



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Matraces con agitación por resonancia acústica y orbital:
Caracterización del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno y
comparación de cultivos de *Escherichia coli*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
I.B.Q. GRETA ISABEL REYNOSO CERECEDA

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDÁN
Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dr. LEOBARDO SERRANO CARREÓN
Dr. CARLOS FELIPE PEÑA MALACARA
Instituto de Biotecnología-UNAM

MÉXICO, D.F. Enero, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 se realizó en la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en el Departamento de Biotecnología y Biología Molecular, bajo la dirección del Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número (CVU/Becario): 549681/297962, así como de los proyectos CONACYT 178528, 214404 y 220795; y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT)-UNAM IN-210013 y IN-209113. Se agradece también al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo económico para la asistencia a congresos.

A mi familia querida en la construcción de un mundo cada día mejor

Lari, Mitzi y Javier

Mario y Gema, y mi padrino Francisco René

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y por liderar activamente tanto el desarrollo del proyecto como el mío.

A los miembros del comité tutorial el Dr. Leobardo Serrano Carreón y el Dr. Carlos Felipe Peña Malacara por el tiempo invertido y sus valiosas aportaciones.

A los miembros del jurado: Dra. Laura A. Palomares Aguilera, Dr. Gerardo Saucedo Castañeda, Dr. Mario Rodríguez Monroy, Dr. Agustín López-Munguía Canales, y Dr. Miquel Gimeno Seco.

A la Dra. N. Adriana Valdez Cruz por seguir de cerca el desarrollo de este proyecto.

A Ramsés García por su colaboración constante y todas sus aportaciones.

A Diego Rosiles y Saul Saavedra por su apoyo durante el trabajo experimental.

A la Dra. Guadalupe Zavala por los análisis de microscopía de transmisión electrónica.

Al Dr. Alejandro Alagón y el M. en C. Alejandro Olvera por proveer amablemente la cepa de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD.

Al Ing. Abel Blancas que cuida de la planta piloto.

Al personal de mantenimiento del IIB.

A Fani que es como mi mano izquierda.

A Diego, Saul, Adrián, Jimena, Karina, Eduardo y Jesús S que hicieron el trabajo tan divertido.

A Daniel y su lado menos oscuro.

A Sara, Andrés, Memo y Giroshi por compartir el camino y su valiosa amistad.

A Ramsés Gamboa que nos enseña una lección de vida.

A la Dra. Martha que admiro tanto.

El alcance individual es limitado comparado con el alcance que tenemos como grupo, por eso a todos los habitantes de la planta y el laboratorio con mucho cariño: Monse, Deisy, Andrea, Mafer, Andreita, Karen, Saumel, Marianita, Jesús, Jessi, A Daniel, Carlos, Mario, Rosa, los que faltan y los recién llegados.

A Angélica por cuidarme; a Kenia y Dani nuestra pequeña familia.

A Paulette que va un paso adelante.

A Andi que la quiero tanto.

A Dante que es una fuente de inspiración.

A los que se tuvieron que ir.

ÍNDICE DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	6
2.1. Suministro de oxígeno en matraces agitados	6
2.1.1. Correlaciones para el cálculo de $k_{L}a$ en matraces agitados orbitalmente	9
2.1.2. Resistencia de los tapones a la transferencia de oxígeno	12
2.1.3. El $k_{L}a$ como criterio para reproducir cultivos en diferentes escalas	13
2.1.4. Monitoreo de oxígeno en matraces agitados	16
2.2. Potencia volumétrica de matraces agitados	22
2.3. Sistema acústico de agitación de matraces	25
2.4. <i>Escherichia coli</i> como modelo biológico	27
3. HIPÓTESIS	33
4. OBJETIVO	33
4.1. Objetivos específicos	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Agitación por resonancia acústica (RAM)	34
5.2. Agitación orbital	34
5.3. Determinación del $k_{L}a$ en matraces agitados por el método dinámico (gassing-out)	35
5.4. Medición del oxígeno disuelto (OD)	37
5.5. Correlación empírica del $k_{L}a$ en matraces con agitación orbital	38
5.6. Modelo empírico para estimar el $k_{L}a$ en matraces agitados en función de las variables operacionales	38
5.7. Microorganismo modelo, medio de cultivo y condiciones de crecimiento	39
5.8. Métodos analíticos	40
5.8.1. Concentración celular	40
5.8.2. Cuantificación de metabolitos extracelulares (glucosa y ácidos orgánicos)	41
5.9. Microscopía electrónica de transmisión	41
5.10. Análisis estadístico	42
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1. Determinación de $k_{L}a$ en matraces agitados	43
6.2. Influencia de los parámetros operacionales en el $k_{L}a$ de matraces agitados	48

6.3.	Cultivos de <i>E. coli</i> en matraces con agitación acústica y orbital	56
6.3.1.	Cultivos no inducidos de <i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3) rSMD en matraces con agitación acústica y orbital	56
6.3.2.	Efecto de los tapones Oxypump sobre el desarrollo de los cultivos no inducidos de <i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3) rSMD en matraces con agitación acústica	64
6.3.3.	Efecto de la velocidad de agitación sobre los cultivos no inducidos de <i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3) rSMD en matraces con agitación acústica	68
6.3.4.	Cultivos de <i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3) en matraces con agitación acústica y orbital	72
7.	CONCLUSIONES	76
8.	PERSPECTIVAS	77
9.	REFERENCIAS	78
10.	ANEXOS	84
	ANEXO 1. Materiales y métodos: información suplementaria	84
A1.1.	Elaboración de los tapones algodón	84
A1.2.	Ejemplo de la determinación de $k_L a$ en matraces agitados con el método dinámico	84
A1.3.	Cálculo de las condiciones de operación “fuera de fase” en matraces agitados	87
A1.4.	Principio de funcionamiento del sensor óptico de oxígeno disuelto	94
A1.5.	Factor de conversión de D.O. (u.a. 600 nm) - g células de <i>E. coli</i>	97
A1.6.	Cuantificación de ácidos orgánicos por HPLC	98
A1.7.	Limitación del uso del sensor óptico de oxígeno disuelto	101
	ANEXO 2 Validación del modelo empírico para estimar el $k_L a$ en matraces agitados	102
	ANEXO 3 Acumulación de ácidos orgánicos en el medio de cultivo	103
	ANEXO 4 Valores de $k_L a$ en matraces agitados por el sistema RAMbio usando tapones Oxypump con y sin el movimiento de fuelle	104
	ANEXO 5 Gel SDS-Page de la proteína total de <i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3)	105
	ANEXO 6 Publicación de resultados	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Principio de funcionamiento de las agitadoras orbitales para matraces agitados (Klöckner y Büchs, 2012).....	4
Figura 2.1. Representación de los pasos y las resistencias involucradas en la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la fase líquida y aproximación del gradiente de concentraciones de oxígeno durante el proceso de transporte. Ver descripción en el texto.(Garcia-Ochoa y Gomez, 2009).	7
Figura 2.2. Representación del desarrollo de los perfiles de OTR (negro) y TOD (azul) en cultivos aerobios. (A) En este caso el oxígeno suministrado no es consumido en su totalidad, el sistema opera siempre por debajo de la OTR _{max} y la TOD permanece superior a cero. (B) La OTR se incrementa con la respiración de los microorganismos hasta alcanzar el límite que el sistema es capaz de proveer bajo condiciones específicas de operación. Adaptado de Maier y Büchs, 2001.	17
Figura 2.3. Sistema de agitación de matraces RAMbio. (A) Incubadora de matraces por resonancia acústica, incluye dos plataformas resonantes, sistema de control de humedad, temperatura y agitación. Se le ajustan las bases para operar matraces de 250, 500 y 1000 mL. (B) Matraz con agua ajustado con tapón Oxypump® agitado en el sistema RAMbio.....	25
Figura 2.4. Aireación de matraces agitados por dos sistemas diferentes: (A) agitación orbital en dos dimensiones. (B) El sistema RAMbio produce oscilaciones en una dimensión mediante la inducción de energía acústica de baja frecuencia.	26
Figura 2.5. Rutas metabólicas principales involucradas en el consumo aerobio de glucosa por <i>E. coli</i> , y la síntesis de acetato, dióxido de carbono y biomasa. El consumo de glucosa se realiza principalmente mediante la vía del sistema fosfotransferasa (PTS), que genera de forma simultánea piruvato a partir de fosfoenolpiruvato (PEP). El acetato se forma a partir de piruvato por acción de la piruvato oxidasa y de las enzimas fosfotransacetilasa/acetato cinasa. La PEP carboxilasa es la vía anaplerótica necesaria para el reabastecimiento de los intermediarios del ciclo del TCA consumidos para la formación de biomasa. Tomado de Eiteman y Altman, 2006.	30
Figura 5.1. Tapones Oxypump®. (A) Estos tapones de silicona flexible se componen de 4 partes, cada una con funciones específicas. El diseño del tapón busca generar un intercambio activo de gases, contener el goteo dentro del matraz y evitar que partículas en el aire contaminen el cultivo. (B) El tapón Oxypump modificado tiene sujeto el fuelle para cancelar el movimiento de bombeo (Reynoso-Cereceda <i>et al.</i> , 2016).....	35
Figura 6.1. Valores de $k_L a$ en matraces agitados en función de la velocidad de agitación, en matraces con diferente volumen nominal en el sistema de agitación acústica (A) 250 mL, (B) 500 mL y (C) 1000 mL; y con agitación orbital (D) 250 mL, (E) 500 mL y (F) 1000 mL. Las mediciones se hicieron variando el volumen de llenado a 30 y 37°C. Se muestran la media y la desviación estándar de al menos tres repeticiones. Las líneas continuas representan la predicción usando el modelo de la ecuación 2.6 considerando un volumen de llenado del 20%.....	45

Figura 6.2. Relación del área superficial del líquido correspondiente al diámetro interior máximo del matraz entre el volumen de llenado de agua (A/V), en función del volumen de llenado para cada condición de volumen nominal de matraz evaluado. 49

Figura 6.3. Valores de $k_{L,a}$ en matraces agitados en función del parámetro A/V que agrupa la geometría del matraz y el volumen de llenado (Tabla 5.2, Figura 6.2); en matraces con diferente volumen nominal en el sistema de agitación RAMbio (A) 30°C y (B) 37°C; y con agitación orbital (C) 30°C y (D) 37°C. Se grafican los valores de $k_{L,a}$ a diferentes velocidades de agitación. Se muestran la media y la desviación estándar de al menos tres repeticiones. 50

Figura 6.4. El $k_{L,a}$ en matraces con agitación orbital se determina en función de la velocidad de agitación. Los parámetros operacionales considerados para la comparación incluyen un matraz de 500 mL ($d=105$ mm), con 100 mL de agua ($V_F=20\%$), con un diámetro de agitación de 25 mm, a 30°C (en caso de los modelos que consideran parámetros fisicoquímicos). La representación gráfica está dentro el intervalo de condiciones que fueron validadas para cada modelo (Reynoso-Cereceda *et al.*, 2016). 52

Figura 6.5. Validación de los modelos empíricos propuestos para estimar el $k_{L,a}$ en matraces agitados en el sistema RAMbio. Se muestran los gráficos espejo que comparan los valores de $k_{L,a}$ estimados contra los experimentales, para matraces incubados a dos temperaturas (A) 30°C y (B) 37°C; que se obtuvieron variando el volumen nominal (250, 500 y 1000 mL), el volumen de llenado relativo (10-40%), y las velocidades de agitación (3-20 g). La línea de 45° representa un ajuste perfecto entre el valor experimental y el predicho. 53

Figura 6.6. Validación de los modelos empíricos propuestos para estimar el $k_{L,a}$ en matraces agitados a 37°C. Se muestran los gráficos espejo que comparan los valores de $k_{L,a}$ estimados contra los experimentales, para matraces incubados a dos temperaturas (A) 30°C y (B) 37°C; que se obtuvieron variando el volumen nominal (250, 500 y 1000 mL), el volumen de llenado relativo (10-40%), y las velocidades de agitación (100-350 rpm). La línea de 45° representa un ajuste perfecto entre el valor experimental y el predicho. 54

Figura 6.7. Desarrollo de los cultivos no inducidos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD crecidos en matraces agitados por resonancia acústica y orbital, a dos valores equivalentes de $k_{L,a}$ inicial (46 y 92 h^{-1}) Tabla 6.2; (A), (E) Cinética de crecimiento; (B), (F) consumo de glucosa; (C), (G) perfiles de oxígeno disuelto (D) acumulación de acetato, y (H) acumulación de acetato y caída de pH. Las condiciones de operación fueron: $V_N=500$ mL, $V_F=20\%$ (100 mL de medio SM) a 37°C. Se muestran la media y la desviación estándar de al menos dos repeticiones independientes de los datos de concentración de biomasa, glucosa, acetato y pH. En los perfiles de oxígeno disuelto se muestran dos tendencias típicas. 59

Figura 6.8. Cortes transversales de las células de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD (cultivos sin inducir) vistas con microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se observan células en fase exponencial de un cultivo en matraces agitados por el sistema RAMbio a dos valores de $k_{L,a}$ inicial (A) 46 h^{-1} (5 g) y (B) 92 h^{-1} (10 g); y con agitación orbital a (C) 46 h^{-1} (200 rpm) y (D) 92 h^{-1} (350 rpm). Los cultivos se crecieron en medio SM a 37°C (Figura 6.7) (barras de escala de 5.0, 2.0, 1.0 y 0.5 μm). 62

Figura 6.9. Desarrollo de los cultivos no inducidos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD crecidos en matraces agitados por el sistema RAMbio a 10 g usando tapones Oxypump normales y modificados a un k_{La} inicial de 92 h^{-1} . (A) Cinética de crecimiento; (B) consumo de glucosa; (C) perfil de oxígeno disuelto y (D) caída de pH. Las condiciones de operación fueron: $V_N=500 \text{ mL}$, $V_F=20\%$ (100 mL de medio SM) a 37°C . Se muestran la media y la desviación estándar de al menos dos repeticiones independientes de los datos de concentración de biomasa, glucosa y pH. Para el oxígeno disuelto se muestra el perfil de una tendencia típica. 65

Figura 6.10. Comparación de los parámetros cinéticos de los cultivos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD crecidos en matraces agitados en los sistemas RAMbio, orbital, y RAMbio utilizando los tapones Oxypump modificados; a dos valores equivalentes de k_{La} (46 y 92 h^{-1}). (A) Velocidad específica de crecimiento (fase de crecimiento exponencial); además se muestran (B) velocidad específica de consumo de glucosa, (C) velocidad específica de producción de acetato, (D) rendimiento biomasa glucosa y (E) rendimiento acetato-biomasa calculados a las 10 h de cultivo (Figura 6.7). Las condiciones de operación fueron: tamaño nominal de matraz 500 mL con 20% de volumen de llenado (100 mL de medio SM) a 37°C . Se muestran la media y la desviación estándar de al menos dos repeticiones independientes. De acuerdo al análisis estadístico las letras diferentes indican diferencias significativas: $0.01 < P < 0.05$, 67

Figura 6.11. Desarrollo de los cultivos no inducidos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD crecidos en matraces agitados por el sistema RAMbio a diferentes velocidades de agitación (10 y 12.5 g) con un valor equivalente de k_{La} inicial (92 h^{-1}). (A) Cinética de crecimiento; (B) consumo de glucosa; (C) perfil de oxígeno disuelto y (D) caída de pH. Las condiciones de los cultivos fueron de $V_N=1000 \text{ mL}$, $V_F=45\%$ (450 mL de medio SM) a 37°C . Se muestran la media y la desviación estándar de al menos dos repeticiones independientes de los datos de concentración de biomasa, glucosa y pH. Para el perfil de oxígeno disuelto se muestra una tendencia típica. 69

Figura 6.12. Desarrollo de los cultivos de la cepa silvestre de *E. coli* BL21-Gold (DE3) crecidos en matraces agitados por resonancia acústica y orbital, a un valor de k_{La} inicial de 92 h^{-1} Tabla 6.5; (A) Cinética de crecimiento; (B) consumo de glucosa; (C) perfiles de oxígeno disuelto y (D) perfil de pH. Las condiciones de operación fueron: $V_N=500 \text{ mL}$, $V_F=20\%$ (100 mL de medio SM) a 37°C . Se muestran la media y la desviación estándar de al menos dos repeticiones independientes de los datos de concentración de biomasa, glucosa, acetato y pH. En los perfiles de oxígeno disuelto se muestran tendencias típicas..... 73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 5.1. Dimensiones representativas de los matraces Erlenmeyer (Duran®) de vidrio usados en los experimentos de este trabajo.	37
Tabla 5.2. Relación del área correspondiente al diámetro máximo del matraz entre el volumen de agua (A/V), que agrupa los factores de geometría del matraz y volumen de llenado, para cada una de las condiciones evaluadas.	39
Tabla 6.1. Valores de las constantes del modelo empírico propuesto (Ecuación 6.1), y bondad del ajuste, para el $k_L a$ en matraces agitados en función de la velocidad de agitación (n_g, n) y la relación A/V , con agitación acústica y orbital a 30 y 37°C.	51
Tabla 6.2. Condiciones operacionales y parámetros cinéticos representativos de los cultivos de <i>E. coli</i> . Se muestra la media y la desviación estándar de al menos dos cultivos independientes.	56
Tabla 6.3. Condiciones operacionales y parámetros cinéticos representativos de los cultivos de <i>E. coli</i> creciendo en el sistema de agitación RAMbio a 10 g usando el tapón Oxypump con y sin modificación. Se muestra la media y la desviación estándar de al menos dos cultivos independientes.	64
Tabla 6.4. Condiciones operacionales y parámetros cinéticos representativos de los cultivos de <i>E. coli</i> . Creciendo en el sistema de agitación RAMbio a 12.5 g. Se muestra la media y la desviación estándar de al menos dos cultivos independientes.	68
Tabla 6.5. Condiciones operacionales y parámetros cinéticos representativos de los cultivos de la cepa silvestre de <i>E. coli</i> . BL21-Gold (DE3). Se muestra la media y la desviación estándar de al menos dos cultivos independientes.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

A: área superficial máxima del líquido que puede lograrse al interuir interior del matraz sin movimiento, cm^2

a, b, c: coeficientes del modelo empírico, específicos para cada sistema de agitación

adj R^2 : R-cuadrada ajustada

A/V: relación área superficial/volumen de llenado, cm^{-1}

C_L^* : concentración de oxígeno correspondiente a la saturación en la interfase

C_L : concentración de oxígeno en el seno del líquido

d: diámetro interior máximo del matraz, m

d_0 : diámetro de agitación o excentricidad, cm

d_f : difusividad de oxígeno en agua, $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$

D_T : diámetro del tanque, m

DF: grados de libertad

D.O.: densidad óptica, u.a.

