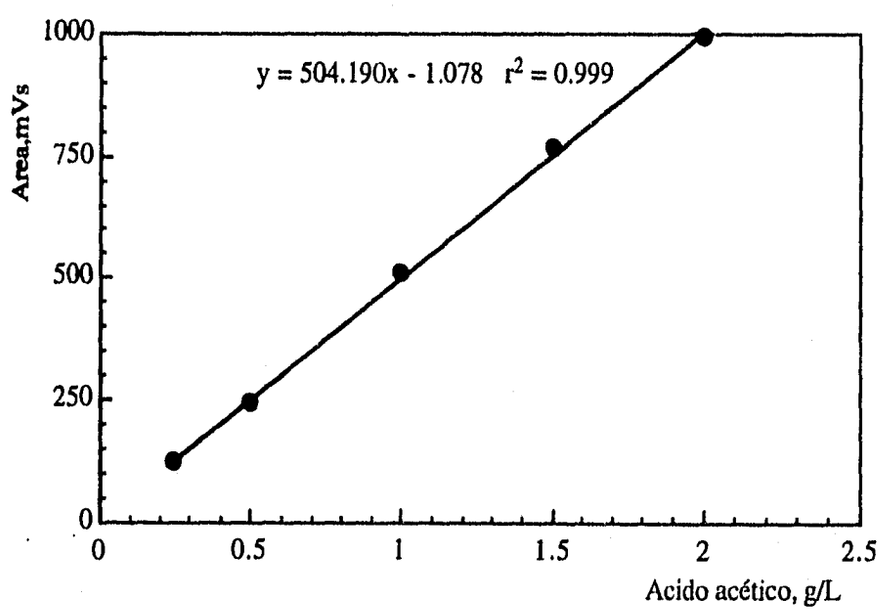


Figura D-3. Curva estándar de ácido acético.

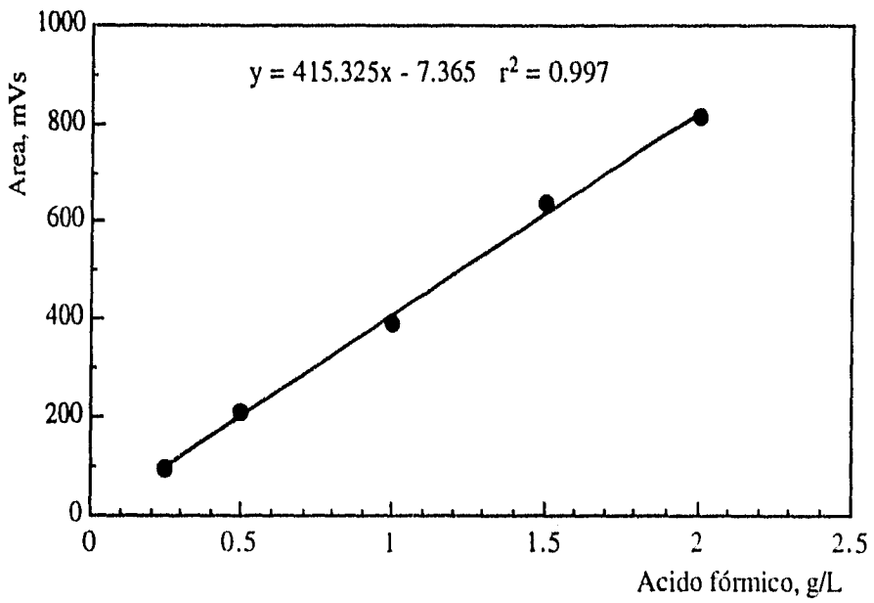


Figura D-4. Curva estándar de ácido fórmico.

E. Cultivo controlado en modo de lazo abierto

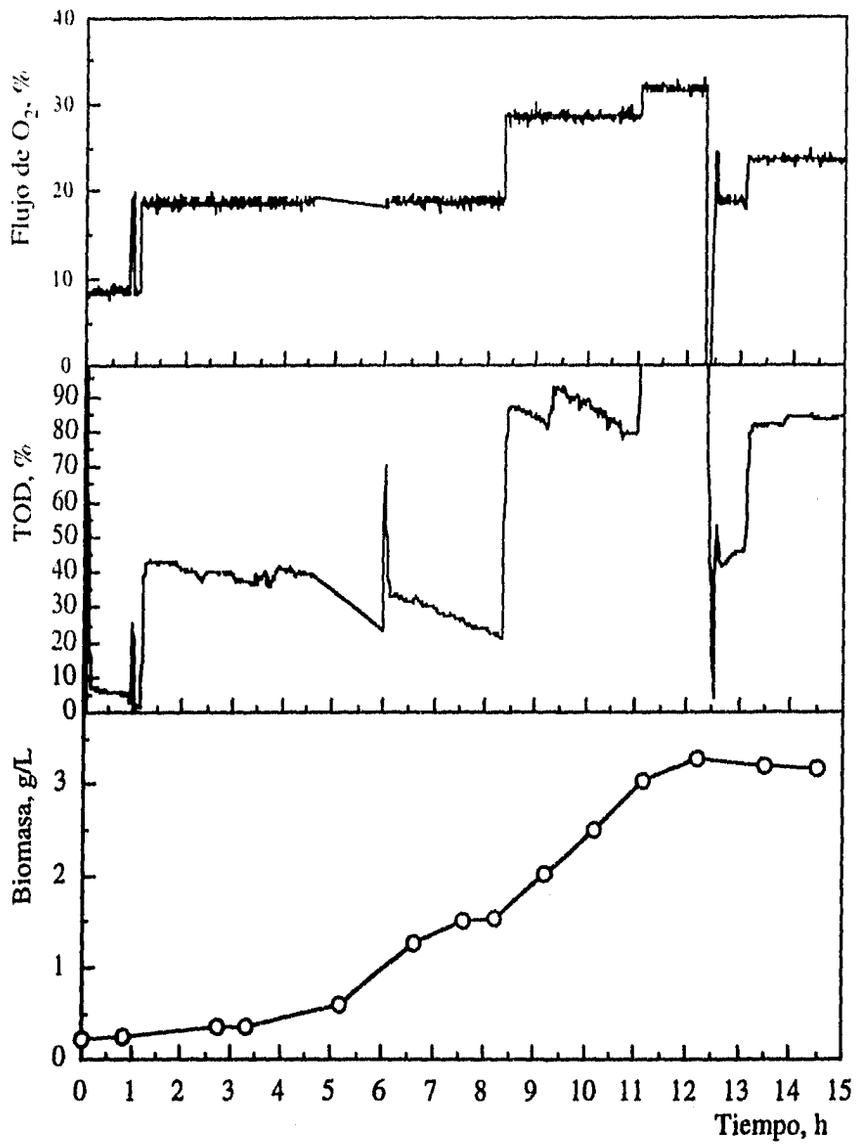


Figura E-1. Cambios escalonados en el flujo de oxígeno durante las diferentes edades del cultivo y lectura del TOD para la determinación de las constantes de control.