Fr: número de Froude

g: aceleración de la gravedad, $\text{m}.\text{s}^{-2}$

IPTG: isopropil tiogalactósido

k_L : coeficiente de transferencia de masa, $\text{kg}.\text{s}^{-1}.\text{m}^{-2}$

$k_{L,a}$: coeficiente volumétrico o global de transferencia de oxígeno, h^{-1}

n: velocidad de agitación, s^{-1} o min^{-1}

n_g : velocidad de agitación mediada como aceleración de la gravedad, g

n_i : velocidad de agitación del impulsor, min^{-1}

OTR: velocidad de transferencia de oxígeno, $\text{kg O}_2.\text{m}^{-3}.\text{día}^{-1}$ o $\text{mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$

OTR_{max} : velocidad máxima de transferencia de oxígeno, $\text{kg O}_2.\text{m}^{-3}.\text{día}^{-1}$ o $\text{mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$

RAM: agitación por resonancia acústica

RMSE: raíz cuadrada del error cuadrático medio

rSMD: esfingomielinasa D recombinante

SI: sistema internacional de medidas

SOD: superóxido dismutasa

TCA: ciclo de los ácidos tricarbónicos

TOD: tensión de oxígeno disuelto, % saturación con aire

V_N : volumen nominal, mL

V_F : volumen de llenado relativo, % volumen del líquido/volumen nominal del matraz

V: volumen de llenado, mL

x: concentración de biomasa, u.a. o g/L

RESUMEN

Los matraces agitados orbitalmente tienen un uso extendido debido a su facilidad de operación y a que permiten el estudio y selección de una variedad de factores importantes durante el desarrollo de los bioprocesos. El suministro insuficiente de oxígeno a través de la interfase gas-líquido y/o a través del tapón del matraz es una limitación importante cuando se tienen cultivos aerobios creciendo en matraces agitados. Diferencias en la disponibilidad de oxígeno durante el cultivo generan cambios en el metabolismo. Evaluar tecnologías alternativas de agitación para cultivos en matraces, como la agitación por resonancia acústica (RAM), representa una solución operacional factible. Applikon® Biotechnology ha introducido esta tecnología en el sistema RAMbio y se propone como una solución para contrarrestar la limitación de oxígeno en cultivos microbianos contenidos en matraces agitados. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el sistema RAMbio en términos del k_{LA} en comparación a matraces con agitación orbital. Los valores máximos de k_{LA} obtenidos durante este trabajo fueron $131.3 \pm 5.1 \text{ h}^{-1}$ con agitación orbital y $435.4 \pm 11.7 \text{ h}^{-1}$ en el sistema RAMbio. Se propusieron y validaron modelos empíricos que permiten estimar el k_{LA} en función de los parámetros operacionales que incluyen la velocidad de agitación y la relación área superficial/volumen de llenado, con una desviación de $\pm 30\%$. Conjuntamente, se utilizó la cepa *E. coli* BL21-Gold (DE3) con la capacidad de producir esfingomielinasa D de garrapata recombinante (rSMD), como modelo para estudiar el efecto del suministro de oxígeno en matraces agitados por el sistema RAMbio en comparación al orbital. El suministro de oxígeno en cada sistema de agitación se comparó bajo las condiciones operacionales que permitieron igualar el k_{LA} inicial. A un k_{LA} inicial de 46 h^{-1} el desarrollo de las cinéticas fue reproducible en ambos sistemas de agitación. Sin embargo, a un mayor suministro de oxígeno ($k_{LA}=92 \text{ h}^{-1}$) los cultivos mostraron diferencias pronunciadas en cuanto a los perfiles de oxígeno disuelto, las velocidades específicas de crecimiento y el consumo de la fuente de carbono que fueron reducidas con agitación en el sistema RAMbio. Dichas diferencias se asociaron a una mayor transferencia de oxígeno debido al movimiento de fuelle de los tapones Oxypump que se utilizan en el sistema RAMbio. No se encontró efecto negativo en el crecimiento de los cultivos de *E. coli* debido al incremento en la velocidad de agitación en el sistema RAMbio. Adicionalmente, se realizaron cultivos de la cepa sin transformar *E. coli* BL21-Gold (DE3) donde la duración de la fase de crecimiento fue mayor cuando se incubó en el sistema RAMbio en comparación al orbital y a la cepa transformada crecida en ambos sistemas de agitación. En este trabajo se presenta por primera vez la caracterización del sistema de agitación RAMbio en términos del k_{LA} , el equipo permite operar a elevadas velocidades de suministro de oxígeno. Los modelos empíricos propuestos para estimar el k_{LA} en matraces con agitación orbital y por el sistema RAMbio resultan útiles para seleccionar las condiciones operacionales que aseguren un suministro inicial de oxígeno acorde a la demanda del cultivo de interés.

ABSTRACT

Shaken flasks are widely used in bioprocesses due to their flexibility and ease of operation, mainly during the early stages of bioprocess development. The insufficient supply of oxygen through the gas–liquid interface or/and the flask closure is a major deficiency of orbital shaken flasks as culture bioreactors. Undesirable changes in the metabolism are often generated by differences in the availability of oxygen during aerobic cultures. New mixing technologies should be evaluated as an alternative to avoid oxygen transfer limitations in orbital shaken flasks. In this fashion, the resonant acoustic mixing (RAM) is a noncontact mixing technology introduced in the RAMbio system (Applikon® Biotechnology) for application in the biotechnology field. The aim of this study was to experimentally determine empirical k_{La} correlations for RAM and compare them with orbital mixing. The maximum k_{La} obtained here was $131.3 \pm 5.1 \text{ h}^{-1}$ for orbital mixing and $435.4 \pm 11.7 \text{ h}^{-1}$ for RAM. Empirical correlations were found for k_{La} as a function of shaking frequency and superficial area/filling volume ratio, with an accuracy of $\pm 30\%$. Moreover, to compare the two mixing approaches based on the same initial k_{La} , *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD cultures were carried out. Establishing the same aeration capabilities for each agitation system in terms of the initial k_{La} (46 h^{-1}), allowed us to perform reproducible *E. coli* BL21-Gold (DE3) cultures. However, at a higher equivalent k_{La} initial value (92 h^{-1}), differences in the dissolved oxygen profiles and culture parameters were found, mainly in growth rate and biomass yield on glucose; those differences are possibly related to an enhanced oxygen transfer favored by the the oscillating movement of the bellows element of the Oxypump stopper used to seal the flasks when mixed in the RAMbio. Moreover, it was shown that no negative effect over the growth of the *E. coli* cultures is associated with high mixing frequencies in the RAMbio system. Finally, non-transformed *E. coli* BL21-Gold (DE3) cultures were carried out; their growth was enhanced in the RAMbio system, due to the increase oxygen supply. Differences in growth performance were found between the strains *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD and the non-transformed *E. coli* BL21 (DE3 gold). As a result from this work the empirical equations can be applied to calculate the initial oxygen transfer coefficient, using relevant cultivation parameters, such as the shaking frequency, the flask diameter, and the filling volume. To our knowledge, this is the first k_{La} correlation that has been defined and validated for RAM shakers.

1. INTRODUCCIÓN

Los matraces agitados se usan desde el siglo pasado como biorreactores a pequeña escala para el crecimiento y desarrollo de cultivos microbianos. Posiblemente, el primer cultivo sumergido en matraces agitados fue de *Aspergillus flavus*, que llevaron a cabo los investigadores Kluyver y Perquin en 1933 (Finn, 1954; Suresh *et al.*, 2009b; Klöckner y Büchs, 2011). Actualmente, los matraces agitados son ampliamente utilizados en la industria y la academia, principalmente en las primeras etapas del desarrollo de bioprocesos, debido a su versatilidad, bajo coste y facilidad de operación. Por ejemplo, en experimentos de selección clonal, diseño de medios de cultivo, la elección de las condiciones óptimas de operación como pH, temperatura y tiempo de cultivo, además de la evaluación de los principales parámetros cinéticos (Henzler y Schedel, 1991; Veglio *et al.*, 1998; Büchs, 2001; Freyer *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2006; Suresh *et al.*, 2009b; Klöckner y Büchs, 2011).

Se ha estimado que cerca del 90% de todos los cultivos experimentales con aplicaciones biotecnológicas se realiza en matraces agitados (Büchs, 2001). Los más usados son los matraces cónicos Erlenmeyer con volúmenes nominales de 25 mL a 6 L. Estos están hechos de materiales como vidrio (hidrofilico) o plástico (hidrofóbico). La simplicidad del sistema permite desarrollar en paralelo un gran número de cultivos en lote que resultan económicamente eficientes (Büchs, 2001; Zimmermann *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010; Klöckner y Büchs, 2011; Klöckner y Büchs, 2012).

La agitación de los matraces cumple dos propósitos: asegurar una distribución homogénea de los nutrientes y lograr una transferencia adecuada de oxígeno, así como la remoción de dióxido de carbono, a través de la interfase gas-líquido. En el caso de los cultivos con viscosidad moderada o baja, la transferencia de gases es el aspecto más importante (Henzler y Schedel, 1991; Garcia-Ochoa *et al.*, 2010). La agitación más usada es la orbital, en la que el mezclado y el suministro de energía son provistos por la fuerza centrífuga rotacional. El principio básico de la agitación orbital se ilustra en la Figura 1.1. La agitación desarrolla un movimiento de traslación circular con un determinado diámetro de agitación (d_0). La rotación produce una fuerza centrífuga que empuja el líquido hacia las paredes del matraz. En los matraces convencionales, se genera una rotación regular del flujo del líquido con

una geometría predecible (Büchs, 2001; Maier y Büchs, 2001; Maier *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2010). Este consistente patrón de flujo es la razón por la que la agitadora orbital se posicionó como la principal forma de agitación de matraces para el cultivo de microorganismos, por encima de por ejemplo la agitación recíproca lineal (Freedman, 1970; Veljkovic *et al.*, 1995; Büchs, 2001; Suresh *et al.*, 2009b; Klöckner y Büchs, 2012).

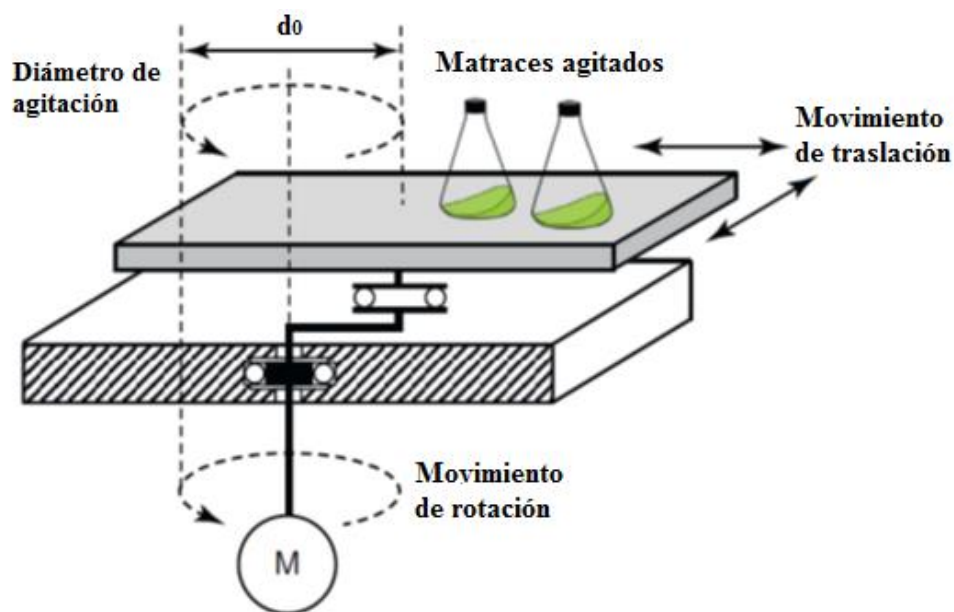


Figura 1.1. Principio de funcionamiento de las agitadoras orbitales para matraces agitados (Klöckner y Büchs, 2012).

El suministro insuficiente de oxígeno es una limitación importante cuando se tienen cultivos aerobios creciendo en matraces agitados, en los que la provisión de este nutriente es crucial para el crecimiento y formación de producto. Las principales resistencias a la transferencia de oxígeno se dan a través de la interfase gas-líquido y/o a través del tapón del matraz (Veljkovic *et al.*, 1995; Veglio *et al.*, 1998; Büchs, 2001; Maier y Büchs, 2001; Anderlei y Büchs, 2001; Tolosa *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 2006; Klöckner y Büchs, 2011; Klöckner y Büchs, 2012).

Los aspectos ingenieriles de los matraces agitados permanecieron subestimados durante mucho tiempo. Sin embargo, la elección de las condiciones de trabajo no es trivial. Condiciones inadecuadas de operación durante las primeras etapas en el desarrollo de bioprocesos, pueden originar resultados inferiores y decisiones equivocadas, como la elección de cepas de bajo rendimiento o medios de cultivo inconvenientes. Revertir los resultados negativos de la producción en escalas superiores puede ser muy costoso o

incluso inviable. En consecuencia, las condiciones de agitación de los matraces tienen que ser monitoreadas cuidadosamente para evitar que propicien condiciones inconvenientes para el desarrollo del cultivo como es la limitación por oxígeno (van Suijdam *et al.*, 1978; Büchs, 2001; Maier y Büchs, 2001; Büchs *et al.*, 2001; Maier *et al.*, 2004; Freyer *et al.*, 2004; Losen *et al.*, 2004;; Zimmermann *et al.*, 2006; Suresh *et al.*, 2009b; Klöckner y Büchs, 2011; Klöckner y Büchs, 2012).

Una alternativa disponible a la agitación orbital es la tecnología de agitación por resonancia acústica (RAM: Resonant Acoustic® Mixing) que induce el mezclado mediante resonancia mecánica con una frecuencia fija alrededor de los 60 Hz (Applikon Biotechnology®, 2013). En este sentido, el sistema RAMbio (RAMbio®, Applikon® Biotechnology, Foster City CA, USA) fue diseñado para mezclar cultivos microbianos en matraces agitados y asegurar una adecuada provisión de oxígeno. La evaluación del desempeño de este sistema para transferir oxígeno es necesaria junto al desarrollo de cultivos biológicos, donde el sistema de agitación orbital de matraces es la referencia adecuada.

2. ANTECEDENTES

2.1. Suministro de oxígeno en matraces agitados

Durante el metabolismo aerobio, el oxígeno es un nutriente esencial que tiene como función principal actuar como el aceptor final de electrones de la cadena respiratoria, mediante la cual se genera la energía requerida para el crecimiento y mantenimiento celular, así como su participación en otras rutas metabólicas que incluyen la síntesis de algunos productos. Debido a la baja solubilidad del oxígeno (alrededor de 8 mg/L en agua a 1 atm de presión), debe ser suministrado continuamente de la fase gaseosa a la fase líquida, donde es consumido por los microorganismos y transportado a los centros de reacción dentro de la célula (García-Ochoa y Gómez, 2009; García-Ochoa *et al.*, 2010). Diferencias en la disponibilidad de oxígeno durante el cultivo pueden generar efectos drásticos como disminución del metabolismo, desarrollo parcial o total de metabolismo anaerobio o baja producción de metabolitos de interés (Büchs, 2001).

En la Figura 2.1 se representan las resistencias que debe atravesar el oxígeno molecular, durante la transferencia de la fase gaseosa a la fase líquida, hasta llegar al interior de las células. Cuando la agitación es adecuada, el seno de las fases gaseosa y líquida puede considerarse homogéneo (sin gradientes de concentraciones). De acuerdo a la teoría de la capa límite se propone que a cada lado de la interfase gas-líquido se establece la formación de una delgada capa de fluido. Así, la transferencia entre cada película, en la que el fluido se encuentra estático, se da por difusión molecular de acuerdo a la ley de Fick (Dunn *et al.*, 2003). En el caso de agregados celulares habría que considerar la resistencia a la transferencia desde el exterior del agregado hacia las células individuales, que en algunos cultivos puede llegar a ser el paso limitante, por ejemplo, en cultivos sumergidos de la bacteria filamentosa *Streptomyces lividans* (Gamboa-Suasnavart *et al.*, 2013; Marín-Palacio *et al.*, 2014).

Las resistencias a la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la fase líquida están representadas en la Figura 2.1, y se pueden enlistar como sigue: (i) Transferencia desde la burbuja hacia la película de gas; (ii) movimiento a través de la interfase; (iii) difusión a través de la capa de líquido estática que rodea la burbuja; (iv) transporte a través del seno de líquido; (v) difusión a través de la capa de líquido estática que rodea las células; (vi)

movimiento a través de la interfase líquido-célula; y (vii) transporte en el citoplasma hacia los sitios bioquímicos de reacción (Garcia-Ochoa y Gomez, 2009). De acuerdo a la Figura 2.1 la resistencia global a la transferencia de oxígeno se da prácticamente por completo entre la capa límite del lado del líquido ($1/k_L$). Así, la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR, por sus siglas en inglés) a través de la interfase gas-líquido, se expresa en términos del coeficiente global de transferencia de masa ($k_L a$) y el gradiente de concentraciones de oxígeno entre la concentración en el seno del líquido (C_L) y la de saturación (C^*) (Ecuación 2.1), donde la concentración de saturación C^* está dada por el producto de la constante de Henry y la presión parcial de oxígeno en el espacio de cabeza del matraz (Henzler y Schedel, 1991; Garcia-Ochoa *et al.*, 2010).

$$OTR = k_L a (C^* - C_L) \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

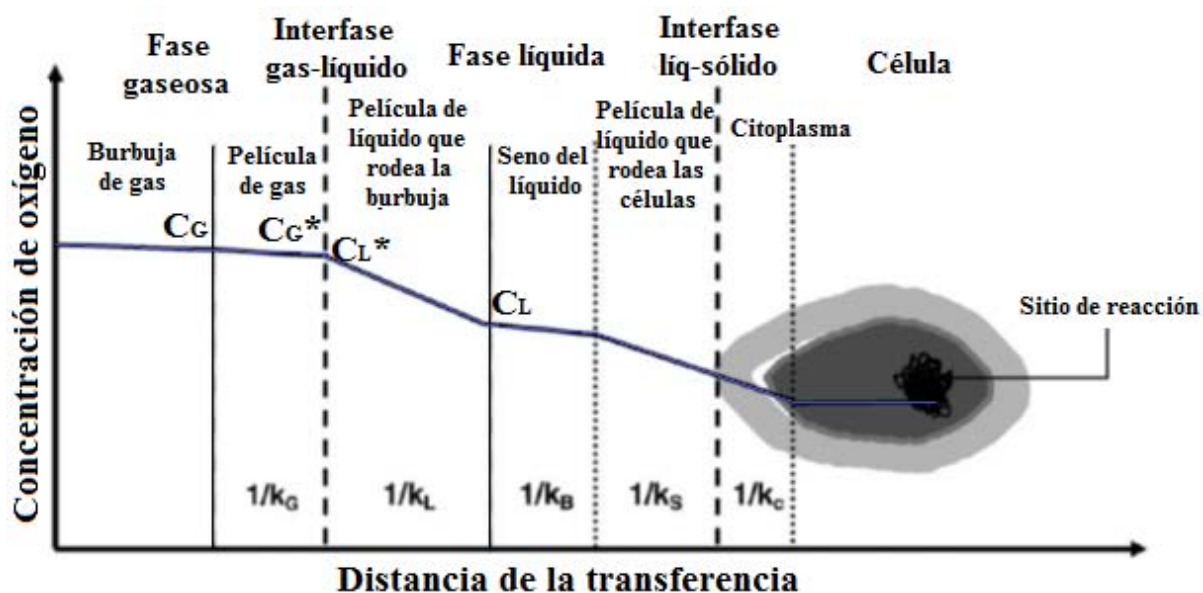


Figura 2.1. Representación de los pasos y las resistencias involucradas en la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la fase líquida y aproximación del gradiente de concentraciones de oxígeno durante el proceso de transporte. Ver descripción en el texto.(Garcia-Ochoa y Gomez, 2009).

El proceso de aireación debe satisfacer el requerimiento de oxígeno del cultivo en estudio. De no ser así, los experimentos se desarrollan en condiciones limitadas de oxígeno bajo las cuales podría no reconocerse el verdadero efecto de las variables de interés. Como ejemplo de lo anterior, Zimmermann y colaboradores (2006) estudiaron el comportamiento de la OTR en cultivos de una mutante de *Corynebacterium glutamicum* productora de lisina

(DSM 12866), comparado al de la cepa parental (ATCC 13032). Los resultados mostraron una reducción en el consumo de oxígeno, y de la velocidad de consumo del mismo, durante el cultivo de la cepa mutante, lo cual se explica si la cepa produce lisina en vez de biomasa, pero no concuerda con el aumento en la duración del tiempo de cultivo relacionado a una menor velocidad de consumo de glucosa. Los autores concluyeron que los experimentos de selección clonal se llevaron a cabo en matraces operando bajo condiciones limitadas de oxígeno, donde una menor producción de ácidos orgánicos, considerados subproductos, favoreció la selección de la cepa DSM 12866. Sin embargo, mutaciones que reducen la velocidad de la conversión de glucosa a piruvato disminuyen la producción de ácidos orgánicos (lactato, acetato y succinato) en condiciones limitadas de oxígeno y al mismo tiempo reducen la velocidad de producción de lisina, aún si el oxígeno no es limitante. El diseño de un proceso aerobio económicamente viable es complicado con una cepa de dichas características, que debieron ser reconocidas durante el proceso de selección clonal, lo que requiere tomar en cuenta la participación del oxígeno durante la realización e interpretación de dichos experimentos (Zimmermann *et al.*, 2006).

Durante los cultivos aerobios, las condiciones de operación deben de asegurar en todo momento que el oxígeno disponible para las células sea mayor en cantidad a la demanda del mismo (McDaniel *et al.*, 1965; Maier y Büchs, 2001; Zimmermann *et al.*, 2006; Suresh *et al.*, 2009b). La concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo está determinada por el balance entre el suministro de oxígeno (OTR) y el consumo del mismo (OUR) (Ecuación 2.2).

$$\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

Donde dC_L/dt es la velocidad de acumulación de oxígeno disuelto en la fase líquida; OTR representa la velocidad de transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la fase líquida de acuerdo a la Ecuación 2.1; y la OUR es la velocidad de consumo de oxígeno. Esta última está dada por el producto de la velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}) que es característica de cada microorganismo y varía de acuerdo a la composición del medio y el estado metabólico, entre otras cosas y la concentración de biomasa (x) (Finn, 1954; van Suijdam *et al.*, 1978; Garcia-Ochoa y Gomez, 2009; Garcia-Ochoa *et al.*, 2010).

La OTR definida por la Ecuación 2.1, alcanza su valor máximo cuando la concentración de oxígeno disuelto C_L es igual a cero. En este punto, la velocidad de transferencia de oxígeno se conoce como OTR_{max} (Ecuación 2.3). Cuando un cultivo crece en condiciones limitadas de oxígeno, conforme la respiración de los microorganismos se incrementa, la concentración de oxígeno disuelto se aproxima a cero y el sistema tiende a operar a la OTR_{max} (Maier y Büchs, 2001; Giese *et al.*, 2014).

$$OTR_{max} = k_L a \cdot C^* \quad \text{Ecuación 2.3}$$

La OTR se usa ampliamente para estudiar el comportamiento del crecimiento microbiano y de cultivos de células animales y vegetales y su magnitud está determinada por el $k_L a$ (Ecuación 2.1, 2.3) (McDaniel *et al.*, 1965; Suresh *et al.*, 2009b), dicho coeficiente está definido por el coeficiente global de transferencia de masa k_L (el inverso de la resistencia en la película que se forma en la interfase del lado del líquido (Figura 2.1) y el área interfacial específica a . El valor de k_L depende del coeficiente difusivo, que a su vez depende de la concentración de electrolitos y de la viscosidad de la fase líquida. El área de transferencia de los matraces convencionales con agitación orbital, a diferencia de los reactores de tanque agitado, no se ve afectada por fenómenos de coalescencia. Incluso, la formación de la película de líquido en las paredes promueve la transferencia de oxígeno en cultivos con viscosidad moderada o alta (Henzler y Schedel, 1991; Büchs, 2001; Klöckner y Büchs, 2011; Giese *et al.*, 2014). Por otro lado, la concentración de oxígeno (C_L) que depende de la solubilidad del gas, se ve también afectada por la concentración de electrolitos. Esto significa que tanto la OTR como el $k_L a$ son específicos de acuerdo a las características biológicas y químicas del sistema, que son afectados en función de las condiciones operacionales (Henzler y Schedel, 1991; Suresh *et al.*, 2009b). En el caso de los matraces con agitación orbital, los parámetros a tener en cuenta incluyen la velocidad de agitación (n), el volumen de llenado del matraz (V_L), el diámetro de agitación (d_o) y el diámetro interno máximo del matraz (d) (van Suijdam *et al.*, 1978; Henzler y Schedel, 1991; Veglio *et al.*, 1998; Maier y Büchs, 2001; Maier *et al.*, 2004; Klöckner y Büchs, 2012).

2.1.1. Correlaciones para el cálculo de $k_L a$ en matraces agitados orbitalmente

Se han propuesto diferentes correlaciones para estimar valores del $k_L a$ en matraces agitados orbitalmente. La Ecuación 2.4 representa el modelo que propusieron van Suijdam y

colaboradores (1978) para estimar un valor aproximado de k_La basado únicamente en la difusividad de oxígeno (d_f) y la velocidad de agitación (n), ellos trabajaron un intervalo estrecho de condiciones de operación ($V_N=500$ mL; $V_F=20\%$; $d_0=32$ mm; $n=90-260$ rpm). Las determinaciones de k_La se hicieron con el método dinámico, usando un electrodo para medir oxígeno disuelto para lo cual usaron matraces con una apertura lateral.

$$k_La = n^{1.1} (d_f/\pi)^{0.5} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

Henzler y Schedel (1991) propusieron una correlación empírica basada en el análisis dimensional (Ecuación 2.5). Las mediciones experimentales del k_La se realizaron con el método de oxidación del sulfito para los sistemas de agua y soluciones de glucosa. El modelo también se propuso para obtener valores aproximados de k_La en cultivos de *Escherichia coli* y *Streptomyces tendae*, donde varían algunos de los coeficientes de la Ecuación 2.5. En el caso de los cultivos, las determinaciones de k_La se realizaron midiendo las presiones parciales del gas por análisis de espectroscopia de masa de pequeñas muestras colectadas con jeringas a diferentes tiempos. Durante sus experimentos se variaron una serie de condiciones ($d=130$ mm, $V=50-200$ mL; $d_0=25-50$ mm; $n=100-400$ rpm) que compararon con datos previamente reportados (McDaniel *et al.*, 1965; Freedman, 1970).

$$k_La = 0.5d^{2.03} n d_0^{0.25} V_f^{-0.89} d_f^{0.5} v^{-0.24} g^{-0.13} \quad \text{Ecuación 2.5}$$

Maier y Büchs (2001) desarrollaron un modelo mecanístico de la capacidad para transferir oxígeno en matraces agitados orbitalmente considerando que la transferencia se da directamente de la fase gaseosa al seno del líquido. Además, con el movimiento rotacional se deposita una película de líquido en la pared del vidrio (hidrofilico) y en el fondo del matraz. Esta película también absorbe oxígeno y tiene una contribución considerable en la transferencia de masa total. Esto se comprobó en los experimentos con matraces de material hidrofóbico, donde no prevalece ninguna película líquida, y por lo tanto su capacidad de transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la fase líquida es reducida. El modelo concuerda bien con los resultados experimentales que se obtuvieron con el dispositivo RAMOS, que determina la OTR midiendo los cambios en la presión parcial de oxígeno presente en el espacio de cabeza del matraz (Sección 2.1.4). Las determinaciones se realizaron en un sistema con una concentración de sulfito 1M, variando diferentes

condiciones operacionales ($V_N=50-1000$ mL; $V_F=4-16\%$; $d_0=12.5-100$ mm; $n=50-500$ rpm). Klöckner y Büchs (2012) reportaron una correlación que representa dicho modelo (Ecuación 2.6).

$$k_L a_{Sulf} = 3.212 \cdot 10^{-4} d^{1.92} n d_0^{0.38} V_f^{-0.83} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

Con base en lo anterior, las estrategias operacionales que se utilizan para incrementar el $k_L a$ en matraces agitados, y por lo tanto la OTR_{max} , incluyen incrementar la velocidad de agitación, el diámetro de agitación, el diámetro del matraz, y reducir el volumen de llenado.

Se han implementado cambios en la geometría de los matraces como la introducción de baffles en paredes o en el fondo del recipiente, perlas de vidrio, resortes de acero inoxidable u otros accesorios, con la finalidad de incrementar el área de transferencia gas-líquido y han resultado útiles también para contrarrestar la formación de agregados en cultivos de microorganismos filamentosos. Algunas de las desventajas de estas geometrías respecto a los matraces convencionales incluyen una menor reproducibilidad. Por ejemplo, pequeñas diferencias en la profundidad y ubicación de los baffles pueden generar cambios importantes en cuanto a transferencia gas-líquido. Además, la formación de aerosoles y la expulsión de gotas del líquido pueden mojar el tapón, lo que disminuye la transferencia de gases e incrementa el riesgo de contaminación. Se ha observado también, que el uso de baffles favorece el desarrollo del régimen de fuera de fase (Sección 2.2) (McDaniel *et al.*, 1965; Freedman, 1970; Henzler y Schedel, 1991; Büchs, 2001; Suresh *et al.*, 2009b; Gamboa-Suasnavart *et al.*, 2011; Klöckner y Büchs, 2011).

Con base en lo anterior, se ha propuesto que la mayoría de los cultivos aerobios (principalmente aquellos que alcanzan medianas o altas densidades celulares) requieren que las agitadoras operen con altas velocidades de agitación (a veces mayores a 400 rpm, o mayores diámetros de agitación), para lo cual es necesario lograr un equilibrio adecuado combinado con una carga constante en la plataforma del equipo para asegurar su buen funcionamiento evitando vibraciones fuertes. Sin embargo, la mayoría de las agitadoras disponibles comercialmente no están diseñadas para operar por encima de los 300 rpm (con diámetros de agitación “estandar” de $\frac{3}{4}$ a 1 pulgada) (Klöckner y Büchs, 2011).

2.1.2. Resistencia de los tapones a la transferencia de oxígeno

Los cultivos de matraces agitados utilizan tapones con la finalidad de mantener la esterilidad dentro del sistema, siendo los tapones de algodón de los más recurridos porque son fáciles de fabricar. Sin embargo, la poca consistencia y similitud entre tapones de diferentes laboratorios repercuten de manera considerable en diferencias de transferencia de masa y obviamente irreproducibilidad de los cultivos (Humphrey, 1998). Es así que el tapón presenta una resistencia adicional a la transferencia de gases con los alrededores del sistema que también debe ser considerada. Como resultado de esta resistencia, la presión parcial de oxígeno en el espacio de cabeza del matraz es menor a la que tiene el aire (McDaniel *et al.*, 1965; van Suijdam *et al.*, 1978, Henzler y Schedel, 1991; Veglio *et al.*, 1998; Mrotzek *et al.*, 2001; Klöckner y Büchs; 2011). En general, la resistencia del tapón es menor comparada con la que se da en la interfase gas-líquido. Liu y colaboradores (2006) crecieron cultivos de la levadura *Phaffia rhodozyma* donde se midió la tensión de oxígeno en las fases líquida y gaseosa. Los autores registraron el agotamiento de este nutriente en el medio líquido (hasta 3.5% saturación con aire) luego de 30 h de inocular, y tal condición se mantuvo el resto del cultivo (70 h). Por otro lado, en la fase gaseosa la caída de oxígeno durante ese tiempo fue menos pronunciada (alrededor de 10% sat. aire) y permaneció elevada a lo largo del cultivo (>85% sat. aire). La marcada diferencia de los perfiles de oxígeno en las fases gaseosa y líquida, sugiere que el paso limitante de la transferencia se da en la interfase gas-líquido desde el espacio de cabeza del matraz. Sin embargo debe tenerse presente que la resistencia del tapón puede convertirse en limitante cuando se trabaja en condiciones elevadas de OUR que requieren en consecuencia altos valores de OTR, que se logran por ejemplo, cuando se trabaja con altas velocidades de agitación o con matraces bafleados (Veglio *et al.*, 1998; Mrotzek *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2006).

Existen diversos reportes con conclusiones variadas respecto a la participación del tapón (o modificaciones a los tapones de algodón) en la transferencia de oxígeno, a continuación se presentan dos ejemplos. Si bien, bajo condiciones normales de operación el tapón no presenta una resistencia limitante, es importante tener en cuenta el papel que juega el tapón de los matraces agitados durante los procesos de transporte.

En el trabajo de Orozco-Sánchez y colaboradores (2011) prueban que la resistencia a la transferencia en los tapones depende del material y el estado de estos. Ellos midieron en matraces agitados ($V_N=500$ mL; $V=100$ mL de medio de cultivo; $d_0=24$ mm; $n=120$ rpm) las velocidades de transferencia de oxígeno (OTR) obtenidas con tapones de diferente material: espuma de silicona (1.04 kg $O_2 \cdot m^{-3} \cdot día^{-1}$), algodón (0.58 kg $O_2 \cdot m^{-3} \cdot día^{-1}$) y papel aluminio (0.07 kg $O_2 \cdot m^{-3} \cdot día^{-1}$) durante el crecimiento de suspensiones celulares de *Azadirachta indica*. Únicamente el consumo de oxígeno de las células ($OUR=0.100$ kg $O_2 \cdot m^{-3} \cdot día^{-1}$) estuvo limitado cuando se usaban los tapones de aluminio.

Por otro lado, Mrotzek y colaboradores (2001) estudiaron la influencia de tapones estériles sobre la presión parcial de oxígeno al interior del matraz. Los autores estudiaron el desempeño del material de los tapones: algodón, papel envuelto, espuma de poliuretano, fibra de vidrio y tapones hechos de aluminio y silicona, en términos de la resistencia que oponían a la difusión de dióxido de carbono. Los resultados sugieren que la resistencia estudiada es función de la geometría del cuello del matraz (la resistencia es mayor en matraces con cuello estrecho). En menor proporción, el intercambio de gases cambia en función del material del tapón y su densidad: los tapones de papel envuelto (0.19 g/cm³) reducen la transferencia alrededor de un 37%; y con fibra de vidrio (0.19 g/cm³) alrededor de un 25%, mientras que los tapones de algodón ($0.06-0.25$ g/cm³) disminuyen el intercambio de gases entre 25 y 38%. La reducción es mucho mayor con los tapones de espuma de poliuretano, aproximándose al 80%.

2.1.3. El $k_L a$ como criterio para reproducir cultivos en diferentes escalas

Como se mencionó anteriormente, el $k_L a$ se ha utilizado de manera satisfactoria para caracterizar el desempeño de dispositivos de laboratorio o industriales y cuantificar su efecto sobre la transferencia de oxígeno (Finn, 1954; Humphrey, 1998). Cuando la estrategia de escalamiento busca mantener la eficiencia de aireación, el primer paso es determinar en pequeña escala dicha eficiencia bajo condiciones que se han establecido como óptimas para la producción, se establece un valor de $k_L a$ óptimo y se buscan las condiciones en la escala superior que logren alcanzarlo (Zimmermann *et al.*, 2006; Suresh *et al.*, 2009b); ejemplos de la aplicación de tal estrategia se presentan a continuación.

Gupta y Rao (2003) describieron un estudio de la transferencia de oxígeno en matraces agitados utilizando un sensor óptico para monitorear los perfiles de oxígeno disuelto. Los investigadores compararon cultivos de *E. coli* JM105 productora de GFP (proteína verde fluorescente), en matraz ($V_N=250$ mL; $V=50$ mL medio de cultivo; $n=250$ rpm; tapón de algodón) y en biorreactor ($V_N=1.5$ L; $V=1$ L; $n_i=300$ rpm; aireación de 1 vvm) que se agitaron para tener un k_{La} equivalente (≈ 26 h⁻¹). Dicho criterio de escalamiento fue exitoso en términos de las cinéticas de crecimiento (medida como densidad óptica a 600 nm), producción de proteína recombinante (medida como intensidad de fluorescencia) y los perfiles de oxígeno disuelto, que fueron reproducibles en ambas escalas. Seletzky y colaboradores (2007), desarrollaron un modelo que describe el crecimiento de *Corynebacterium glutamicum* con base en el modelo de Monod considerando la fuente de carbono (ácido láctico) como sustrato limitante, en conjunto con un modelo mecanístico de pH basado en las curvas de titulación de acuerdo a la composición del medio de cultivo. La simulación obtenida con ambos modelos se comparó con datos experimentales de crecimiento, consumo de oxígeno y ácido láctico así como el perfil de pH durante cultivos en matraces ($V_N=250$ mL; $V=10$ mL; $d_0=50$ mm; $n=300$ rpm) y en reactor de tanque agitado ($V_N=1.5$ L; $V=1$ L; $n_i=300-1200$ rpm; control de TOD $\leq 30\%$; aireación de 2 vvm) operando en lote. Los parámetros operacionales de los cultivos en matraces fueron seleccionados para asegurar una condición no limitante de oxígeno durante todo el cultivo (k_{La} de 252 h⁻¹), con base en modelos empíricos, que habían sido recientemente publicados (Maier y Büchs, 2001; Maier *et al.*, 2004) (Ecuación 2.6). La estrategia fue exitosa al comparar los perfiles de crecimiento, OTR, concentración de ácido láctico y pH que resultaron reproducibles en ambas escalas, al igual que las constantes cinéticas ($\mu_{max}=0.32$ h⁻¹; $Y_{O_2/S}=0.0174$ mol/L; $Y_{X/S}=0.36$ g/g). Realizaron también cultivos continuos en ambas escalas con la misma reproducibilidad, el rendimiento biomasa-sustrato de los cultivos en lote fue diferente ($Y_{X/S}=0.45$ g/g) (Seletzky *et al.*, 2007).

Recientemente se reportó el escalamiento de la producción de *Azospirillum brasilense* para su aplicación como biofertilizante desde cultivos en matraces ($V_N=500$ mL; $V=100$ mL de medio de cultivo; $n=220$ rpm) donde se optimizó el medio para favorecer el crecimiento; hasta biorreactor de tanque agitado de 10 L ($V_N=14$ L; $D_T=21$ cm; $V=10$ L de medio de cultivo; $n_i=205$ rpm; con una aireación de 0.5 vvm), y de 1000 L ($V_N=1400$ L; $D_T=94$ cm;

$V=1000$ L de medio de cultivo; $n_i=52$ rpm; con una aireación de 0.5 vvm). Las condiciones fueron fijadas para mantener un valor de k_{La} de 31 h^{-1} . Los valores de k_{La} en los reactores se determinaron experimentalmente con el método dinámico de degaseo desplazando el oxígeno con la reacción de reducción del sulfito. En los matraces se determinó el k_{La} a partir de las condiciones operacionales con una ecuación empírica previamente reportada (Klöckner y Büchs, 2012) (Ecuación 2.6). Los perfiles de crecimiento y viabilidad (UFC/mL) fueron reproducibles en las tres escalas, y los perfiles de TOD se reprodujeron durante los cultivos en biorreactor de 10 y 1000 L. Los autores asumen que el uso de un valor bajo de k_{La} como criterio de escalamiento del proceso es un parámetro adecuado para microorganismos con comportamiento similar al estudiado con sensibilidad a los elevados valores de TOD en el biorreactor (Trujillo-Roldán *et al.*, 2013).