F. Cultivos a TOD constante

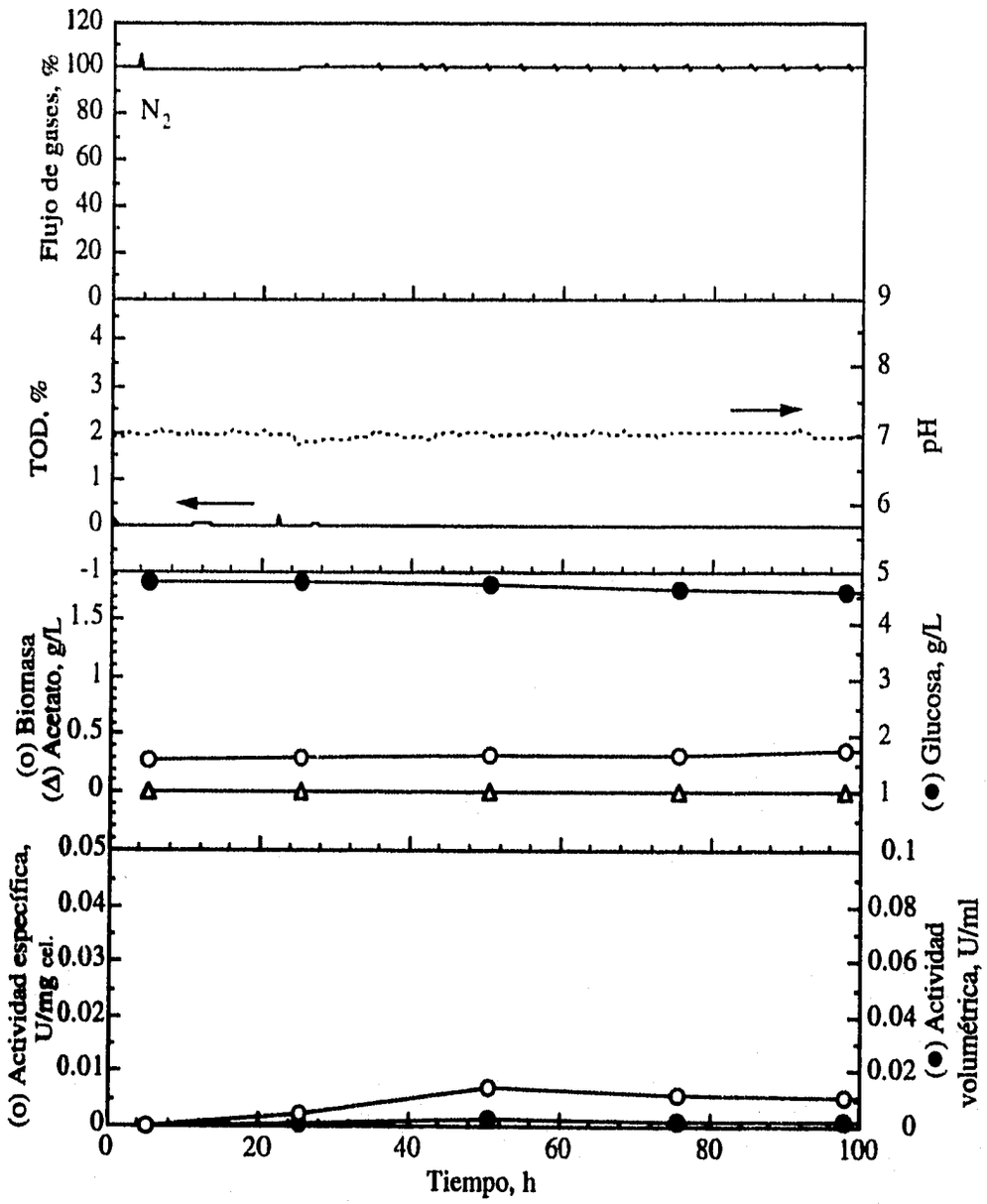


Figura F-1. Cinética de crecimiento a 0 % TOD.

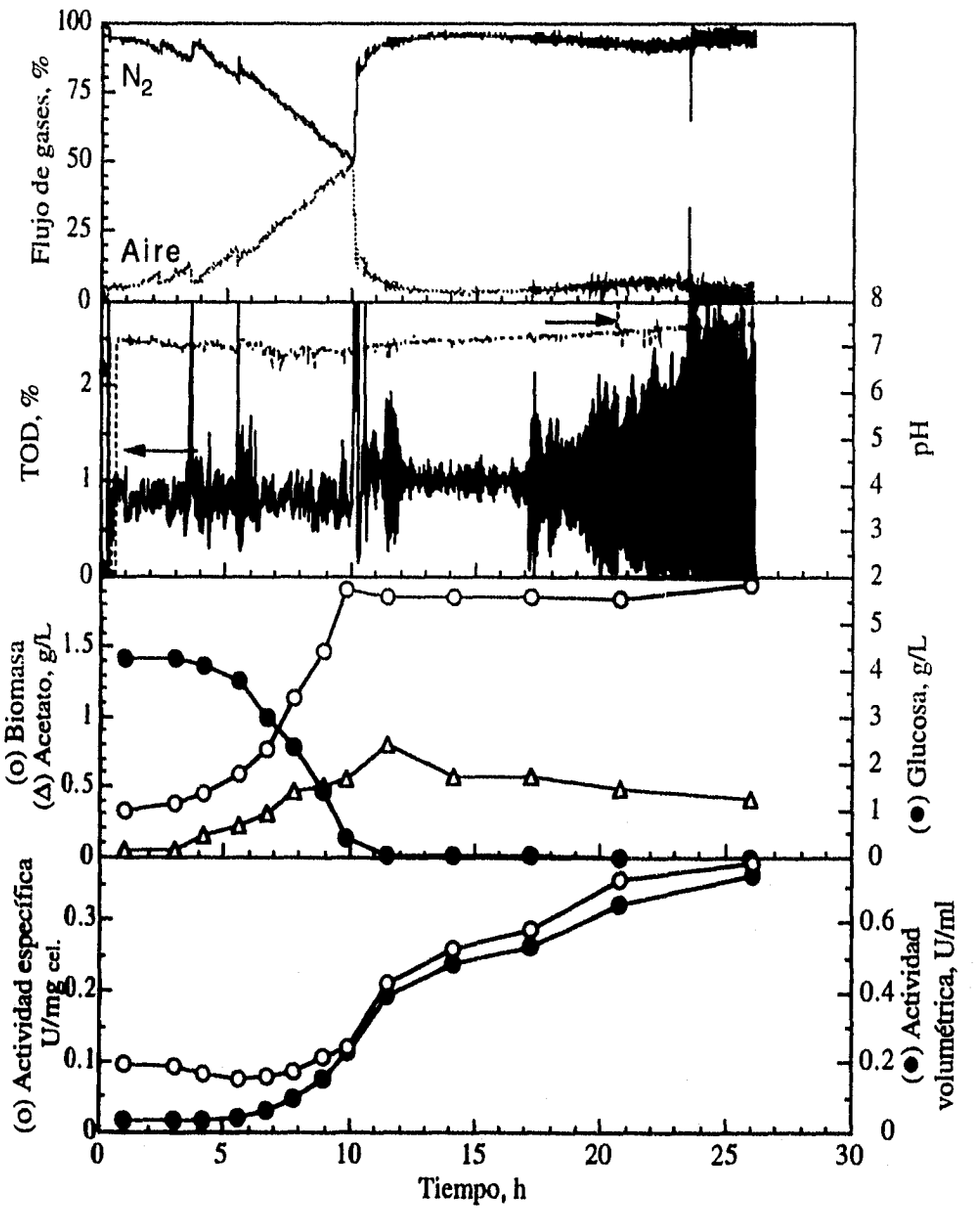


Figura F-2. Cinética de crecimiento a 0.8 % TOD.

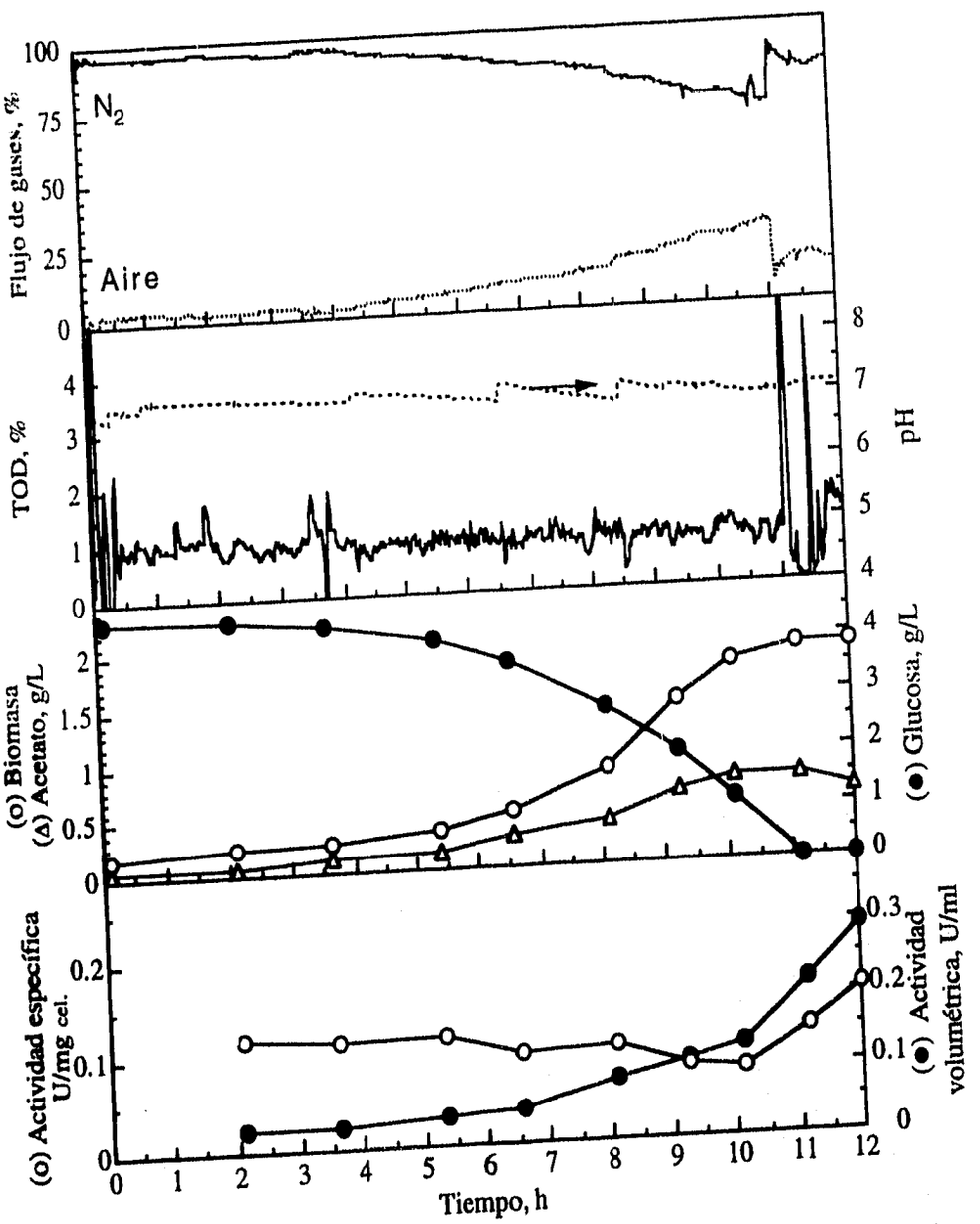


Figura F-3. Cinética de crecimiento a 1 % TOD.

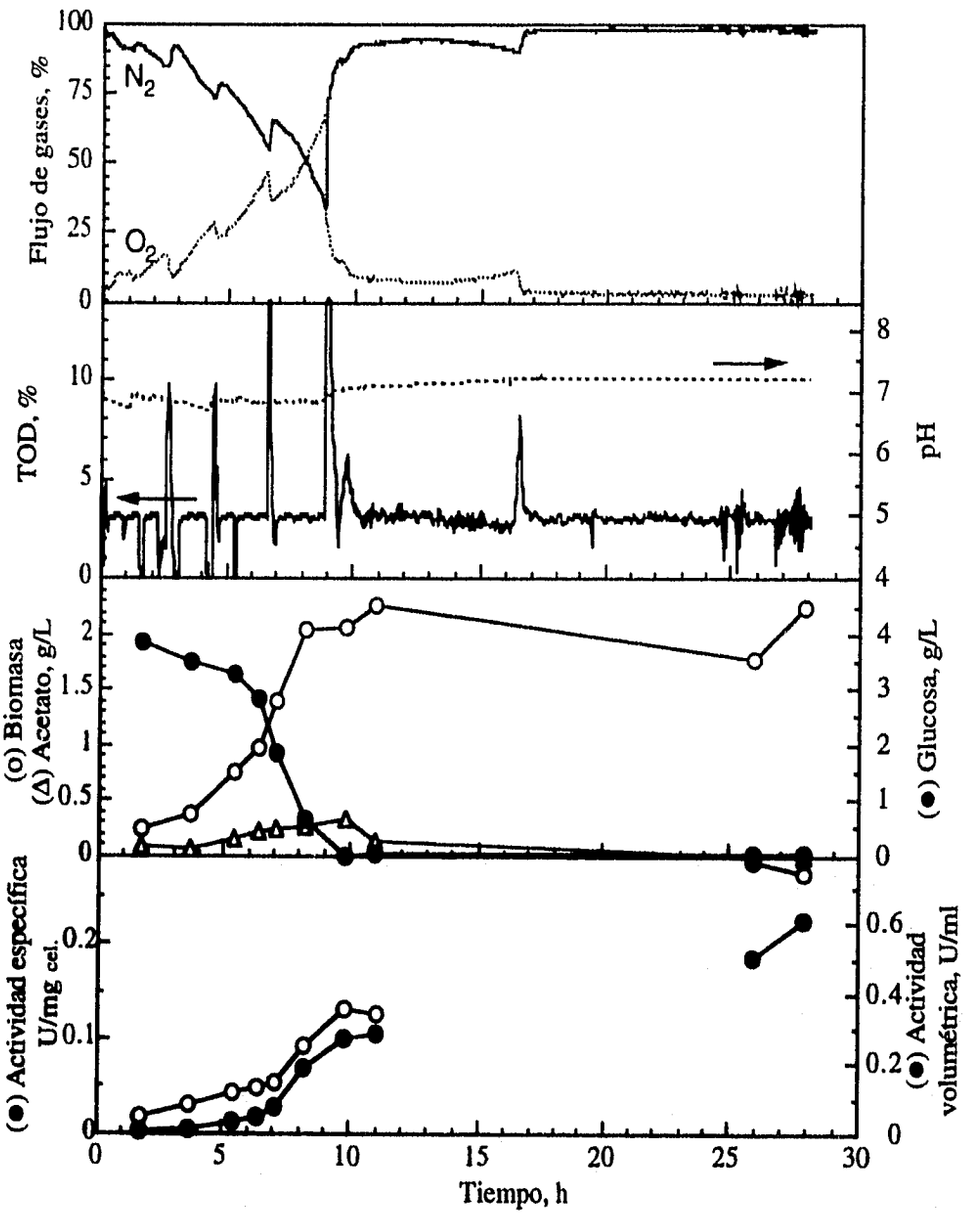


Figura F-4. Cinética de crecimiento a 3 % TOD.