Sistemas diferentes a los tradicionales como los biorreactores cilíndricos desechables con agitación orbital, han ganado popularidad para los cultivos de células de mamífero y vegetales. Estos sistemas proveen un patrón hidrodinámico bien definido, lo cual se asocia con un desempeño adecuado de la transferencia de masa así como del mezclado. Para determinar las condiciones adecuadas en cuanto al suministro de oxígeno, el sistema fue caracterizado en términos del k_{La} en biorreactores de 2 a 200 L y se propuso una correlación empírica en función de los parámetros operacionales como el diámetro del cilindro, el volumen de llenado, la velocidad de agitación, la viscosidad y difusividad de oxígeno en el medio de cultivo. Usando el k_{La} como criterio de comparación se cultivaron células en suspensión de *Nicotiana tabacum* BY-2 MTAD, previamente se había determinado que para evitar limitación debida al suministro de oxígeno se requería operar a una $OTR=8 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, para lograr dicha condición y de acuerdo las características del cultivo (medio suplementado con 30 g/L de sacarosa a 25°C ; $C^*=7.92 \text{ mg/L}$) se estableció un k_{La} mínimo de 32 h^{-1} . Con base en su correlación empírica propusieron las condiciones de operación para realizar los cultivos en un biorreactor cilíndrico ($V_N=20$ L; $V=10$ L; $d_0=70$ mm; $n=160$ rpm) y usando el modelo de Henzler y Schedel (1991) (Ecuación 2.5) propusieron las condiciones operacionales en matraces ($V_N=250$ mL; $V=50$ mL; $d_0=5$ cm. $n=180$ rpm), para igualar el k_{La} inicial a 32 h^{-1} . Los perfiles de OTR, crecimiento (medido como peso seco y peso húmedo), consumo de fuente de carbono (midiendo la osmolalidad del medio de cultivo) y pH fueron reproducibles en ambos sistemas durante las 168 h que

duró el cultivo y consistentes con el desarrollo del cultivo en condiciones de no limitación de oxígeno (la TOD se mantuvo siempre por encima del 20% sat. aire) (Klößner *et al.*, 2013).

Los estudios descritos demuestran que el uso del k_{La} como criterio para desarrollar y comparar cultivos en diferentes biorreactores y escalas donde la transferencia de masa es crítica para el desarrollo adecuado del cultivo.

2.1.4. Monitoreo de oxígeno en matraces agitados

El monitoreo de oxígeno a lo largo de un cultivo genera los perfiles de OTR/TOD que brindan información relevante acerca de lo que está ocurriendo en el sistema. En la Figura 2.2 se representa el desarrollo ideal (Figura 2.2A) de un cultivo de acuerdo a la OTR y la TOD en comparación a cuando existe un periodo de limitación por oxígeno (Figura 2.2B), cuando esto ocurre, la OTR es igual a la OTR_{max} , representada como un techo o límite superior; donde el consumo del microorganismo mantiene el oxígeno disuelto en cero lo que permite que la velocidad de transferencia de oxígeno sea la máxima que el sistema es capaz de suministrar. Cuando la respiración se detiene al final del cultivo, la OTR disminuye y la TOD se incrementa nuevamente (Maier y Büchs, 2001). Como se mencionó anteriormente (Sección 2.1) el estudio de la capacidad de transferencia de oxígeno de un sistema en cuanto a OTR/k_{La} , es necesario para el desarrollo óptimo de los cultivos aerobios.

Diferentes métodos para la determinación de la OTR_{max}/k_{La} se reportan en la literatura. Existen una variedad de métodos que permiten el estudio de transferencia de oxígeno en biorreactores, la oxidación de sulfito y el método dinámico de degaseo (gassing-out) son de los más utilizados (Suresh *et al.*, 2009a).

La oxidación del sulfito ha resultado un método útil para hacer investigaciones en cuanto a la transferencia de oxígeno en matraces (McDaniel *et al.*, 1965; Henzler y Schedel, 1991). Este método simula el consumo biológico de oxígeno con un sistema químico que reduce la concentración de oxígeno disuelto aproximadamente a cero. En presencia de un catalizador, se mide la cinética de reacción que indica cuanto oxígeno molecular se transfiere hacia la fase líquida. El método puede sobreestimar los valores de k_{La} debido a cambios en las

propiedades fisicoquímicas del sistema. Además está sujeto a muchas incertidumbres porque está en función de una serie de variables (concentración de sulfito, concentración de catalizador, pH, etc.) (Van't-Riet, 1979; Klöckner y Büchs, 2011).

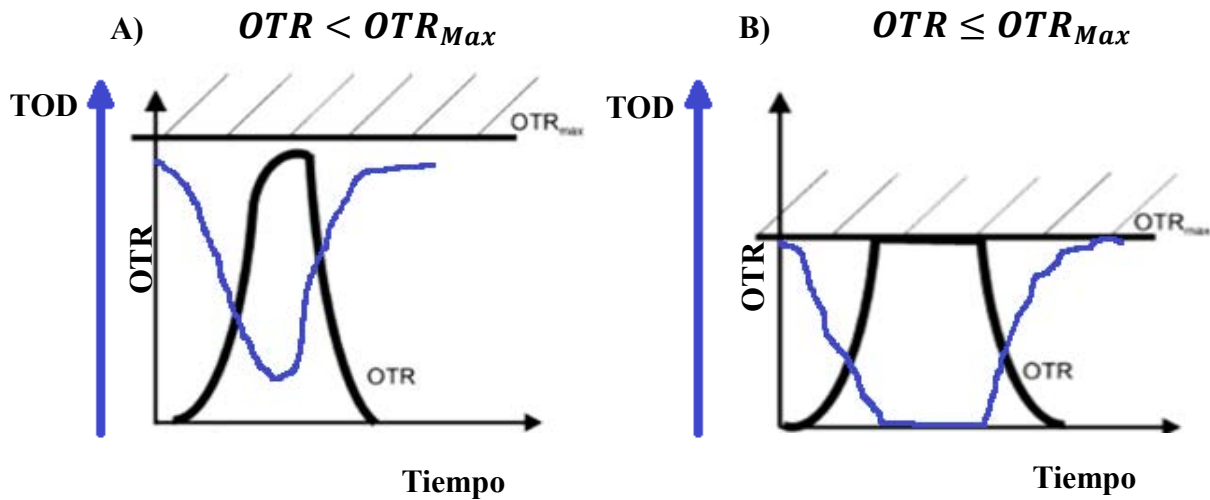


Figura 2.2. Representación del desarrollo de los perfiles de OTR (negro) y TOD (azul) en cultivos aerobios. **(A)** En este caso el oxígeno suministrado no es consumido en su totalidad, el sistema opera siempre por debajo de la OTR_{max} y la TOD permanece superior a cero. **(B)** La OTR se incrementa con la respiración de los microorganismos hasta alcanzar el límite que el sistema es capaz de proveer bajo condiciones específicas de operación. Adaptado de Maier y Büchs, 2001.

El método dinámico (gassing-out) registra los cambios de oxígeno disuelto (generalmente TOD) durante un periodo de tiempo con un sensor de oxígeno, luego de que el sistema ha sido desoxigenado. La desoxigenación se puede hacer por desplazamiento con nitrógeno, por reducción química con sulfito o mediante el consumo de los microorganismos al detener la aireación durante el cultivo. Para medir la TOD se requiere el uso de electrodos tipo Clark, que suelen usarse por ejemplo en reactores de tanque agitado. Si bien estos electrodos han sido útiles para el estudio de los sistemas de matraces agitados, tienen el inconveniente de resultar invasivos y actuar como baffles que cambian las condiciones hidrodinámicas del sistema (van Suijdam *et al.*, 1978; Veglio *et al.*, 1998; Suresh *et al.*, 2009a; Orozco-Sánchez *et al.*, 2011 Klöckner y Büchs; 2011). Un punto crítico de las mediciones, es el tiempo de respuesta del electrodo, que debe ser lo suficientemente rápido para registrar los cambios de oxígeno disuelto tan pronto como se produzcan (Van't-Riet, 1979; Suresh *et al.*, 2009a; Garcia-Ochoa y Gomez, 2009).

Existen una variedad de métodos para estudiar la transferencia de oxígeno en biorreactores, además de los mencionados. Por ejemplo, el analizador continuo de gas (EGA) mide en línea las concentraciones de oxígeno en los flujos de gas a la entrada y salida del sistema de aireación, la OTR se calcula a partir de la diferencia de concentraciones. También se pueden hacer análisis respirométricos que se basan en la determinación de la disminución del oxígeno disuelto después de que la aireación se ha detenido durante cultivos microbianos. Ejemplos de métodos bioquímicos incluyen la medición de la OTR con base en la reacción de bio-oxidación del catecol por catálisis enzimática con una dioxigenasa y el método de la glucosa oxidasa, en el cual la reacción de oxidación de la glucosa está acoplada con la reacción de formación de un compuesto colorido (Suresh *et al.*, 2009a).

Debido a limitaciones en cuanto a la tecnología disponible para monitorear sistemas a pequeña escala, el entendimiento de los parámetros físicos que caracterizan las condiciones de crecimiento de los cultivos en matraces ha sido más lento, en comparación al de biorreactores a mayor escala, como los reactores de tanque agitado (Buchs, 2001; Gupta y Rao, 2003). El estudio de los fenómenos de transferencia en matraces se ha desarrollado a la par de nuevas tecnologías que permiten hacer menos invasivas y más efectivas las mediciones de OTR/ k_{La} (Suresh *et al.*, 2009a; Klöckner y Büchs, 2012). Actualmente, se puede acceder a una variedad de tecnologías, ejemplo de estas son el dispositivo RAMOS que monitorea en línea la OTR de matraces agitados (Anderlei y Büchs, 2001; Anderlei *et al.*, 2004); o los sensores ópticos de oxígeno disuelto para mediciones *in-situ* de oxígeno disuelto (Tolosa *et al.*, 2002; Wittman *et al.*, 2003; Gupta y Rao, 2003).

El sistema de monitoreo de la actividad respiratoria: RAMOS, permite monitorear en línea la OTR, la velocidad de transferencia de dióxido de carbono, y el coeficiente respiratorio (RQ) en matraces agitados de forma no invasiva y sin la necesidad de tomar muestra (Anderlei y Büchs, 2001; Anderlei *et al.*, 2004). El dispositivo consta de matraces modificados, que tienen sensores en la parte superior para medir la presión parcial de oxígeno y la presión diferencial. Incluyen un puerto para inocular y dos puertos para la entrada y salida de gases equipados con válvulas que controlan el flujo de aire a través del matraz. Durante la fermentación, el ciclo de medición incluye una fase de ascenso, en la que se abren las válvulas, el flujo de aire se ajusta de forma que el espacio de cabeza sea igual al de un matraz convencional con un tapón de algodón. La otra fase corresponde a la

medición, en la que se cierran las válvulas y la respiración de los microorganismos conlleva una disminución en la presión parcial de oxígeno en el espacio de cabeza del matraz con el sistema cerrado, donde la pendiente de este consumo es igual a la OTR. Es importante establecer condiciones equivalentes entre el matraz de medición y el matraz normal en cuanto a la hidrodinámica y la concentración de gases en la cabeza del matraz (Anderlei y Büchs, 2001; Anderlei *et al.*, 2004; Kunze *et al.*, 2011; Klöckner y Büchs, 2011).

Desde el inicio de su desarrollo e implementación, el dispositivo RAMOS ha mostrado su potencial para evaluar el desarrollo de cultivos en matraces agitados. Los perfiles de OTR que se obtienen brindan información relevante pues reflejan el estado metabólico de los microorganismos. Por ejemplo, monitoreando un cultivo de la bacteria *Corynebacterium glutamicum* ($V_N=250$ mL; $V=10$ mL; $d_0=50$ mm; $n=200$ rpm), se observó un incremento exponencial de la OTR después de un breve periodo de fase lag (Anderlei *et al.*, 2004). Luego de 20 h, el nivel de la OTR se estacionó alrededor de $0.039 \text{ mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ indicando un periodo de limitación de oxígeno hasta la hora 30, donde también observaron la presencia de lactato en baja concentración (<2 g/L). La caída subsecuente de la OTR coincidió con el agotamiento de la glucosa como fuente de carbono y de lactato como fuente secundaria. Además, los autores evaluaron exitosamente los perfiles de OTR de otros modelos biológicos, incluyendo: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* y una línea celular de hibridoma productora de un anticuerpo IgG1 (Anderlei *et al.*, 2004).

La tecnología RAMOS ha sido implementada en una variedad de aplicaciones que pueden encontrarse en la literatura. Por ejemplo Kunze y colaboradores (2011), examinaron 16 clonas de *E. coli* que mostraron diferencias importantes en cuanto a su actividad respiratoria y la producción de la proteína de interés. Los autores propusieron una clasificación de las clonas en cuanto a los perfiles de OTR desarrollados que se asociaron a diferentes actividades metabólicas. El uso del dispositivo RAMOSha sido validado únicamente en sistemas con agitación orbital.

Los sensores ópticos son una alternativa atractiva para medir la concentración de oxígeno de forma no invasiva en biorreactores a pequeña escala. Esta tecnología permite realizar mediciones en línea de las concentraciones de oxígeno con robustez y precisión. Su funcionamiento se basa en el apagamiento diferencial del tiempo de vida de la

luminiscencia de un cromóforo, en respuesta a la presión parcial de oxígeno. Esta diferencia se mide como un cambio en la emisión luminosa del cromóforo debido al apagamiento dinámico cuando se excita con un haz de luz de intensidad modulada. Para la excitación se usan diodos emisores de luz y la emisión se analiza con un detector. El sensor es pequeño, no consume oxígeno, se puede esterilizar, es independiente de la hidrodinámica del sistema y se puede monitorear remotamente con fibra óptica (Bambot *et al.*, 1994; Tolosa *et al.*, 2002; Gupta y Rao, 2003; Wittmann *et al.*, 2003; Suresh *et al.*, 2009a).

Se han reportado previamente algunos ejemplos exitosos del uso de los sensores ópticos. Tolosa y colaboradores (2002), utilizaron un sensor óptico de oxígeno para monitorear la concentración de oxígeno disuelto en cultivos microbianos en matraces agitados. Creciendo *E. coli* evidenciaron la limitación por oxígeno (TOD=0% sat. aire) en diferentes condiciones de operación ($V_N=250$ mL; $V=50, 75$ mL medio LB; $n=75-350$ rpm). Por otro lado, en los cultivos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* pasaron de condiciones de limitación de oxígeno a condiciones de no-limitación al variar el volumen de llenado y la velocidad de agitación, de 75 mL/250 rpm a 50 mL/350 rpm.

El estudio de Wittmann y colaboradores (2003) reporta mediciones de k_{La} en matraces agitados por el método dinámico, desplazando el oxígeno con nitrógeno y registrando en línea el cambio de oxígeno disuelto con un sensor óptico. Ellos usaron un matraz con cuatro baffles ($V_N=250$ mL; $V=50-125$ mL agua, $n=100-300$ rpm), llegando a valores máximos de k_{La} iguales a 150 h^{-1} . Además, encontraron en cultivos de *C. glutamicum* que la velocidad de agitación de 150 rpm permitió satisfacer el requerimiento de oxígeno durante todo el cultivo, mientras que al disminuir la agitación hasta 100 rpm, el oxígeno disuelto se mantuvo igual a 0% sat. aire alrededor de 10 h.

Gupta y Rao (2003) observaron importantes diferencias en los perfiles de TOD durante cultivos de *E. coli* en matraces convencionales agitados que desarrollaron condiciones de limitación (TOD=0% sat. aire), en comparación a los matraces bafleados donde no se observó dicha limitación. Ellos reportan el uso del sensor óptico para medir TOD en matraces agitados con un $V_F=40\%$. Un volumen de llenado elevado fue necesario para asegurar que el sensor estuviera siempre cubierto por el líquido, cuando el parche tiene

contacto con la fase gaseosa se producen errores en la medición (Hansen *et al.*, 2011; Klöckner y Büchs; 2011).

La tecnología en la que se fundamenta el sistema de medición del sensor óptico es compatible para monitorear otras condiciones, como el pH o las concentraciones de dióxido de carbono. Como ejemplo se reportó el monitoreo en línea de cultivos de *E. coli* en matraces agitados ($V_N=2$ L; $n=150$ rpm) que se colocaron sobre tres bases, una correspondiente para cada sensor (oxígeno disuelto, pH y dióxido de carbono); dos sensores más se adaptaron en el espacio de cabeza del matraz para monitorear el oxígeno y el dióxido de carbono en la fase gaseosa. En este estudio se hace evidente la gran dependencia que tiene el suministro de oxígeno con la relación del área superficial y el volumen del líquido en condiciones que en general son difíciles de monitorear a pequeña escala. Un incremento en la relación del área superficial respecto al volumen del cultivo, variando el volumen de llenado de 500 mL a 50 mL de medio LB, permitió que las células crecieran más rápido. El pH aumentó durante el cultivo (de 7.0 a 7.3), la ligera basificación neutralizó parte del dióxido de carbono disuelto, que aumentó su concentración durante la fase de crecimiento. En la fase gaseosa se observó un incremento de oxígeno al inicio de los cultivos (de cerca de 18 a 21%) y después se mantuvo el resto del cultivo. El dióxido de carbono, cuya concentración inicial era cercana a 0%, incrementó su concentración en la fase gaseosa, siempre por debajo de un 3.5% (Ge y Rao, 2012).

Como se ha mencionado, la aplicación de la tecnología de medición basada en sensores ópticos es muy útil, sobre todo en los experimentos que se conducen en pequeña escala, incluyendo los que se realizan en microplacas. Sin embargo, una limitación importante se presenta cuando se estudian proteínas fluorescentes, como se demostró en cultivos de *E. coli* expresando diferentes proteínas como YFP, FbFP, MCherry y GFP que fluorescen en longitudes de onda cercanas al intervalo de longitudes en que operan los sensores ópticos de oxígeno disuelto y pH (alrededor de los 500 nm), como resultado la señal registrada por dichos sensores presentó alteraciones que fueron de moderadas a altas dependiendo de la proteína (Kunze *et al.*, 2014). Entender el fundamento de la tecnología permite proponer soluciones factibles que resultan en metodologías más sofisticadas para el monitoreo de oxígeno en sistemas de pequeña escala, en particular, Ladner y colaboradores (2015) evaluaron un nuevo sensor óptico con un compuesto fluorescente sensible a oxígeno que

pasa al estado de excitación con luz roja (>620 nm) (Kunze *et al.*, 2014). El fluoróforo está inmovilizado en nanopartículas con recubrimiento hidrofílico que permite su dispersión en sistemas acuosos. Se realizaron cultivos en microplacas de *Gluconobacter oxydans*, *Hansenula polymorpha* y *E. coli* expresando diferentes proteínas fluorescentes y 1 g/L de las nanopartículas. Bajo las placas transparentes se coloca un sistema óptico que emite y recibe las longitudes de onda correspondientes. Los perfiles de OTR a partir de mediciones de k_{LA} y las mediciones de oxígeno disuelto durante los cultivos, concordaron con la reproducción de los cultivos en matraces agitados con el sistema de monitoreo RAMOS. No se encontraron diferencias significativas de crecimiento ni expresión de la proteína recombinante en los cultivos con la nueva tecnología de medición (Ladner *et al.*, 2015).