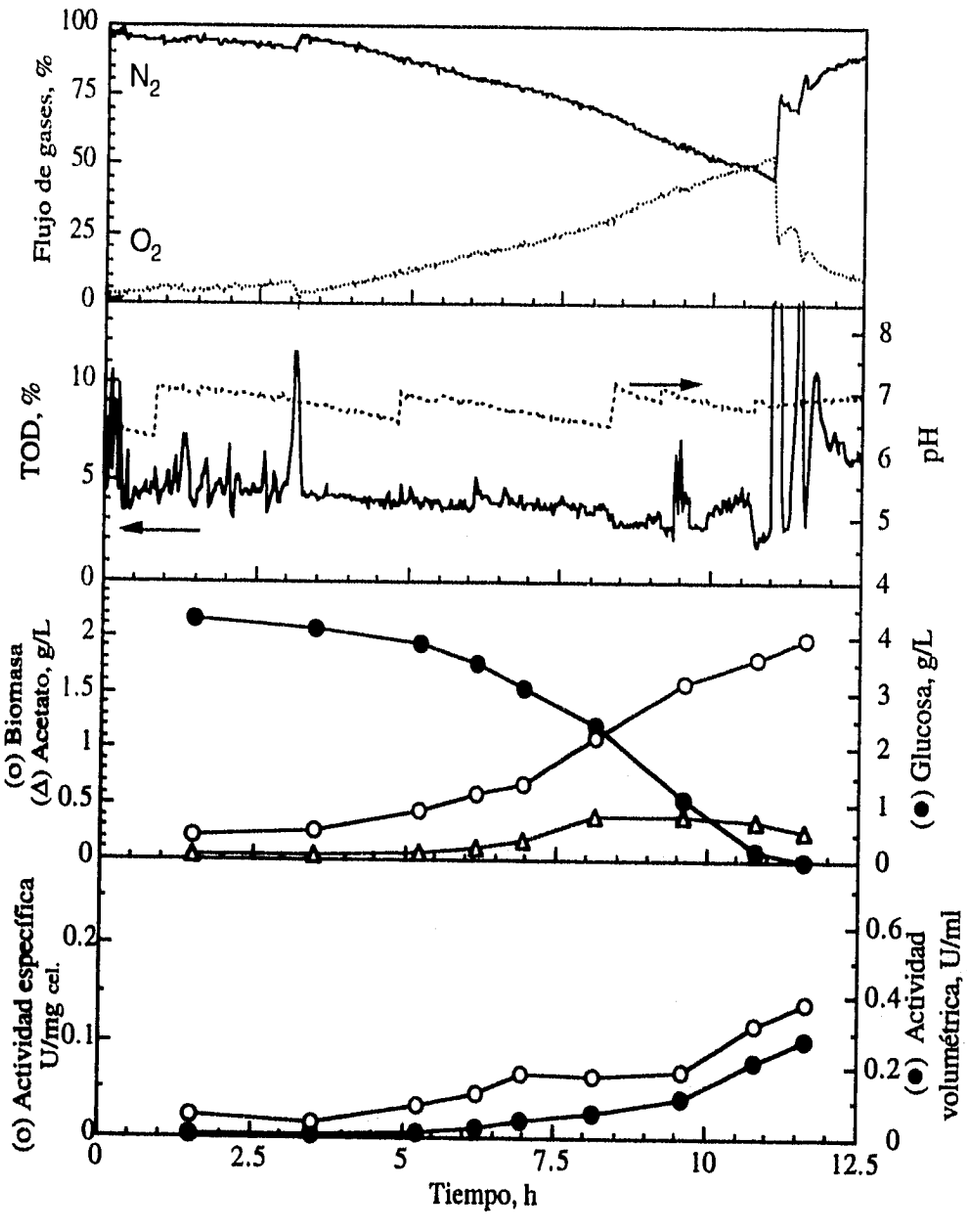


Figura F-5. Cinética de crecimiento a 4 % TOD.

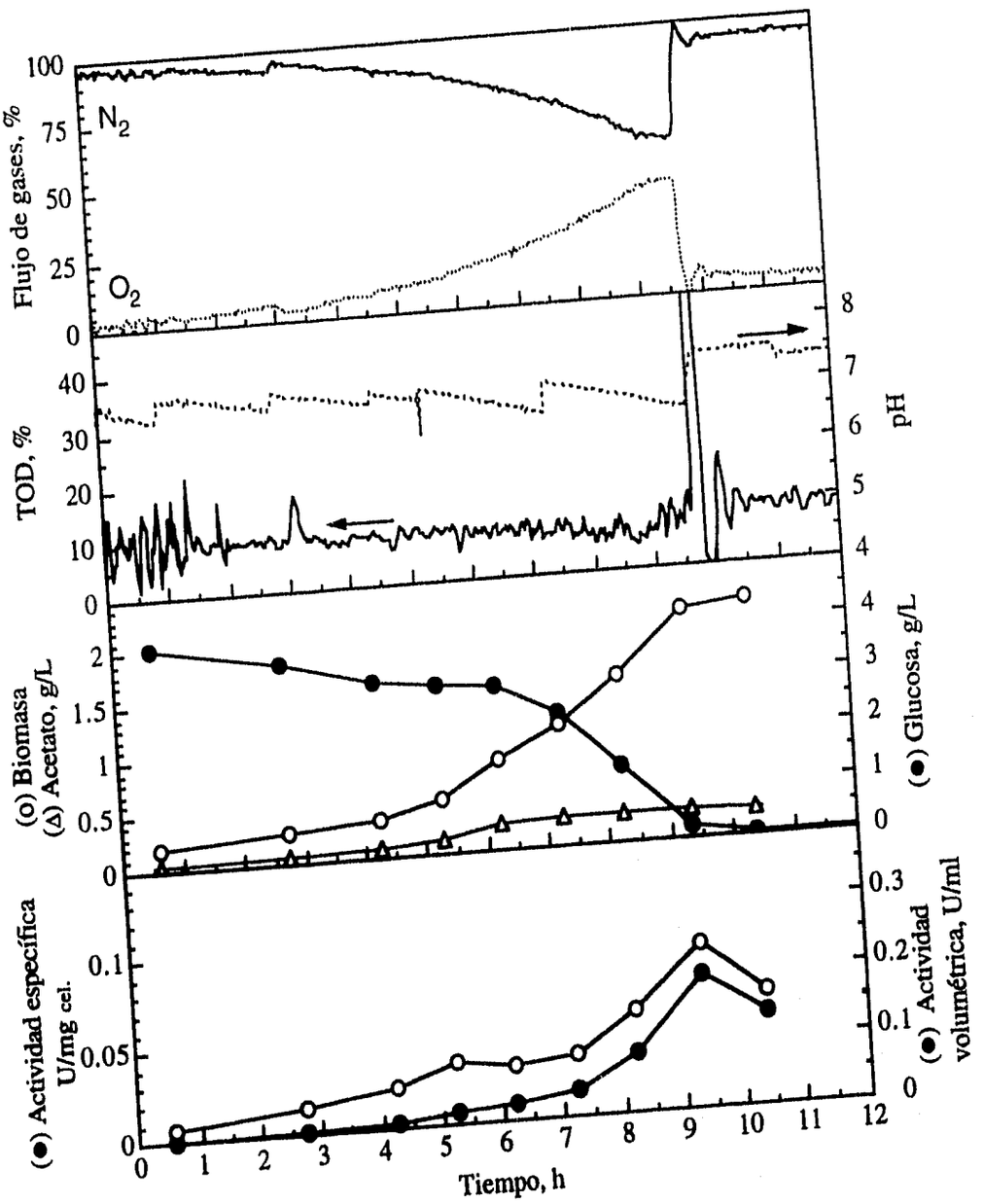


Figura F-6. Cinética de crecimiento a 10% TOD.

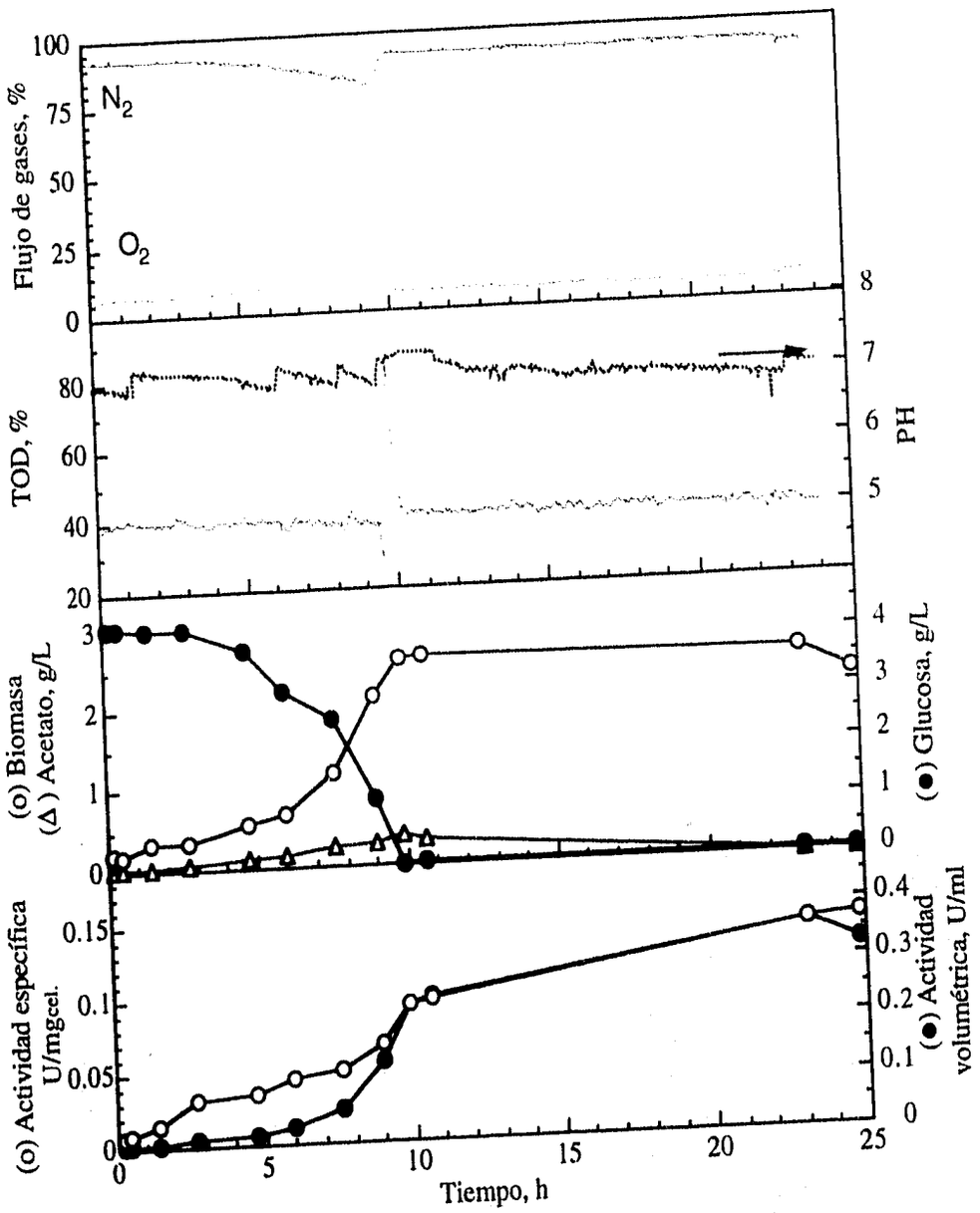


Figura F-7. Cinética de crecimiento a 40 % TOD, medio BSg/kanamicina.

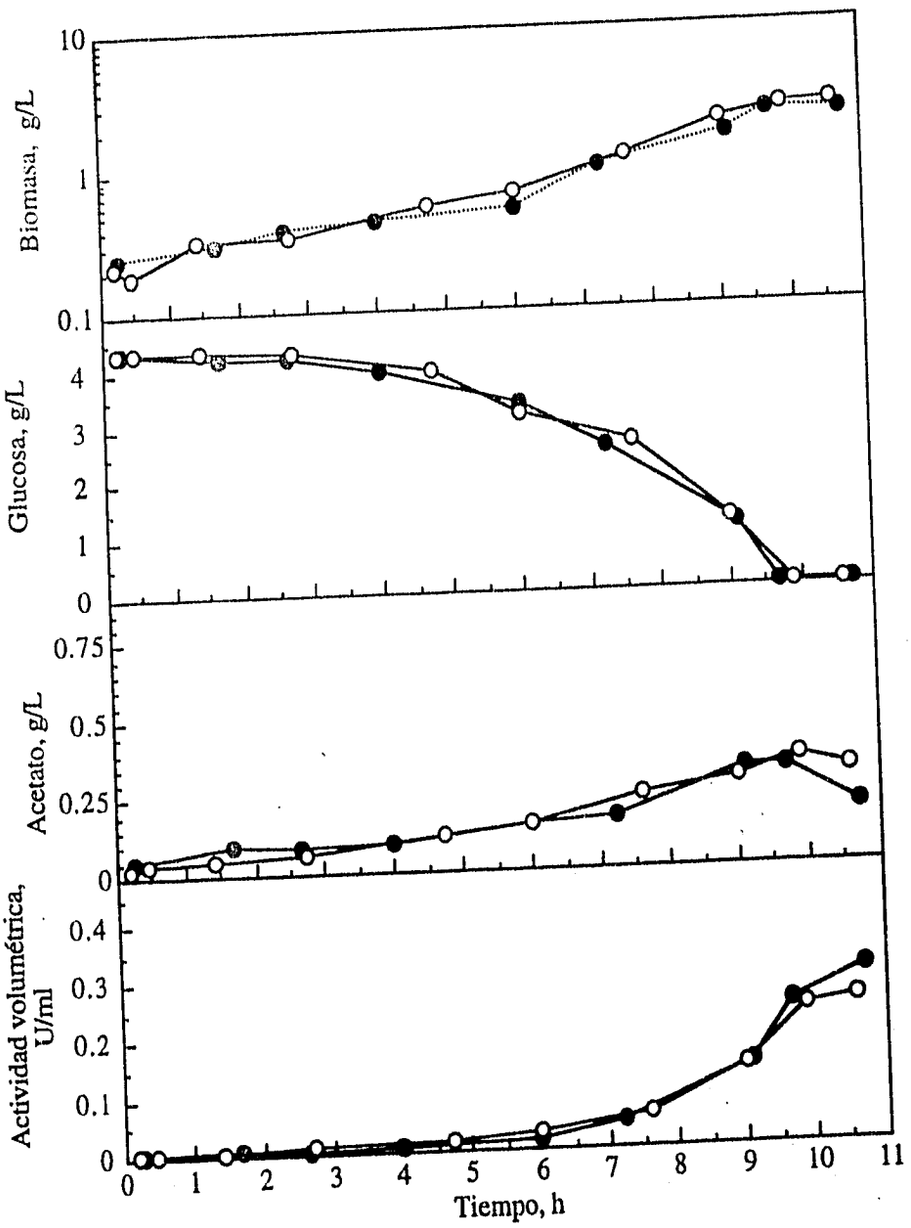


Figura F-8. Comparación de una cinética de crecimiento a 40 % TOD con un duplicado.