El avance de las tecnologías para monitorear sistemas a pequeña escala continúa, hoy en día existen una variedad de posibilidades, el éxito de la tecnología empleada depende de la compatibilidad entre la aplicación deseada y las limitaciones inherentes al sistema de medición.

2.2. Potencia volumétrica de matraces agitados

En los matraces agitados los fenómenos de transferencia de masa y momento están interrelacionados y no es sencillo estudiarlos por separado, como se hace por ejemplo en biorreactores de tanque agitado (Marín-Palacio *et al.*, 2014). Estos últimos proveen más oportunidades para controlar la transferencia de oxígeno: permiten variar el flujo de aire a través del difusor y las velocidades de agitación del impulsor para mantener una alta concentración de oxígeno disuelto (Veglio *et al.*, 1998).

Durante el cultivo de microorganismos, el líquido realiza un movimiento de rotación en fase con el movimiento del equipo. Sin embargo, operar bajo ciertas condiciones, como con cultivos muy viscosos debido al crecimiento de microorganismos filamentosos o a la producción de biopolímeros, se puede desarrollar un régimen de “fuera de fase”. Este fenómeno se caracteriza por una cantidad de líquido que no sigue el movimiento rotacional de la agitación, lo que origina una disminución en el consumo de potencia, en el mezclado y en la transferencia de masa gas-líquido; en consecuencia el desarrollo del cultivo se ve deteriorado (Büchs *et al.*, 2001; Peter *et al.*, 2004; Klöckner y Büchs, 2011).

La potencia volumétrica específica (P/V) describe la potencia introducida al biorreactor que genera el flujo del líquido además del mezclado y es finalmente disipada en forma de calor como resultado de la fricción del fluido con las paredes y otras partes del reactor. La P/V que consumen los matraces agitados es del mismo orden de magnitud que la de reactores de tanque agitado operando en condiciones típicas con cultivos de bacteria y levadura (1-10 kW.m⁻³) (Klöckner y Büchs, 2011). En los reactores de tanque agitado la P/V introducida por la agitación, permanece constante mientras el régimen del flujo sea turbulento. En contraste, en los matraces agitados la potencia volumétrica se incrementa, siempre que el líquido realice la rotación en fase, junto con el aumento en la viscosidad (1-80 mPa.s) (Büchs *et al.*, 2000). El incremento en la potencia volumétrica está asociado a un impacto positivo en el valor de k_L (Maier y Büchs, 2001). La P/V de los matraces con agitación orbital es generada por la fricción entre el líquido en rotación y las paredes del matraz; incrementa con la velocidad de agitación y disminuye a mayores volúmenes de llenado. El diámetro de agitación no tiene un efecto significativo en la P/V mientras se asegure que el sistema esté operando en fase (Klöckner y Büchs, 2011).

La P/V es uno de los parámetros cruciales para el escalamiento de bioprocesos. Igualar la P/V lleva a generar condiciones de flujo similares en reactores con geometrías semejantes de diferentes capacidades. A diferencia de otros parámetros que describen las características del flujo, como las velocidades locales del fluido y el estrés hidrodinámico, la medición de la P/V es más sencilla (Klöckner y Büchs, 2011).

Se ha reportado el uso de los valores iniciales de P/V como criterio para transferir las condiciones de cultivos de *Azotobacter vinelandii* produciendo alginatos, de matraces agitados a biorreactor de tanque agitado (Reyes *et al.*, 2003). Como resultado, al cambiar de escala los polímeros producidos en el tanque agitado tuvieron un menor peso molecular promedio. Esto se explica por el fuerte incremento de la viscosidad en el medio durante el cultivo que acompaña la producción de los exopolisacáridos, lo que ocasiona un incremento en la potencia volumétrica de los matraces. En comparación, la P/V en los reactores de tanque agitado es independiente de la viscosidad, como se mencionó anteriormente. Esta información es muy importante, los cambios debido al desarrollo de la P/V afectan también la OTR que afecta a su vez las características moleculares del alginato producido. Peña y colaboradores (2008) realizaron las mediciones del progreso del perfil de P/V durante el

cultivo de *A. vinelandii* en matraces agitados y propusieron reproducir dicho perfil en un reactor de tanque agitado. Este método permitió la producción de alginato con un peso molecular promedio en el reactor similar al que se produjo en matraces.

Por otro lado, el nivel de estrés hidrodinámico, caracterizado en cuanto a la energía máxima de disipación local, es el parámetro que más difiere entre los matraces y los biorreactores de tanque agitado (Klöckner y Büchs, 2011). En los cultivos de células animales y vegetales, se requiere una agitación gentil para mantener las células en suspensión y proveerlas de un ambiente homogéneo. Lo anterior se puede lograr a pequeñas escalas, pero a mayores escalas se requiere una agitación vigorosa para incrementar la transferencia de masa tanto de los nutrientes como de los metabolitos tóxicos. Además, se requiere una aireación superior para incrementar la OTR. Sin embargo, las fuerzas hidrodinámicas asociadas a la agitación y la aireación, pueden causar daños a las células, en este caso el estrés hidrodinámico puede convertirse en un factor decisivo de crecimiento y formación de producto, un escalamiento exitoso requiere la caracterización del estrés hidrodinámico en matraces agitados. En general los cultivos de bacterias y levaduras están exentos de este tipo de estrés (Suresh *et al.*, 2009b; Klöckner y Büchs, 2011).

Al igual que el estudio de la transferencia de oxígeno, el estudio de la potencia volumétrica y la hidrodinámica de flujo que ocurre en los matraces agitados ha requerido el desarrollo de tecnologías adecuadas a tal fin (Büchs *et al.*, 2000). Un ejemplo reciente es el trabajo de Mancilla y colaboradores (2015) en el que estudiaron el comportamiento del flujo de matraces de diferentes geometrías (convencional, bafleados y con resorte) con agitación orbital (25-250 rpm) con la técnica de velocimetría por imágenes de partículas (PIV) con la que obtuvieron las distribuciones de los vectores de velocidad e intensidad de turbulencia. Para todos los casos, el movimiento caótico del fluido aumentó con la velocidad de agitación, aunque la intensidad de la turbulencia fue dependiente de la geometría del matraz; y la más alta se encontró en los matraces con un bafle. En todas las geometrías la mayor intensidad de turbulencia ocurrió a 150 rpm. En conclusión, los campos de flujo producidos por la introducción de los baffles o resorte, tienen una fuerte influencia sobre los patrones hidrodinámicos que se distribuyen por todo el matraz. La intensidad de la turbulencia se puede usar para determinar la calidad de la agitación en los cultivos sensibles a los parámetros relacionados con la hidrodinámica del sistema.

2.3. Sistema acústico de agitación de matraces

Actualmente, existen nuevas tecnologías de mezclado como alternativa para solucionar las limitaciones asociadas a la transferencia de oxígeno en matraces agitados orbitalmente. La tecnología de agitación por resonancia acústica (RAM: Resonant Acoustic® Mixing) genera un campo acústico de baja frecuencia para inducir el mezclado mediante resonancia mecánica (Applikon Biotechnology®, 2013; Osorio y Muzzio, 2015). Esta nueva tecnología tiene potencial para mezclar sistemas multifásicos. Recientemente, se evaluó su desempeño para homogenizar polvos usando un ingrediente farmacéutico activo (acetaminofén, 3% v/v) y un lubricante (estearato de magnesio, 1% v/v). El resultado fue un mezclado altamente eficiente en comparación a otros mezcladores, logrando la homogenización buscada, que se evaluó midiendo la composición de muestras tomadas en diferentes puntos del recipiente de mezclado; que además se obtuvieron en tiempos de mezclado muy cortos, de hasta 30 s (Osorio y Muzzio, 2015).

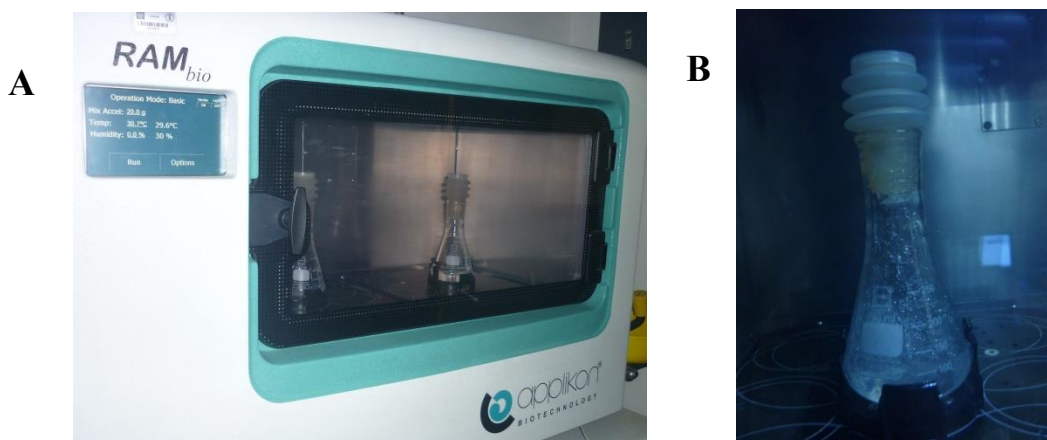


Figura 2.3. Sistema de agitación de matraces RAMbio. **(A)** Incubadora de matraces por resonancia acústica, incluye dos plataformas resonantes, sistema de control de humedad, temperatura y agitación. Se le ajustan las bases para operar matraces de 250, 500 y 1000 mL. **(B)** Matraz con agua ajustado con tapón Oxytaper® agitado en el sistema RAMbio.

La introducción de la tecnología RAM a las aplicaciones biotecnológicas comienza con el sistema RAMbio (RAMbio®, Applikon® Biotechnology, Foster City CA, USA), que fue diseñado para mezclar cultivos microbianos en matraces agitados y asegurar una adecuada provisión de oxígeno (Figura 2.3A). El sistema trabaja con los tapones Oxytaper® de silicona flexible que filtran activamente los gases a través de una membrana y mantienen el medio de cultivo dentro del matraz (Figura 2.3B). Los mecanismos de aireación y mezclado

son diferentes a los desarrollados con agitación orbital donde la aireación en matraces convencionales (sin baffles) se logra mediante difusión (Figura 2.4A) (Büchs, 2001; Maier y Büchs, 2001). La primera resistencia a la transferencia de oxígeno se da en el tapón, a través del cual los gases deben difundir (Henzler y Schedel, 1991; Mrotzek *et al.*, 2001). En el sistema RAMbio, dentro del matraz se producen patrones de flujo axial; la aireación se logra mediante difusión, el atrapamiento de gotas que se separan del seno del líquido y la formación de pequeñas burbujas (Howe *et al.*, 2011). El tapón tiene una participación activa en la transferencia de gases, el espacio de cabeza se recambia continuamente con el movimiento resonante que bombea moléculas de gas dentro y fuera del matraz (Figura 2.4B) (McAdams *et al.*, 2014).

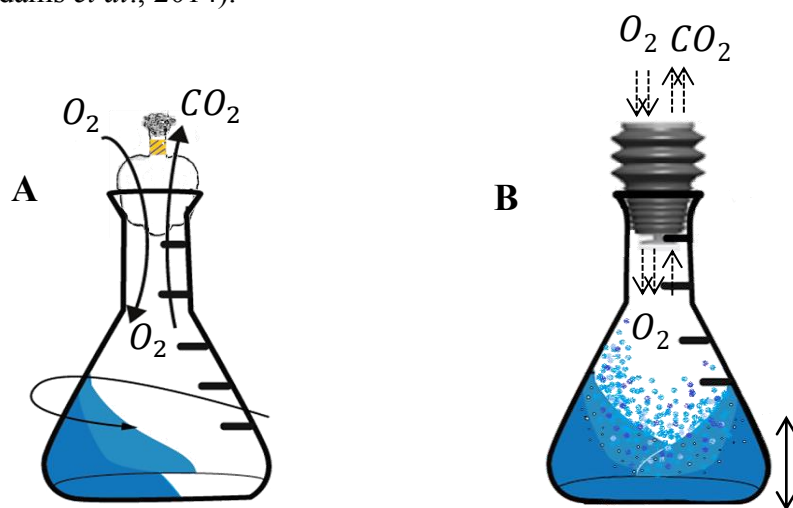


Figura 2.4. Aireación de matraces agitados por dos sistemas diferentes: **(A)** agitación orbital en dos dimensiones. **(B)** El sistema RAMbio produce oscilaciones en una dimensión mediante la inducción de energía acústica de baja frecuencia.

El conocimiento del desempeño del sistema RAMbio es escaso, la información disponible se encuentra en las notas de aplicación del equipo (Applikon Biotechnology®, 2013), donde se describe por ejemplo, la comparación de cultivos de *E. coli* K12 expresando GFP en matraces agitados ($V_F=20$, 40%) por una agitadora orbital ($d_0=19$ mm, $n=400$ rpm usando tapones Whatman Bugstopper®) y por el sistema RAMbio ($n_g=20$ g, tapones Oxypump®), para la producción en lote de biomasa y proteína recombinante a partir de un medio rico. Después de 8 h de cultivo, el uso del sistema RAMbio resultó en una mayor concentración de biomasa (medida como densidad óptica a 600 nm) y un aumento en la producción de GFP (monitoreada por citometría de flujo), al comparar los cultivos crecidos con agitación orbital. A la par del crecimiento, se midió el oxígeno disuelto con un sensor

óptico en línea, los perfiles encontrados mostraron mayores concentraciones de oxígeno disuelto en el sistema RAMbio, donde la mínima concentración de oxígeno alcanzó el 20% de saturación con aire, mientras que con agitación orbital el oxígeno disminuyó hasta 0% de saturación con aire y se mantuvo así durante todo el cultivo (25 h) (Applikon Biotechnology®, 2013). Las mejoras se atribuyen a una capacidad superior para transferir oxígeno, sin embargo, el reporte no establece una comparación de ambos sistemas con base en un criterio ingenieril.

Torres-Rivera (2014) cultivó en matraces agitados ($V_N=250$ mL, $V=50$ mL de medio LB) en los sistemas RAMbio (5, 10 y 15 g) y orbital (200 rpm), 4 cepas de *E. coli* BL21-Gold (DE3) produciendo diferentes proteínas recombinantes. En el caso de la cepa productora de esfingomielinasa D de garrapata (rSMD), luego de 10 h, los cultivos con agitación acústica alcanzaron concentraciones iguales de biomasa final (6.28 ± 0.91 u.a.) que superaron la que se alcanzó con agitación orbital (4.92 ± 0.23 u.a.). Por otro lado, se vieron diferencias significativas en las velocidades específicas de crecimiento; en 5 g se alcanzó la mayor velocidad (1.39 ± 0.13 h⁻¹), mientras que a 10, 15 g y 200 rpm no hubo diferencias en cuanto a este parámetro (1.17 ± 0.07 h⁻¹). La inducción de la producción de proteína recombinante se realizó durante la fase exponencial de crecimiento (5 h) con IPTG (0.5 mM). La concentración de proteína total fue evaluada al final del cultivo (24 h); la condición de agitación que rindió mayor proteína fue 5 g (10.7 mg/mL), seguida por 200 rpm (~8.5 mg/mL), las menores concentraciones se encontraron a 10 y 15 g (~6.5 mg/mL). Las diferencias observadas en los cultivos fueron atribuidas a la transferencia de oxígeno dentro del matraz. Aunque las velocidades de agitación están relacionadas con la transferencia de oxígeno en los matraces, el efecto no explica porque la mayor velocidad de crecimiento y concentración de proteína se encontraron en la condición de agitación de 5 g comparadas a mayores velocidades de agitación.

2.4. *Escherichia coli* como modelo biológico

Entre los microorganismos industrialmente importantes, las bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* se han utilizado ampliamente para diversos procesos biotecnológicos. *E. coli* fue el primer huésped para la expresión de proteínas heterólogas con aplicación biofarmacéutica, que resultó en la aprobación de la insulina humana en 1982 (Baeshen *et*

al., 2015). Esta bacteria se ha mantenido como modelo de estudio para la producción de proteínas recombinantes, presentando una serie de ventajas importantes: su genoma es conocido lo que amplía considerablemente las posibilidades de su manipulación genética, existe una gran cantidad de conocimiento acumulado sobre su fisiología y metabolismo, se tienen varios vectores bien establecidos para la producción de proteína recombinante, y puede crecer rápido en medios simples con altos niveles de expresión, hasta 30% de la proteína celular total. Actualmente, cerca del 30% de las proteínas recombinantes de uso terapéutico son producidas en *E. coli* (Demain y Vaishnav, 2009; Lara, 2011; Baeshen *et al.*, 2015).

E. coli es una bacteria anaerobia facultativa que puede crecer en una variedad de sustratos en presencia o ausencia de oxígeno. En general, se prefiere llevar los cultivos de *E. coli* bajo condiciones aerobias que permiten a la célula generar energía de forma eficiente y lograr mayores rendimientos de biomasa y producto. La demanda de oxígeno para la oxidación completa de la fuente de carbono a CO₂ es una función directa de la velocidad de crecimiento de la bacteria, entonces la biomasa alcanzable podría verse limitada por la OTR_{max} del biorreactor (Lara, 2011). La respiración activa de *E. coli* cuando se cultiva en matraces agitados requiere el uso de volúmenes de llenado bajo (por ejemplo ~4%) y velocidades de agitación relativamente altas (hasta 400 rpm) para poder asegurar un metabolismo completamente aerobio (Klöckner y Büchs, 2011).

Durante la respiración aerobia, la energía se obtiene mediante la oxidación del sustrato a través de los sistemas de óxido-reducción, donde el oxígeno participa como aceptor final de electrones. En ausencia de oxígeno, u otro aceptor final de electrones, la fermentación ácido mixta se usa para regenerar la reserva de NAD⁺. *E. coli* opera bajo una jerarquía metabólica en la que la respiración aerobia se prefiere sobre la anaerobia, y la fermentación. Sin embargo, cuando *E. coli* crece en un medio con altas concentraciones de la fuente de carbono, como glucosa, aun en presencia de oxígeno suficiente, la bacteria convierte parte del azúcar en acetato. Tal fenómeno se conoce como sobreflujo metabólico, y se explica como una sobrecarga de la maquinaria enzimática, donde la producción de acetato se da principalmente por la vía de la fosfotransacetilasa/acetato cinasa que no contribuye a la regeneración de NAD⁺. Sin embargo, esto le permite a la célula continuar la producción de ATP y favorecer un crecimiento rápido. En la Figura 2.5 se resumen las principales rutas

metabólicas implicadas en el consumo de glucosa y síntesis de acetato. El gen que codifica para la enzima piruvato oxidasa no se transcribe en condiciones de aerobiosis pero comienza a transcribirse cuando las concentraciones de oxígeno disuelto en el medio son bajas (Phue y Shiloach, 2005). Durante el sobreflujo metabólico la excreción de acetato es consecuencia de que la velocidad de acumulación de acetil-coA excede la velocidad para alimentarlo al ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA). Esto ya sea porque algunas enzimas del ciclo no están disponibles en cantidad suficiente, o porque la cadena respiratoria no puede operar a la velocidad adecuada para oxidar el NADH adicional producido por el TCA (Figura 2.5). Entonces, *E. coli* alcanza una velocidad máxima de consumo de oxígeno que es independiente de su disponibilidad. Esta tendencia se refleja en el rendimiento de biomasa, que incrementa gradualmente con la aerobiosis. Por ejemplo, se ha visto que a bajas concentraciones de oxígeno en quimiostato limitado por glucosa, se desarrolla sobreflujo metabólico, que conlleva a la producción de acetato en condiciones aerobias como único subproducto extracelular (Andersen y von Meyenburg, 1980; Eiteman y Altman, 2006; Lara, 2011; Bettenbrock *et al.*, 2014). La producción de acetato es indeseable ya que representa un derroche de esqueletos carbonados, afecta el pH y el gradiente de protones transmembranal. También, se ha asociado a otros efectos como la drástica disminución en el contenido de plásmido de células de *E. coli* (Lara, 2011). La productividad de *E. coli* como organismo modelo en la producción de proteínas recombinantes depende de su desarrollo metabólico, donde la producción de acetato tiene un papel determinante.