G. Cultivos a TOD oscilante

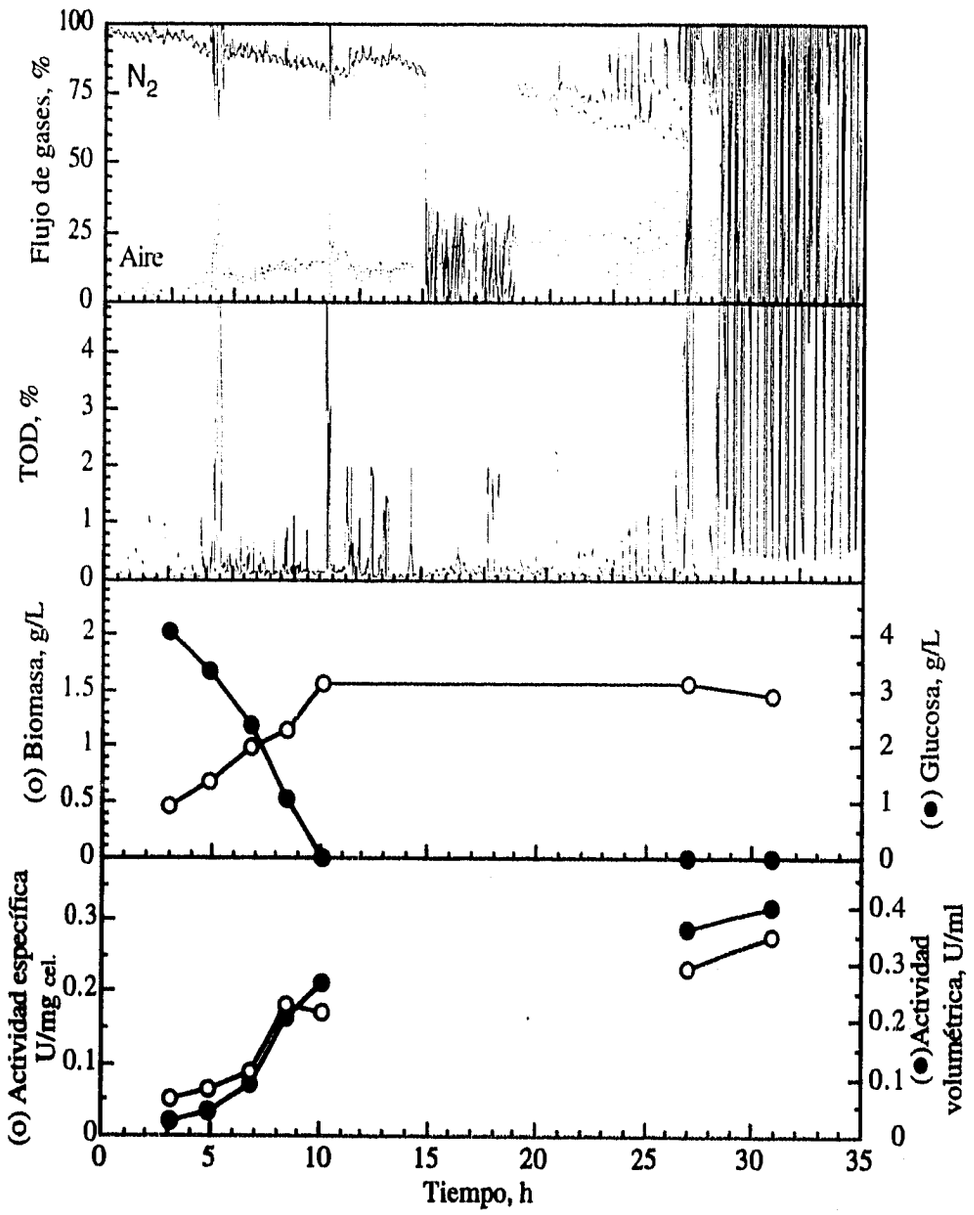


Figura G-1. Cultivo a TOD oscilante (E = 0.5 %, A= 0.5 % y Ω= 400 s).

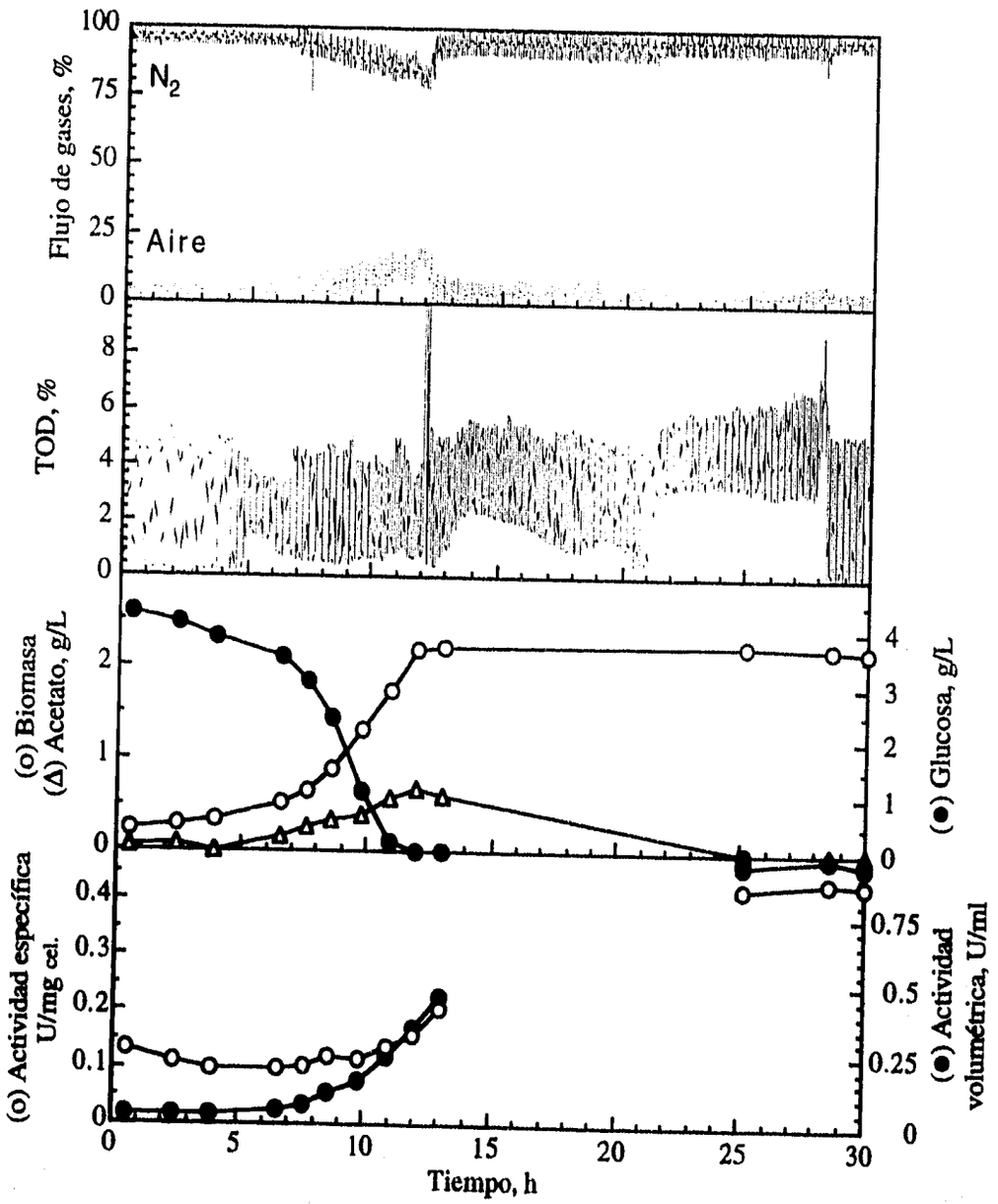


Figura G-2. Cultivo a TOD oscilante (E = 2.5 %, A= 2.5 % y Ω= 400 s).

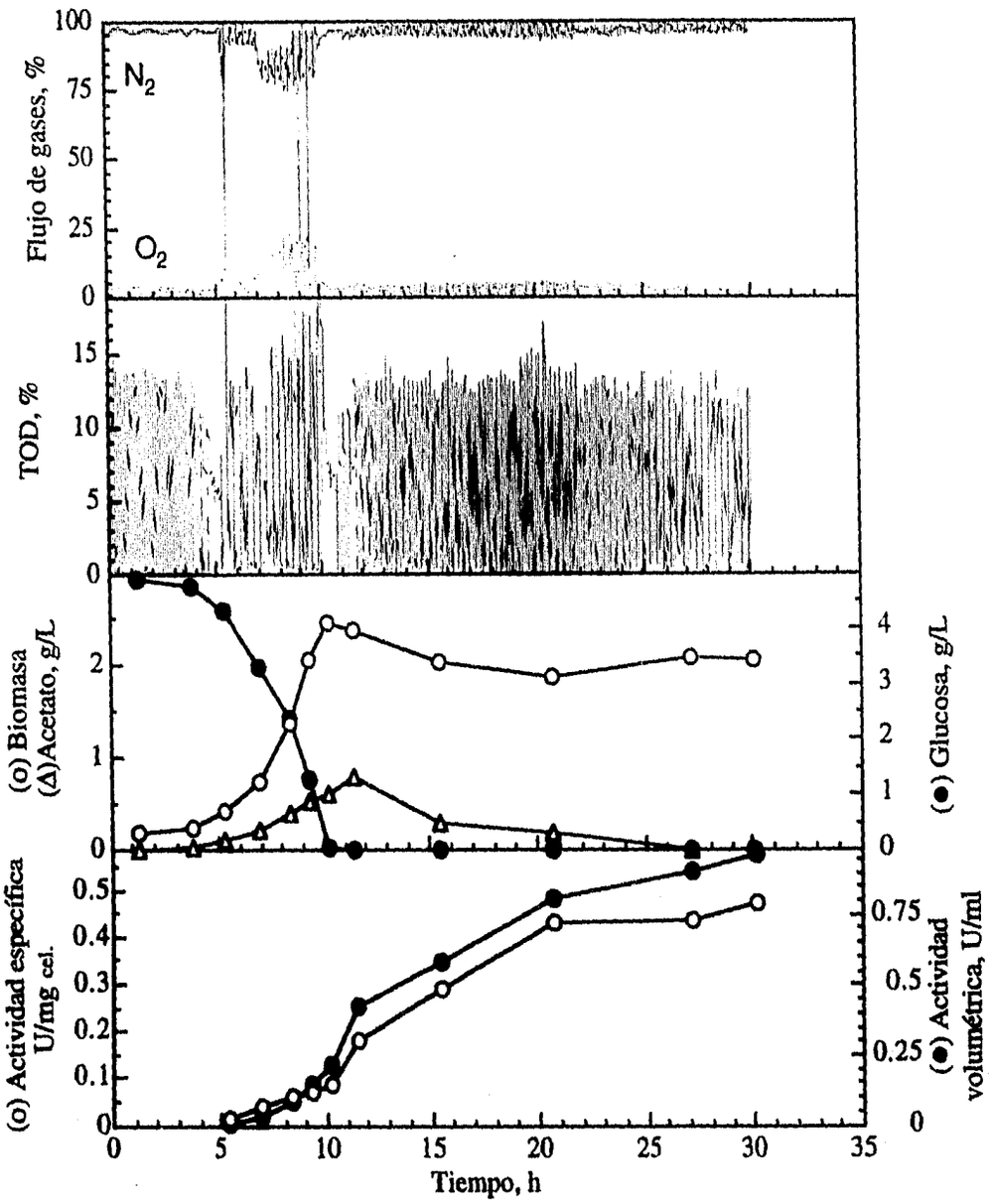


Figura G-3. Cultivo a TOD oscilante (E = 7.5 %, A= 7.5 % y Ω= 400 s).

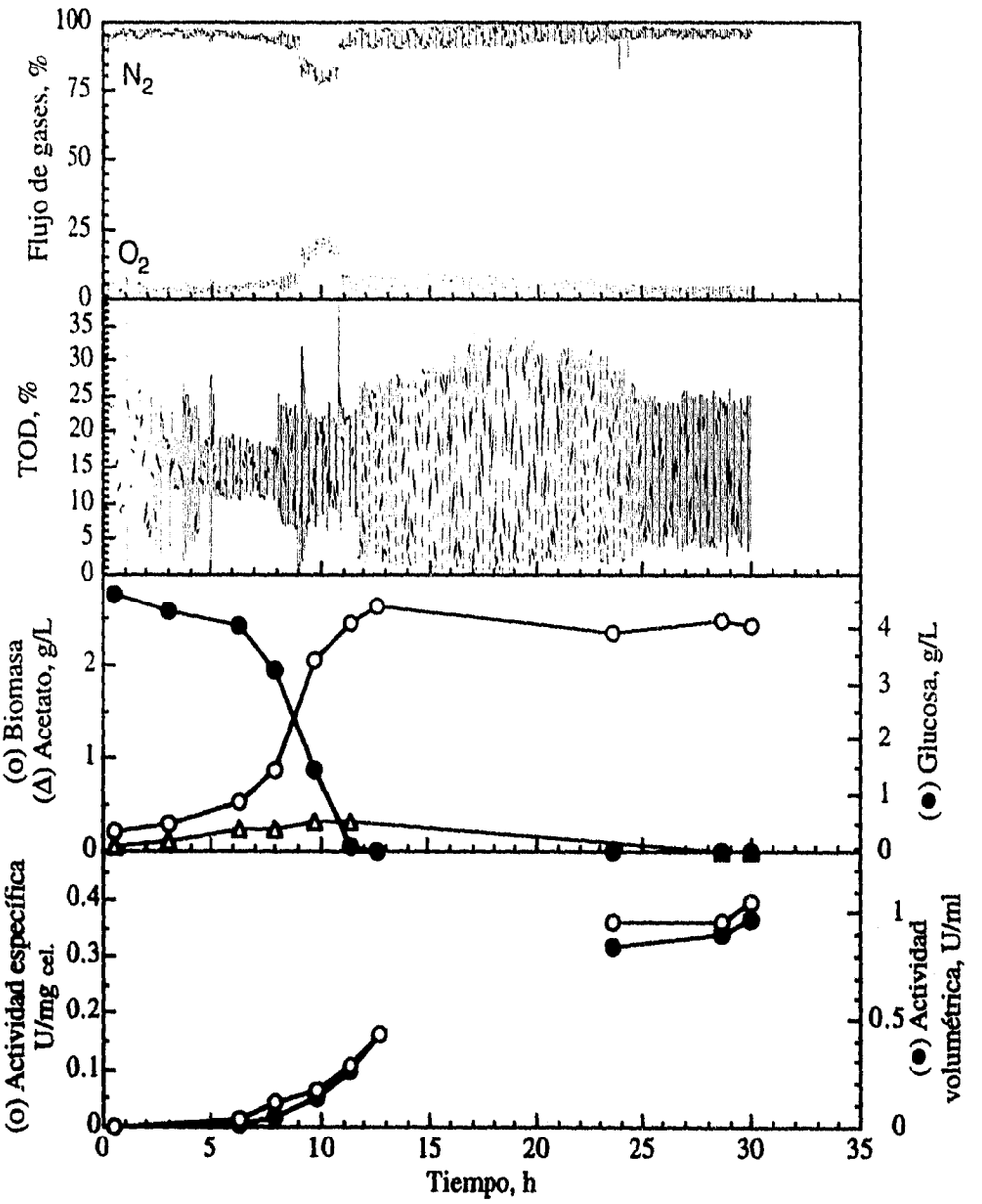


Figura G-4. Cultivo a TOD oscilante (E = 15 %, A= 5 % y Ω= 400 s).