La cepa comercial *E. coli* BL21 (DE3) ha probado alcanzar altas densidades celulares (78 u.a. 600 nm) en cultivos en lote con una mínima acumulación de acetato (2 g/L). En comparación, bajo las mismas condiciones la cepa JM109 excreta más acetato (14 g/L) a una menor concentración celular (63 u.a. 600 nm). Incluso en cultivos de lote alimentado (glucosa=0.5-1.0 g/L), la cepa BL21 (DE3) acumuló 4 veces menos acetato (van de Walle y Shiloach, 1998). La habilidad de las cepas B de *E. coli* para crecer en altas concentraciones de glucosa, con altos rendimientos sin producir acetato se atribuye a su actividad constitutiva en la ruta del glioxilato, la gluconeogénesis y a una alta tasa de recambio de los intermediarios en el TCA (van de Walle y Shiloach, 1998; Phue y Shiloach, 2005).

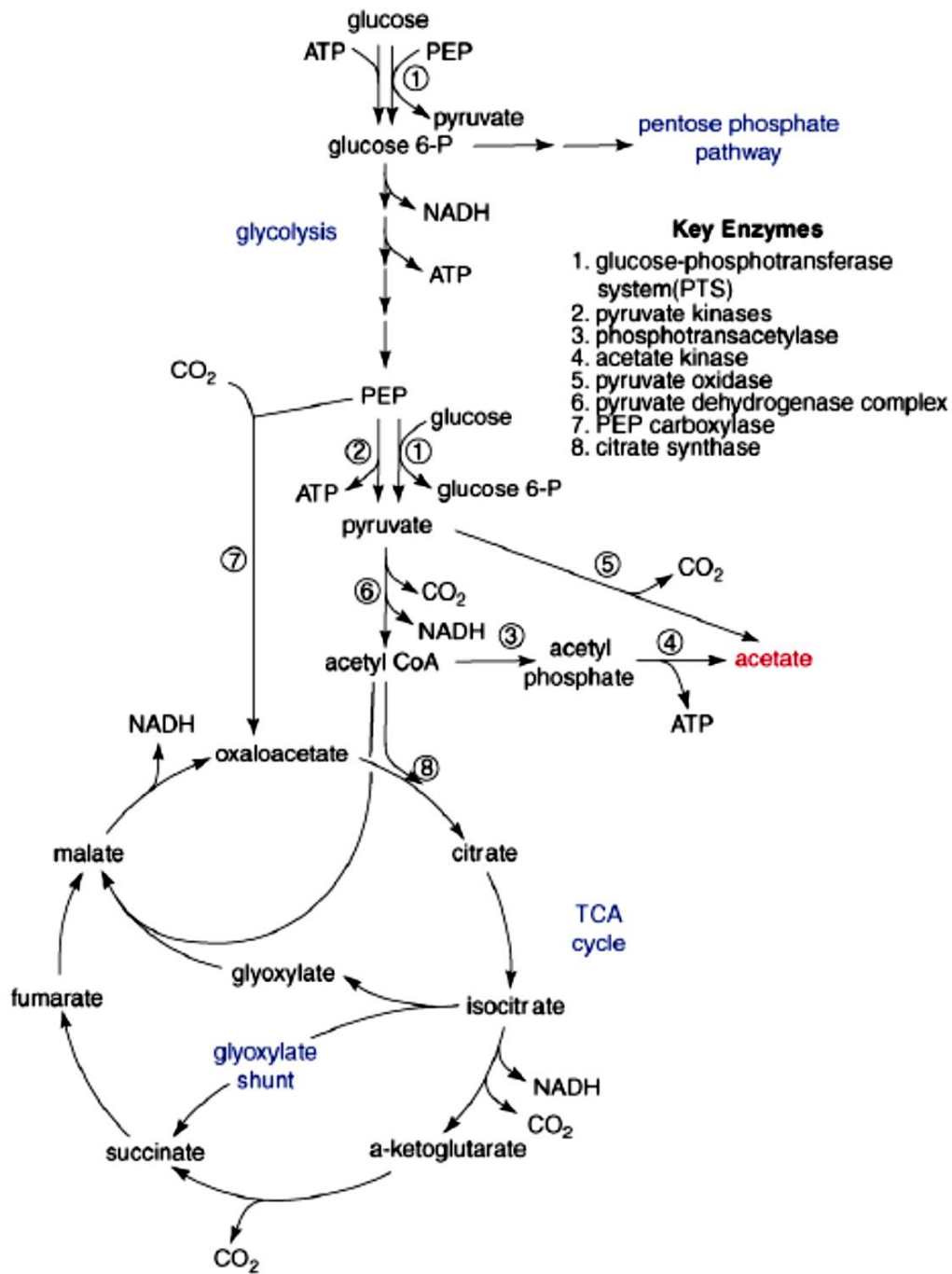


Figura 2.5. Rutas metabólicas principales involucradas en el consumo aerobio de glucosa por *E. coli*, y la síntesis de acetato, dióxido de carbono y biomasa. El consumo de glucosa se realiza principalmente mediante la vía del sistema fosfotransferasa (PTS), que genera de forma simultánea piruvato a partir de fosfoenolpiruvato (PEP). El acetato se forma a partir de piruvato por acción de la piruvato oxidasa y de las enzimas fosfotransacetilasa/acetato cinasa. La PEP carboxilasa es la vía anaplerótica necesaria para el reabastecimiento de los intermediarios del ciclo del TCA consumidos para la formación de biomasa. Tomado de Eiteman y Altman, 2006.

Algunas cepas de *E. coli* B con modificaciones específicas adicionales son útiles para lograr altas productividades de proteína recombinante. En el trabajo reportado por Castellanos-Mendoza y colaboradores (2014) usan una cepa B transformada con el plásmido comercial pQE-30 (Qiagen, USA) que expresa esfingomielinasa D (SMD de la saliva de la garrapata *Boophilus microplus*, GeneBank KJ854238). Los autores buscaban entender el papel de las condiciones de cultivo en la formación de los agregados de la proteína sobreexpresada, específicamente los cambios en las propiedades fisicoquímicas de los cuerpos de inclusión debidos a las variaciones de pH. Las perspectivas del trabajo incluyen la propuesta de estrategias de cultivo para lograr la producción reproducible de biomateriales con características específicas, donde además del pH, el papel de otros parámetros de cultivo en la formación de los cuerpos de inclusión y el metabolismo de la célula debiera incluir la composición del medio de cultivo y el perfil de la OTR. En el presente trabajo se utilizó esta misma cepa como modelo biológico de estudio.

La respuesta de *E. coli* ante las variaciones de oxígeno disponible es bastante compleja, y cambia gradualmente desde una condición anaerobia hasta la completa aerobiosis. Un análisis de los factores de transcripción ha mostrado que al menos participan 16 factores de transcripción en respuesta a oxígeno con actividades diferenciales en los estados aerobios o anaerobios. La red contiene los factores de transcripción que responden no solo a la disponibilidad de oxígeno, si no también algunos que participan en la regulación del metabolismo central, homeostasis de iones metálicos, respuesta a estrés oxidante, y biosíntesis de nucleótidos y aminoácidos (Bettenbrock *et al.*, 2014).

E. coli ha sido adaptada en el laboratorio para prosperar en líquidos donde los niveles de oxígeno alcanzan alrededor de 210 μM (6.72 mg/L) a 37°C. Sin embargo, la hiperoxia en cultivos de *E. coli* puede derivar en efectos negativos sobre su crecimiento (Imlay, 2009). En 1957 se reportaron unos experimentos que mostraban efectos mutagénicos de oxígeno a elevadas presiones en cepas de *E. coli* B dependientes e independientes de estreptomycin similares a efectos causados por radiación. Los cultivos se realizaron en matraces que se agitaban en cámaras con diferentes presiones de oxígeno (6-10 atm) durante 16 h, y encontraron un incremento en el número de mutaciones espontáneas que fue de 1.5 a 2.4 veces mayor al que se encontró en los controles (aire 1-10 atm, nitrógeno 10 atm). De acuerdo a los autores, las mutaciones pudieron resultar de daño en el cromosoma bacteriano

por una elevada concentración de radicales libres (Fenn *et al.*, 1957). La posibilidad de que los niveles normales de oxígeno también podrían dañar las bacterias se ha continuado estudiando, si bien se producen a velocidades reducidas aunque tóxicas no resultan letales (Imlay, 2009).

El oxígeno molecular genera especies reactivas de oxígeno (ROS) durante su reducción biológica hacia agua mediante la respiración; tales como el anión superóxido (O^{2-}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (HO^*). Los niveles elevados de ROS generan condiciones de estrés en *E. coli* que pueden llegar a causar daño irreversible en componentes celulares (Baez y Shiloach, 2013). Las especies ROS se forman continuamente a velocidades estables dentro de las células en condiciones aerobias a través de la autooxidación de las enzimas redox, su acumulación es contenida por la superóxido dismutasa (SOD) que degrada O^{2-} junto con las peroxidasas y catalasas que degradan H_2O_2 . Algunos de los efectos de estos oxidantes son la destrucción de los clusters hierro-azufre que forman algunas enzimas, y la oxidación del ADN. Se ha visto que el estrés oxidante puede inhibir el crecimiento pero difícilmente mata a las células (Imlay, 2015).

El efecto de elevadas concentraciones de oxígeno sobre el crecimiento y la actividad enzimática de *E. coli* se estudió en una cepa mutante deficiente de SOD y la cepa parental. Los cultivos se sometieron a concentraciones de oxígeno disuelto (dO_2) de 30 a 300% sat. aire. Los autores no encontraron diferencias en los parámetros de crecimiento en la cepa silvestre, y esto fue explicado con la actividad de la SOD, al crecer una mutante carente de dicha enzima se abatió definitivamente su velocidad de crecimiento cuando se sometió a 300% sat. aire (Baez y Shiloach, 2013).

En el presente trabajo se presenta el análisis del desempeño de cultivos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD en dos sistemas con mecanismos de agitación diferente: RAMbio y orbital, para los que establecimos valores equivalentes de k_{La} inicial como criterio comparativo de los diferentes sistemas de agitación.

3. HIPÓTESIS

Igualando el k_{La} inicial en matraces con agitación acústica y orbital, se obtienen perfiles reproducibles de crecimiento, consumo de glucosa, perfil de oxígeno disuelto y producción de acetato de cultivos no inducidos de *Escherichia coli* BL21-Gold (DE3) rSMD-garrapata.

4. OBJETIVO

Comparar el desarrollo de cultivos no inducidos de *Escherichia coli* BL21-Gold (DE3) rSMD-garrapata en matraces agitados por resonancia acústica y orbital usando como criterio el mismo k_{La} inicial.

4.1. Objetivos específicos

1. Determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}) en matraces con agua en dos diferentes sistemas de agitación (resonancia acústica y orbital); variando la velocidad de agitación (3-20 g y 100-350 rpm, respectivamente), el volumen nominal del matraz (0.25, 0.5 y 1 L), y el volumen de llenado (10, 15, 20, 25 y 40%) a 30 y a 37°C.
2. Identificar los parámetros operacionales que determinan el k_{La} en matraces agitados por resonancia acústica y proponer una correlación empírica para determinar este coeficiente en función de los parámetros operacionales evaluados para cada tipo de agitación (resonancia acústica y orbital).
3. Comparar los perfiles y constantes cinéticas de crecimiento, consumo de fuente carbono, producción de ácidos orgánicos, además de los perfiles de oxígeno disuelto de cultivos no inducidos de *Escherichia coli* BL21-Gold (DE3) rSMD-garrapata, crecida en matraces agitados por los sistemas de resonancia acústica y orbital, a dos valores equivalentes de k_{La} inicial.
4. Evaluar el efecto del intercambio activo de gases que realiza el tapón Oxyump, sobre cultivos no inducidos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD-garrapata, crecida en matraces agitados con resonancia acústica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos de este trabajo se realizaron en matraces Erlenmeyer convencionales con volúmenes nominales de 250, 500 y 1000 mL (sin baffles, vidrio de borosilicato, Duran®, USA), agitados por el sistema de resonancia acústica (RAMbio) en comparación con la agitación orbital tradicional.

5.1. Agitación por resonancia acústica (RAM)

El sistema de agitación de matraces con resonancia acústica (RAMbio de Applikon® Biotechnology, Foster City CA, USA) genera un campo acústico con energía de baja frecuencia (58-66 Hz) y alta intensidad que induce oscilación mecánica en resonancia. La velocidad de agitación se ajusta a diferentes aceleraciones que van de 3 a 20 g (29.4-196 $\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$). La frecuencia de resonancia permite transferir eficientemente la energía potencial que se almacena en resortes, hacia las dos plataformas balanceadas sobre las que se colocan las abrazaderas que sujetan a los matraces. La onda acústica genera zonas de micro-mezclado ($\sim 50 \mu\text{m}$) en todo el matraz, al tiempo que facilita el movimiento del seno del líquido (Howe, *et al.*, 2011). El RAMbio trabaja en conjunto con los tapones Oxypump® que están conformados por 4 partes y que puede verse en la Figura 5.1:1. La anti-salpicadera evita que se moje el filtro de la tapa al mantener el líquido dentro del matraz mientras es agitado vigorosamente. 2. El adaptador mantiene al tapón sujeto al cuello del matraz. 3. El fuelle oscila con la resonancia y bombea gases dentro y fuera del matraz, promoviendo un continuo recambio activo de los gases contenidos en el espacio de cabeza. Por último, 4. la tapa superior tiene un filtro hidrofóbico ($0.2 \mu\text{m}$) permeable a gases que evita el paso de pequeñas partículas y/o microorganismos (McAdams *et al.*, 2014). En algunos experimentos se utilizaron tapones Oxypump modificados donde se evitó mecánicamente el movimiento del fuelle (figura 5.B).

5.2. Agitación orbital

Se trabajó en una agitadora orbital (New Brunswick Scientific C251, Eppendorf, Inc. CT, USA) con un diámetro fijo de agitación igual a 25 mm, variando las velocidades de agitación de 100 a 350 rpm. Se usaron tapones de algodón que se hicieron manualmente con algodón y gaza (Anexo 1.1). Estos tenían un peso total de 6.16 ± 0.16 g (para matraces

de 250 y 500 mL) y 8.21 ± 0.15 g (para matraces de 1000 mL). La respectiva densidad de los tapones fue de aproximadamente $0.1-0.2$ g/cm³.

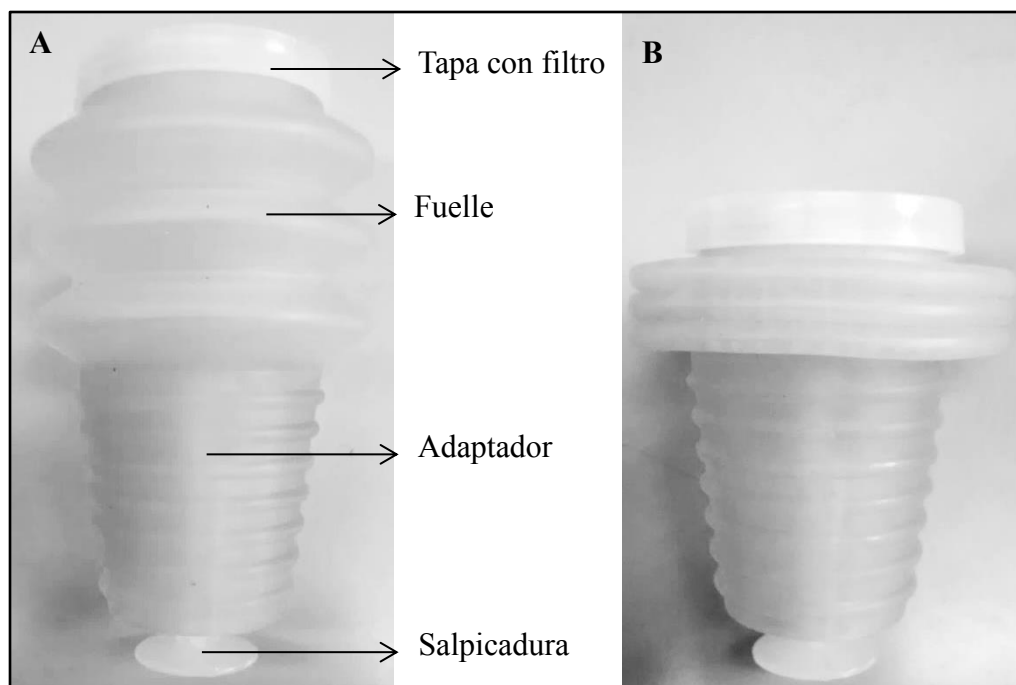


Figura 5.1. Tapones Oxyump®. **(A)** Estos tapones de silicona flexible se componen de 4 partes, cada una con funciones específicas. El diseño del tapón busca generar un intercambio activo de gases, contener el goteo dentro del matraz y evitar que partículas en el aire contaminen el cultivo. **(B)** El tapón Oxyump modificado tiene sujeto el fuelle para cancelar el movimiento de bombeo (Reynoso-Cereceda *et al.*, 2016).

5.3. Determinación del $k_L a$ en matraces agitados por el método dinámico (gassing-out)

El efecto de la agitación, orbital y por resonancia acústica, sobre el $k_L a$ se evaluó variando el diámetro interior máximo con matraces de diferentes volúmenes nominales (250, 500 y 1000 mL), a dos temperaturas diferentes (30 y 37°C). El cuello de los matraces fue modificado con el fin de que se ajustaran a los tapones Oxyump®, las dimensiones se muestran en la Tabla 5.1.

Se eligió el método dinámico en el sistema difásico aire-agua, como una aproximación para comparar las capacidades de transferencia de masa en los sistemas de agitación de matraces RAMbio y orbital. Para lo cual, primero se agregó agua a cada matraz de acuerdo al volumen de llenado respectivo (10, 15, 20, 25 o 40% volumen de agua

desionizada/volumen nominal). El oxígeno disuelto se removió con la adición de una solución de Na₂SO₃, con CoCl₂ como catalizador, con concentraciones finales por debajo de 6x10⁻³ M y 5x10⁻⁷ M, respectivamente. El oxígeno molecular oxida al sulfito, y la reacción se acelera en presencia de iones Co⁺²; la cinética de la reacción no fue considerada debido a que el objetivo fue remover el oxígeno de la fase líquida, y la medición de k_{LA} tuvo lugar cuando dicha reacción hubo terminado (Van't-Riet, 1979). Con el agua desoxigenada se inició la agitación, y se registraron en línea los valores de oxígeno disuelto (OD) en función del tiempo como se describe en la Sección 5.4.