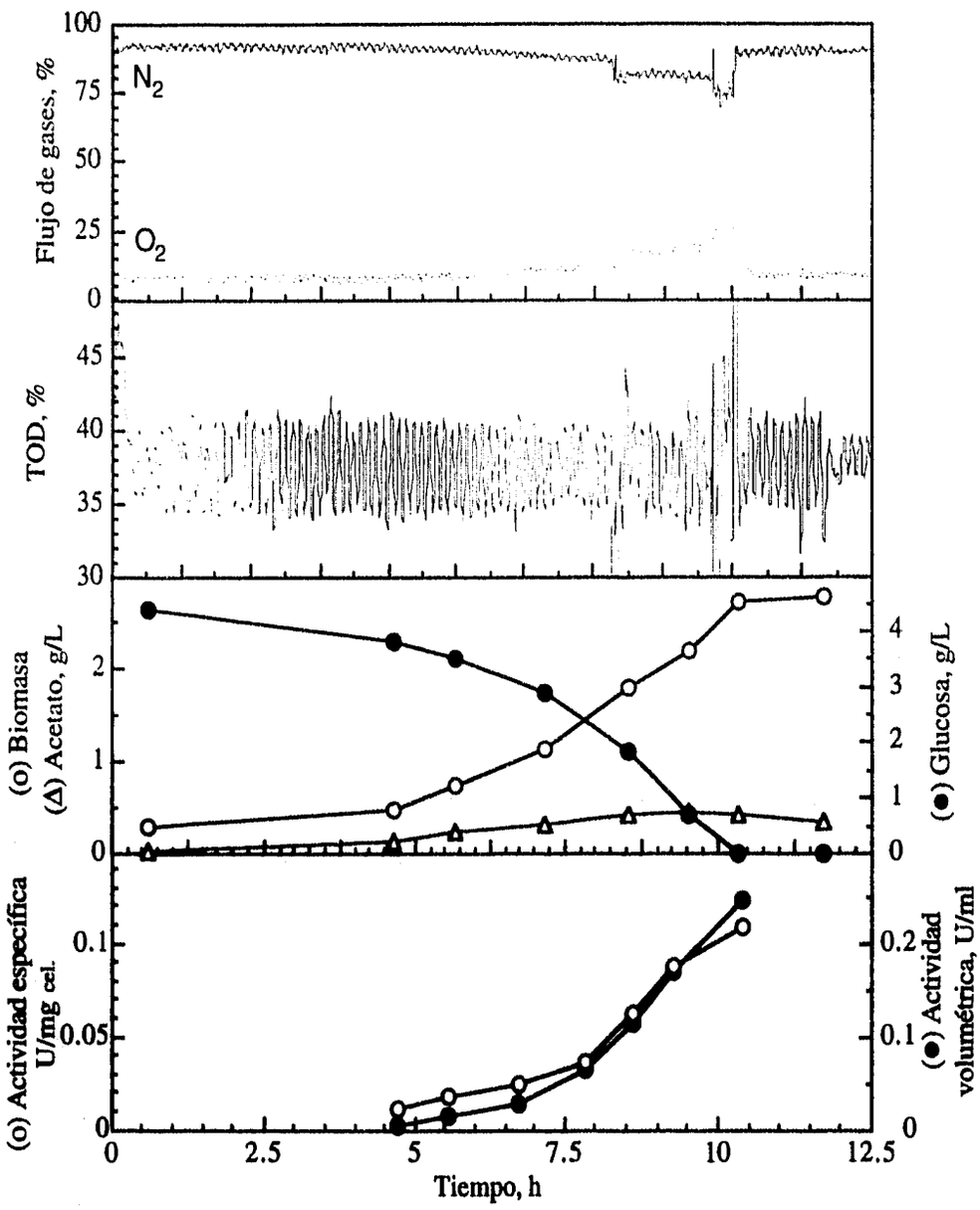


Figura G-5. Cultivo a TOD oscilante (E = 35 %, A= 5 % y Ω= 400 s).

H. Programa de simulación de cultivos lote a TOD oscilante

```
CLS:CLEAR

REM *** entrada de datos***

INPUT "Xo (g/L)=";xo
INPUT "So (g/L)=";so
INPUT "Po (g/L)=";po
INPUT "To (h)=";T0
INPUT "Eje (%)=";eje
INPUT "Amplitud (%)=";amp
INPUT "Período (s)=";per
INPUT "Nombre=";n$

REM **parámetros cinéticos***

beta=19
ks=.155
mm=.38
ko=.54
ymax=.58
ky=.67
per=per/3600
pi=3.1416
h=.1
n=1000

DIM Ts(n),Xs(n),Ss(n),Ps(n),TODs(n),f(3),Mus(n)

100 :
t=T0:x=xo:s=so:p=po
TOD=eje+amp*(SIN(2*pi*t/per))
mu=mm*s*TOD/((ks+s)*(ko+TOD))
y=ymax*TOD/(ky+TOD)
IF mu<0 THEN mu=0
PRINT t,x,s,p,TOD,mu
Ts(c)=t:Xs(c)=x:Ss(c)=s:Ps(c)=p:TODs(c)=TOD:Mus(c)=mu
c=c+1
IF t>30 THEN GOTO archivar
GOSUB 500
k1=f(1):m1=f(2):w1=f(3)
t=T0+h/2
x=xo+k1*h/2
s=so+m1*h/2
p=po+w1*h/2
GOSUB 500
k2=f(1):m2=f(2):w2=f(3)
x=xo+k2*h/2
s=so+m2*h/2
p=po+w2*h/2
GOSUB 500
k3=f(1):m3=f(2):w3=f(3)
t=T0+h
x=xo+k3*h
s=so+m3*h
p=po+w3*h
GOSUB 500
k4=f(1):m4=f(2):w4=f(3)
T0=T0+h
xo=xo+h*(k1+2*k2+2*k3+k4)/6
so=so+h*(m1+2*m2+2*m3+m4)/6
```

```
po=po+h*(w1+2*w2+2*w3+w4)/6
GOTO 100
500 :
REM*** f1=dx/dt*****f2=ds/dt******f3=dp/dt
f(1)=(mu*x)
f(3)=(alfa*mu+beta)*x
IF y=0 and mu=0 THEN f(2)=0: GOTO 600
f(2)=-(mu*x/y)
600 :
RETURN
archivar:
BEEP:PRINT "ARCHIVANDO...."
OPEN "o",#1,"macintosh HD:"+n$+".Sim"
FOR r=1 TO c
WRITE #1,Ts(r),Xs(r),Ss(r),Ps(r),TODs(r),Mus(r)
NEXT
CLOSE #1
BEEP:PRINT "FIN DE ARCHIVANDO"
END
```