El coeficiente volumétrico de transferencia de masa, k_{LA}, se determinó como la pendiente lineal de la expresión logarítmica expresada en la Ecuación 5.2 en función del tiempo. Dicha ecuación es el resultado de integrar la Ecuación 2.2 (entre dos tiempos, como lo muestra la Ecuación 5.1), considerando la OTR como se describe en la Ecuación 2.1 donde OUR=0 (van Suijdam *et al.*, 1978; Garcia-Ochoa y Gomez, 2009; Garcia-Ochoa *et al.*, 2010). En el Anexo A1.2 se detalla un ejemplo de la medición de k_{LA} con el método descrito.

$$\int_{C_{L1}}^{C_{L2}} \frac{1}{C_L^* - C_L} dC_L = k_L a \int_{t_1}^{t_2} dt \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

$$\ln \left(\frac{C_L^* - C_{L2}}{C_L^* - C_{L1}} \right) = -k_L a (t_2 - t_1) \quad (\text{Ecuación 5.2})$$

Los matraces con agitación orbital cumplieron el criterio de operar como sistemas en fase, establecido por los valores de los números Ph y Fr, bajo todas las condiciones operacionales evaluadas (Büchs *et al.*, 2000; Büchs *et al.*, 2001). La descripción y evaluación de dichos criterios son detalladas en el Anexo A1.3. Es importante evitar el desarrollo del fenómeno “fuera de fase” debido a está asociado a una fuerte caída tanto en la potencia suministrada, como en la eficiencia de mezclado y la transferencia de masa gas-líquido.

Tabla 5.1. Dimensiones representativas de los matraces Erlenmeyer (Duran®) de vidrio usados en los experimentos de este trabajo.

Volumen nominal (mL)	Diámetro máximo del matraz ^a	Diámetro máximo del cuello ^a	Altura del cuello ^a	Altura total ^a	Grosor del vidrio ^a
250	85	40	54	165	
500	105	34	36	180	1.5
1000	131	42	46	223	

^a Las dimensiones se dan en mm.

5.4. Medición del oxígeno disuelto (OD)

Las mediciones de oxígeno disuelto, tanto para las determinaciones de k_{LA} como las mediciones en los cultivos de *E. coli*, fueron monitoreadas en línea usando el lector óptico Fibox 3 con el sensor PST3 y el software OxyView PST3v602 (PreSens, Regensburg, Germany). El fundamento del funcionamiento del sensor óptico está detallado en el Anexo A1.4.

El parche del sensor óptico fue adherido al fondo de cada matraz, que se colocó sobre una base específicamente diseñada para que el dispositivo que transmite la señal y el sensor se sobrepusieran a menos de 2 mm de distancia tanto en la agitadora de resonancia acústica como en la orbital (Gupta y Rao 2003; Wittmann *et al.*, 2003). El contacto del sensor óptico y la fase líquida depende de la posición del parche dentro del matraz (Hansen *et al.*, 2011). Los parches usados en este trabajo se colocaron al fondo del matraz alejados del centro del matraz a una distancia de 19 mm (matraz de 250 mL), 28 mm (matraz de 500 mL) y 40 mm (matraz de 1000 mL). Se tuvo cuidado de que el sensor mantuviera contacto con el líquido durante las mediciones.

El sensor óptico se calibró para leer 0% de saturación con aire con una solución de Na_2SO_3 (0.3 M) y CoCl_2 ($\leq 5 \times 10^{-7}$ M); y el 100% con agua aireada y saturada en el sistema de agitación correspondiente (siguiendo la metodología de calibración sugerida por el proveedor: PreSens, Regensburg, Germany).

El tiempo de respuesta del sensor óptico (t_R) t_{60} (0-60% saturación con aire) es ~ 3 s. Asumiendo una respuesta dinámica de primer orden, que se caracteriza por una constante

de tiempo, empíricamente se considera que cuando $t_R < 1/k_{La}$ el tiempo de respuesta del sensor no influye significativamente en la determinación del k_{La} (Van't-Riet, 1979). Truncar los primeros datos de la curva de respuesta ayuda en la aplicación de una aproximación de primer orden (Garcia-Ochoa y Gomez, 2009). Los datos debajo del 10% de saturación con aire se descartaron para reducir el efecto del tiempo de respuesta del sensor en las mediciones de k_{La} . El tiempo de respuesta del sensor óptico es lo suficientemente pequeño para considerarse despreciable durante las mediciones de los perfiles de oxígeno disuelto de los cultivos de *E. coli*, donde los cambios de la concentración de oxígeno son observables después de varios minutos.

5.5. Correlación empírica del k_{La} en matraces con agitación orbital

Se utilizó correlación empírica reportada por Klöckner y Büchs (2012) (Ecuación 2.6) para estimar el k_{La} de matraces con agitación orbital. Esta correlación empírica se obtuvo a partir de mediciones experimentales de OTR usando un sistema Na_2SO_3 1 M como consumidor químico de oxígeno (Sección 2.1). Los parámetros operacionales consideran las unidades del SI; considerando el diámetro interior máximo del matraz (d) [m], la velocidad de agitación (n) [s^{-1}], el diámetro de agitación (d_0) [cm], y el volumen de llenado (V) [m^3].

$$k_{La_{Sulf}} = 3.212 \cdot 10^{-4} d^{1.92} n d_0^{0.38} V_f^{-0.83} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

5.6. Modelo empírico para estimar el k_{La} en matraces agitados en función de las variables operacionales

Las correlaciones empíricas propuestas para estimar el k_{La} en función de los parámetros operacionales se obtuvieron usando el software MATLAB R2012b, al igual que el cálculo de la bondad del ajuste, incluyendo el coeficiente de determinación ajustado ($\text{adj } R^2$), la raíz del error cuadrático medio (RMSE) y los grados de libertad (GDL).

Los parámetros operacionales considerados como variables independientes fueron la velocidad de agitación (g en el sistema de agitación por resonancia acústica y rps para la agitación orbital), y la relación A/V , donde A es representativa de la geometría y refiere al

área superficial máxima del líquido sin movimiento al interior del matraz (cm^2) y V es el volumen de llenado (cm^3) (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Relación del área correspondiente al diámetro máximo del matraz entre el volumen de agua (A/V), que agrupa los factores de geometría del matraz y volumen de llenado, para cada una de las condiciones evaluadas.

V_N (mL)	250					500					1000				
V_F (%)	10	15	20	25	40	10	15	20	25	40	10	15	20	25	40
V (mL)	25	37.5	50	62.5	100	50	75	100	125	200	100	150	200	250	400
A^*/V	2.21	1.41	1.06	0.84	0.53	1.63	1.09	0.82	0.65	0.41	1.29	0.86	0.64	0.51	0.32

V_N : Volumen nominal

V_F : Porcentaje de volumen de llenado (volumen de agua desionizada/volumen nominal de matraz)

*Considera el área de una superficie circular con el diámetro interior máximo del matraz.

5.7. Microorganismo modelo, medio de cultivo y condiciones de crecimiento

Se trabajó con la cepa de *E. coli* BL21-Gold (DE3) que contiene el plásmido pQE-30 y el gen codificante para una esfingomielinasa-D recombinante (rSMD) de garrapata (*Boophilus microplus*) (Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014), que fue amablemente donada por el Dr. Alejandro Alagón Cano del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Un banco maestro y de trabajo de dicha cepa se mantuvo a -70°C en medio Luria-Bertani (LB) (g/L: triptona, 10.0; extracto de levadura, 5.0 y NaCl 5.0), suplementada con glicerol 50% v/v.

Los cultivos se realizaron en matraces de 500 mL con 100 mL de medio semi-definido (SM) a 37°C , a menos que se especifiquen otras condiciones. El medio se preparó de acuerdo a reportes previos (Hewitt *et al.*, 2000; Lara *et al.*, 2006), con algunas modificaciones (se incrementó la concentración de glucosa a 10 g/L y la de fosfatos en un 130%; el medio se adicionó con casamino ácidos; además, se sustituyó $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ por $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y citrato de sodio por ácido cítrico). Así, la composición del medio de cultivo en g/L de agua destilada fue: glucosa, 10.0; Na_2SO_4 , 2.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.7; NH_4Cl , 0.5; K_2HPO_4 , 19.0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5.2; ácido cítrico, 1.0; MgSO_4 , 0.24; tiamina, 0.01 y casamino ácidos, 2.0; además de sales minerales. El pH se ajustó a 7.0 ± 0.1 con HCl 2 N y posteriormente fue esterilizado con calor húmedo en autoclave a 121°C por al menos 15 min. Las soluciones concentradas de glucosa, MgSO_4 y las sales

minerales se esterilizaron por separado y se agregaron al medio frío. Se agregó ampicilina a una concentración final de 50 mg/L. Las soluciones concentradas de tiamina, casamino ácidos y ampicilina se esterilizaron por filtración (0.22 µm) y se adicionaron al medio antes de inocular. La concentración final de las sales minerales en el medio (mg/L) fue la siguiente: CaCl₂.H₂O, 0.74; ZnSO₄.7H₂O, 0.18; MnSO₄.H₂O, 0.10; Na₂-EDTA.2H₂O, 22.25; FeCl₃.6H₂O, 16.7; CuSO₄, 0.10; y CoCl₂.6H₂O, 0.18.

Para preparar los inóculos se tomaron alícuotas (0.5-1 mL) del banco de trabajo y se crecieron en medio SM sustituyendo los casamino ácidos con medio LB al 4% v/v, la concentración de ampicilina fue de 100 mg/L. Los matraces se incubaron a 30°C con agitación orbital (200 rpm). Luego de 16-18 h, los cultivos fueron centrifugados (12100 x g, 15 min) y las células se resuspendieron en medio SM fresco. Se tomó la cantidad suficiente de dicha suspensión celular y se inocularon al menos dos matraces con medio SM (para cada condición de agitación evaluada) que se iniciaron con una densidad óptica (D.O.) de 0.25-0.3 u.a. 600 nm. Se tomaron alícuotas periódicamente que se usaron para cuantificar biomasa, concentración de glucosa y ácidos orgánicos.

Adicionalmente, se evaluó el papel del tapón Oxypump en el desarrollo de los cultivos de *E. coli*, que se realizaron tal como se describió arriba. El matraz agitado por el sistema RAMbio usó un tapón modificado en el que el movimiento de fuelle fue cancelado, dicho tapón se muestra en la Figura 5.1B.

5.8. Métodos analíticos

5.8.1. Concentración celular

El crecimiento del cultivo no inducido de *E. coli* BL21-Gold (DE3) se determinó midiendo densidad óptica (D.O.) a 600 nm usando medio como blanco en un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 20, Thermo USA). Las muestras se diluyeron con agua destilada a valores de D.O. superiores a 0.7 u.a. Previamente, se estableció la equivalencia de 1.0 u.a. a 0.50 g/L de peso seco (Anexo A1.5) (Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014).

5.8.2. Cuantificación de metabolitos extracelulares (glucosa y ácidos orgánicos)

Se tomaron muestras de 1.0 mL del caldo de cultivo y después de ser centrifugadas (17900 x g, 15 min), sirvieron para determinar la concentración de ácidos orgánicos y glucosa. También se tomaron muestras para medir el perfil de pH durante los cultivos (Corning, pH meter 430, USA).

La concentración de ácidos orgánicos se obtuvo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC: Shimadzu, Japan equipado con un detector UV) usando una columna de intercambio catiónico AminexHPX-87H (Bio-Rad Hercules, CA). Se empleó una solución estándar comercial (No. catálogo 125-0586 Bio-Rad Hercules, CA, Anexo A1.6) para cuantificar las sales correspondientes: acetato, oxalato, citrato, malato, succinato y formato. De acuerdo a lo establecido por el proveedor, se inyectaron 20 μ L de muestra, con un flujo de 0.6 mL/min con de H₂SO₄ 4 mM como fase móvil a 30°C; la longitud de onda del detector UV se fijó a 215 nm. En el Anexo A1.6 se muestran los tiempos de retención y ejemplos de cromatogramas de diferentes muestras.

Las concentraciones de glucosa y lactato se determinaron en un analizador bioquímico YSI2900 (YSI Life Sciences, USA). La tecnología de YSI a base de sensores de enzima, emplea una o más reacciones catalizadas por enzimas para producir peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es electroquímicamente oxidado en el ánodo de platino de la sonda electroquímica, produciendo una corriente que se traduce en la señal a la sonda. Se usó el buffer de fosfatos YSI 2357. Para las mediciones de glucosa se usó la membrana YSI 2365 (glucosa oxidasa) y la solución calibradora con 2.5 g/L de glucosa se preparó en buffer de fosfatos (NaH₂PO₄ 40g/L; Na₂HPO₄ 10 g/L) para equilibrar los anómeros α y β . Para las mediciones de L-lactato se usó la membrana YSI 2329 (L-lactato oxidasa) y las soluciones calibradoras YSI 2776 (L-lactato 0.5 g/L) o YSI 1530 (L-lactato 2.67 g/L).

5.9. Microscopía electrónica de transmisión

Para analizar la morfología microscópica de las células de *E. coli* crecidas bajo cada condición de aireación evaluada, se tomaron muestras a las 6 h del cultivo durante la fase exponencial de crecimiento, y se trataron como se ha reportado previamente (Castellanos-

Mendoza *et al.*, 2014). Las muestras se lavaron tres veces con solución amortiguadora de cacodilato de sodio (0.16 M) a pH 7.4 durante 2 h a 4°C. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% v/v y glutaraldehído al 2.5% v/v en solución amortiguadora de cacodilato de sodio (0.16 M) a pH 7.4 durante 2 h a 4°C. Las células posteriormente fijadas con tetraóxido de osmio al 1% v/v durante 90 min a 4°C se enjuagaron dos veces con solución amortiguadora enfriada y seis veces con agua destilada fría. En seguida, las muestras se deshidrataron con series de etanol y se embebieron en Epon/Araldita (Mollenhauer, 1964). Se tiñeron secciones delgadas con acetato de uranilo, y luego de llevarlas a citrato se observaron con un microscopio electrónico (ZEISS Libra 120 plus, Germany).

5.10. Análisis estadístico

Cada cultivo de *E. coli* se realizó al menos por duplicado. Para evaluar diferencias significativas entre los parámetros de cada cultivo se realizaron pruebas ANOVA de dos vías para muestras independientes y comparaciones múltiples con los análisis de Tukey (pruebas posteriores al ANOVA) con un nivel de significancia de 0.05; considerando como variables independientes el sistema de agitación y el valor inicial de k_{La} . Los análisis se hicieron con el software GraphPad Prims 6.01 (2012).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presenta la caracterización del equipo de agitación de matraces por resonancia acústica en términos del k_{La} , en comparación a la agitación orbital. Asimismo, se proponen y validan modelos empíricos para estimar el valor de dicho coeficiente en función de variables operacionales. Como resultado de este trabajo se publicó recientemente un artículo en la revista *Biochemical Engineering Journal* (Reynoso-Cereceda, *et al.*, 2016; Anexo 6).

Con base en lo anterior, se eligieron condiciones de operación para igualar las capacidades de aireación de los sistemas de agitación de matraces RAMbio y orbital, igualando el k_{La} inicial, y se realizaron cultivos de *E. coli*. El desempeño de los cultivos se evaluó en cuanto a crecimiento, consumo de glucosa, producción de acetato, así como el desarrollo de los perfiles de oxígeno disuelto y pH.

Además, se evaluaron los efectos del tapón Oxypump, la velocidad de agitación sobre el desarrollo de los cultivos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD, así como el desempeño del cultivo de la cepa parental *E. coli* BL21-Gold (DE3) sin transformar.

6.1. Determinación de k_{La} en matraces agitados

Se obtuvieron los valores de k_{La} para matraces con agua en dos sistemas de agitación: con resonancia acústica (RAMbio) y orbital, variando la velocidad de agitación de 3 a 20 g y de 100 a 350 rpm ($d_0=25$ mm), respectivamente. Las determinaciones se hicieron en matraces convencionales con diferente volumen nominal, variando el volumen de llenado, como se describe en la sección de materiales y métodos.

En la Figura 6.1 se muestra el incremento de los valores de k_{La} en función de la velocidad de agitación. Bajo las condiciones evaluadas, el sistema de agitación acústica RAMbio alcanzó mayores valores de k_{La} . Por ejemplo, para el matraz de 500 mL con 20% de volumen de llenado a 37°C con agitación acústica (20 g) se tuvo un valor de k_{La} máximo de 270.3 ± 30.2 h⁻¹ (Figura 6.1B), mientras que con agitación orbital (300 rpm) se alcanzó 91.1 ± 4.7 h⁻¹ (Figura 6.1E), lograr mayores valores de k_{La} requiere incubadoras orbitales

que permitan operar de forma estable a un diámetro de agitación mayor junto con velocidades de agitación superiores.

Una comparación más detallada del desempeño de la agitación por resonancia acústica y la orbital requiere incluir el análisis de la potencia volumétrica en cada sistema y la hidrodinámica del fluido, que son difíciles de separar del fenómeno de transferencia de masa estudiado cuando se trabaja con matraces agitados (Veglio *et al.*, 1998; Marín-Palacio *et al.*, 2014).

En la literatura se pueden encontrar valores superiores de k_{La} para matraces agitados orbitalmente (sin baffles) que los obtenidos en el presente trabajo, desde luego estos se han alcanzado al operar bajo diferentes condiciones, como mayores diámetros de agitación ($d_0 > 25$ mm) y volúmenes de llenado bajos. Como ejemplo, se reportó un valor de k_{La} igual a 565.2 h^{-1} para un matraz agitado de 50 mL de volumen nominal con un volumen de llenado relativo del 4% (solución de sulfito), a 450 rpm con un diámetro de agitación de 7 cm (Maier *et al.*, 2004). En este trabajo, los valores más altos de k_{La} fueron para la agitación orbital de $131.3 \pm 5.1 \text{ h}^{-1}$ ($V_N=500$ mL, $V_F=15\%$, $n=300$ rpm y 37°C) (Figura 6.1E); mientras que con agitación por resonancia acústica se obtuvo un valor de $435.4 \pm 11.7 \text{ h}^{-1}$ ($V_N=500$ mL, $V_F=10\%$, $n_g=20$ g y 37°C) (Figura 6.1B).

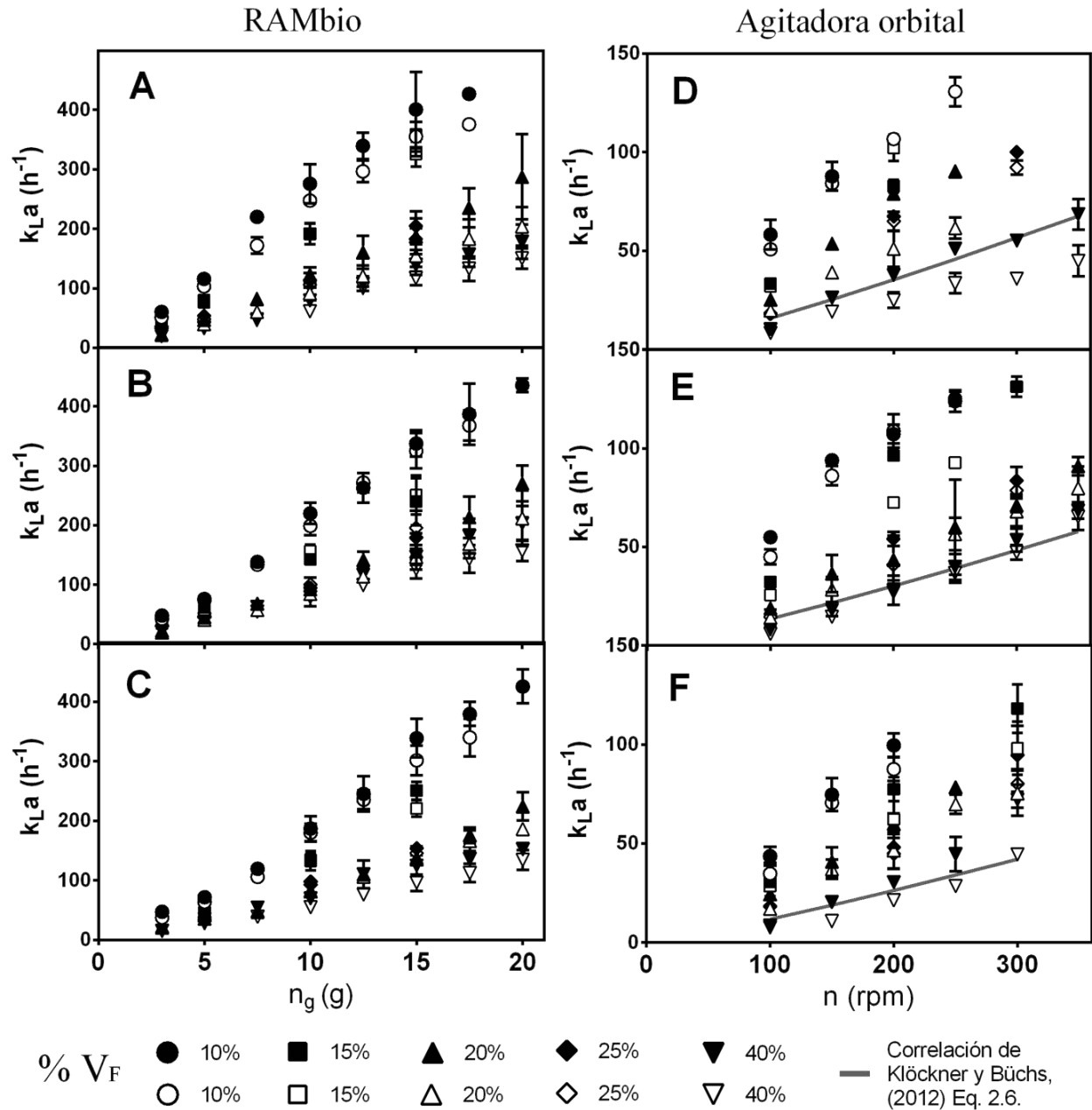


Figura 6.1. Valores de k_{La} en matraces agitados en función de la velocidad de agitación, en matraces con diferente volumen nominal en el sistema de agitación acústica (A) 250 mL, (B) 500 mL y (C) 1000 mL; y con agitación orbital (D) 250 mL, (E) 500 mL y (F) 1000 mL. Las mediciones se hicieron variando el volumen de llenado a 30 y 37°C. Se muestran la media y la desviación estándar de al menos tres repeticiones. Las líneas continuas representan la predicción usando el modelo de la ecuación 2.6 considerando un volumen de llenado del 20%.

No fue posible medir valores superiores de k_{La} debido a la pérdida de contacto entre el líquido y el parche óptico adherido al fondo del matraz que dificultaron la correcta medición del coeficiente bajo algunas condiciones de operación originalmente propuestas (PSt3 sensor, Fibox 3 by PreSens, Regensburg, Germany). El contacto del parche y el líquido está en función de la posición del sensor dentro del matraz (Hansen *et al.*, 2011). La pérdida de contacto ocurrió al operar en condiciones específicas, con agitación orbital: en el matraz de 250 mL ($V_F=10\%$ a $n \geq 250$ rpm; $V_F=15-20\%$ a $n \geq 300$ rpm), de 500 mL ($V_F=10\%$ a $n \geq 300$ rpm), y de 1000 mL ($V_F=10\%$ a $n \geq 250$ rpm); mientras que en el sistema RAMbio, la pérdida de contacto se observó en matraces de 250 mL ($V_F=10\%$ a $n_g=20$ g). En el Anexo A1.7 se muestra un ejemplo de los valores de oxígeno disuelto registrados bajo las condiciones comentadas.

Esta limitación en las mediciones de oxígeno disuelto con el sensor óptico ha sido previamente reportada y sucede en altas velocidades de agitación y/o bajos volúmenes de llenado (Hansen *et al.*, 2011). En cultivos de *E. coli* BL21-pET28a a los que midieron el oxígeno disuelto con el sensor óptico observaron valores que se mantuvieron siempre mayores a 0%; a la par midieron los perfiles de OTR usando el dispositivo RAMOS (Anderlei y Büchs, 2001; Anderlei *et al.*, 2004) que igualaron el valor de OTR_{max} como consecuencia del consumo total de oxígeno disuelto por parte de las bacterias, las incongruencias entre ambos sistemas de medición se explican por que el parche que medía oxígeno disuelto en la fase líquida interactuaba continuamente con la fase gaseosa en el espacio de cabeza del matraz (Hansen *et al.*, 2011).

Los valores de k_{La} obtenidos bajo agitación orbital son difíciles de comparar con otros previamente reportados, como ejemplo se hace una comparación con los valores del coeficiente predichos por el modelo reportado por Klöckner y Büchs (2012), para cada matraz tomando como ejemplo un volumen de llenado ($V_F=20\%$) a diferentes velocidades de agitación (Figura 6.1 D-F). Los valores experimentales fueron de 1.6 (30°C) a 2.0 (37°C) veces superiores que los estimados por el modelo, las mayores diferencias se encontraron a mayores velocidades de agitación. Esto se debe a los diferentes principios de las respectivas metodologías con las que se obtuvieron los valores de k_{La} ; el modelo reportado se validó utilizando el equipo RAMOS que realiza balances de la presión de los gases en el espacio de cabeza del matraz (Maier y Büchs, 2001; Anderlei y Büchs, 2001;

Maier *et al.*, 2004); mientras que en el presente trabajo se realizaron mediciones de oxígeno disuelto en la fase líquida. Además como especifican los autores, su modelo fue desarrollado en condiciones específicas de solubilidad y difusividad de oxígeno (el modelo se obtuvo usando un sistema con una concentración de sulfito de sodio 1 M a 22.5°C, viscosidad de 1.78 mPa.s y una densidad de 1105.9 kg/m³), en caso de que las condiciones sean diferentes propusieron usar un factor de corrección que va de 1 a 2.8 (Maier *et al.*, 2004; Klöckner y Büchs, 2011). Otras diferencias entre ambos sistemas son debidas a la geometría (altura y diámetro de los cuellos de los matraces, difusividad de los gases a través de los tapones de algodón).

6.2. Influencia de los parámetros operacionales en el k_{La} de matraces agitados

El k_{La} incrementa con la velocidad de agitación en ambos sistemas: orbital y con resonancia acústica, como se observa en la Figura 6.1. En el caso de la agitación orbital, la difusión de oxígeno se da a través del área interfacial gas-líquido de la superficie expuesta al aire y de la película de líquido que se forma en la pared del matraz. Al aumentar la velocidad de agitación, la fuerza centrífuga aumenta, incrementando la altura que alcanza la película de líquido en las paredes del matraz, lo cual incrementa el área de transferencia (Maier *et al.*, 2004). Además, incrementar la intensidad de la agitación disminuye el espesor de la capa límite del lado del líquido, esto significa una menor resistencia a la transferencia gas-líquido y permite alcanzar mayores valores de k_{La} (Maier *et al.*, 2004). En la agitación por resonancia acústica, la velocidad de agitación (n_g) se refiere a la magnitud de la aceleración del sistema en resonancia, que se da a una frecuencia fija de 58-66 Hz, y la variación modulada de la amplitud, alrededor de 0.25-5 mm (Howe *et al.*, 2011). El uso de esta tecnología para la mezcla de líquidos y gases da lugar a la formación de gotas que se separan del seno del líquido, la distribución del patrón de goteo es uniforme, y se forman burbujas con tamaños del orden de 10-100 μm (Howe *et al.*, 2011). La cantidad de líquido que forma el patrón de goteo junto al número de burbujas se incrementa a mayores velocidades de agitación lo que aumenta el área interfacial de transferencia gas-líquido.

La influencia de la geometría del matraz se evaluó variando el volumen nominal, cuanto este se incrementa aumentan los valores de k_{La} , mientras que al aumentar el volumen de llenado, los valores de dicho coeficiente disminuyen. Este comportamiento ha sido previamente discutido en matraces agitados orbitalmente (van Suijdam *et al.*, 1978; Henzler y Schedel, 1991; Veljkovic *et al.*, 1995; Veglio *et al.*, 1998; Maier y Büchs, 2001; Maier *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006; Ge y Rao, 2012), y ahora se observa en el caso de la agitación acústica.

En este trabajo se agruparon dos parámetros operacionales: la geometría del matraz y el volumen de llenado con el uso de la relación A/V , donde A es el área circular considerando el diámetro interior máximo del matraz (d) y representa la mayor área superficial de la interfase gas-líquido que puede lograrse en cada matraz sin movimiento, y V es el volumen de llenado. La relación A/V del líquido sin movimiento es proporcional al mezclado del

seno del líquido y al área (a) través de la cual difunde el oxígeno en la superficie expuesta al aire cuando la agitación es orbital. Manteniendo la velocidad de agitación constante, el diámetro de la interfase se relaciona con el movimiento orbital del líquido (Henzler y Schedel, 1991; Veglio *et al.*, 1998). En la Figura 6.2 se ilustra el intervalo de A/V evaluadas (enlistadas en la Tabla 5.2), en función del volumen de llenado para matraces con diferente volumen nominal.

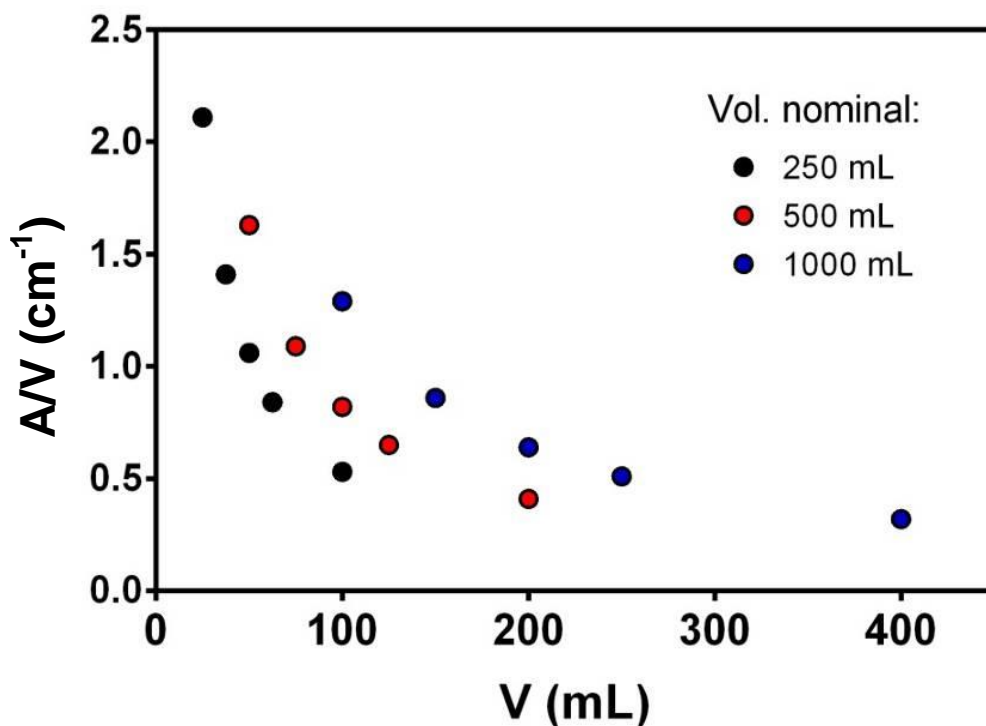


Figura 6.2. Relación del área superficial del líquido correspondiente al diámetro interior máximo del matraz entre el volumen de llenado de agua (A/V), en función del volumen de llenado para cada condición de volumen nominal de matraz evaluado.

En la Figura 6.3 se observa la variación de k_{La} en función del parámetro A/V propuesto para matraces agitados tanto en el sistema con resonancia acústica como el orbital. El k_{La} se ve favorecido a valores altos de A/V aunque este incremento no es lineal y parece estar asociado al incremento de la velocidad de agitación.

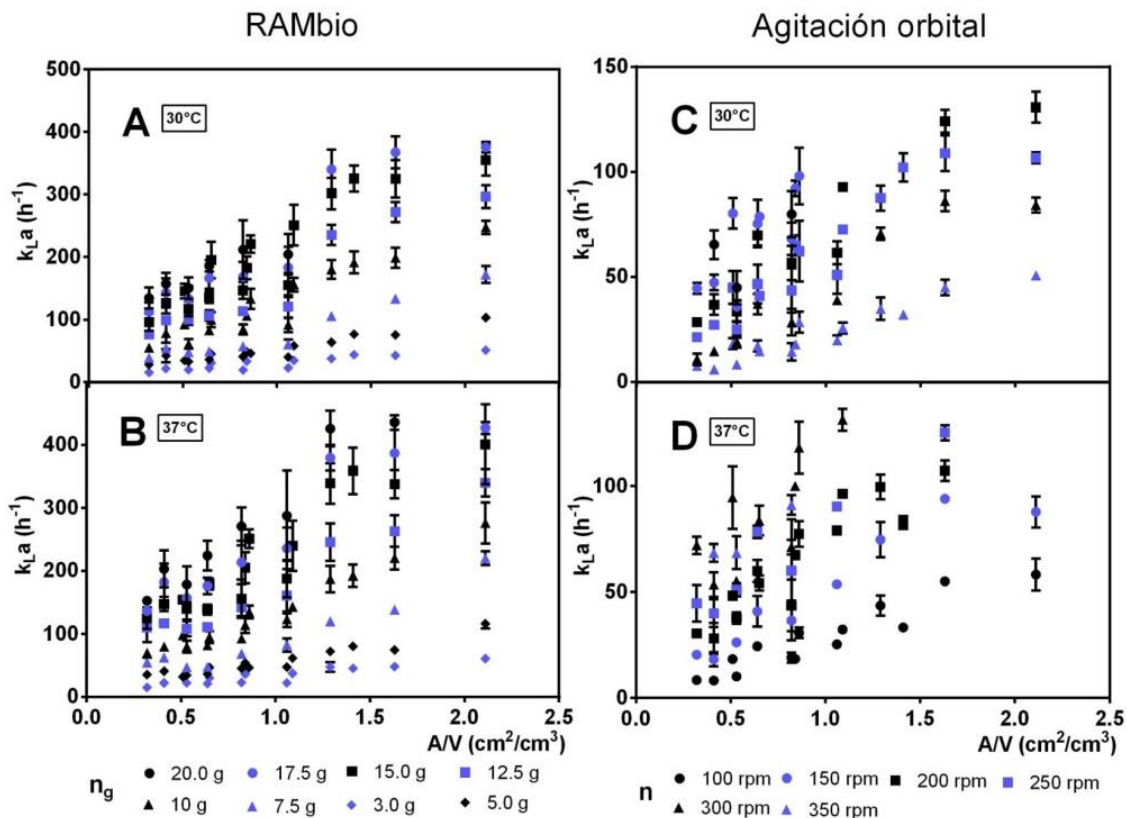


Figura 6.3. Valores de k_{La} en matraces agitados en función del parámetro A/V que agrupa la geometría del matraz y el volumen de llenado (Tabla 5.2, Figura 6.2); en matraces con diferente volumen nominal en el sistema de agitación RAMbio (A) 30°C y (B) 37°C; y con agitación orbital (C) 30°C y (D) 37°C. Se grafican los valores de k_{La} a diferentes velocidades de agitación. Se muestran la media y la desviación estándar de al menos tres repeticiones.

El efecto de la velocidad de agitación (n [=]rps; n_g [=]g) y la relación A/V sobre los valores de k_{La} se modeló empíricamente, para lo cual se buscó un modelo práctico que ajustara los valores obtenidos de k_{La} en los sistemas de agitación RAMbio y orbital. Los datos experimentales se ajustaron en una correlación de potencia multivariable cuya forma se presenta en la Ecuación 6.1; donde a, b y c son coeficientes específicos para cada sistema de agitación. Los resultados del ajuste se resumen en la Tabla 6.1. Esta aproximación pretende ser útil para establecer las condiciones operacionales que aseguren un suministro suficiente de oxígeno durante los cultivos de acuerdo a las necesidades de los microorganismos.

$$k_{La} = a \cdot n^b \cdot (A/V)^c \quad (\text{Ecuación 6.1})$$

Tabla 6.1. Valores de las constantes del modelo empírico propuesto (Ecuación 6.1), y bondad del ajuste, para el k_{La} en matraces agitados en función de la velocidad de agitación (n_g , n) y la relación A/V , con agitación acústica y orbital a 30 y 37°C.

Agitación	T (°C)	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	DF ^a	adj R ² ^b	RMSE ^c
RAM	30	10.570 s ² h ⁻¹	1.089	0.771	544	0.908	29.0
Orbital		16.610 cm.s.h ⁻¹	1.087	0.872	317	0.832	12.4
RAM	37	9.881 s ² h ⁻¹	1.161	0.745	510	0.926	30.4
Orbital		18.350 cm.s.h ⁻¹	1.140	0.788	313	0.863	12.0

^a Grados de libertad, $DF=m-2$, donde m es el número total de datos considerados para el ajuste.

^b Coeficiente R^2 ajustado, es el cuadrado de la relación entre los valores de respuesta y los valores de respuesta previstos ajustado con base en los grados de libertad residuales, $adj R^2=1-SSE(m-1)/SST(DF)$, donde $SSE=Sum(i=1 \text{ hasta } m)\{(y_i-f_i)^2\}$ y $SST=Sum(i=1 \text{ hasta } m)\{(y_i-y_{av})^2\}$; donde y_i es el valor observado, f_i es el valor predicho por el modelo y y_{av} es el valor promedio.

^c Error estándar de ajuste, $RMSE=(MSE)^{1/2}$, donde MSE es el error cuadrático medio, $MSE=SSE/DF$. El RMSE está dado en h⁻¹.

Los valores que toma la constante b , exponente de n ($n[=]$ rps; $n_g[=]$ g), están alrededor de 1.1, lo que coincide con reportes previos para modelos de k_{La} en matraces con agitación orbital, donde se reportan valores de entre 1.0 y 1.4 (van Suijdam *et al.*, 1978; Henzler y Schedel, 1991; Veljkovic *et al.*, 1995; Veglio *et al.*, 1998; Klöckner y Büchs, 2012). Además, la Ecuación 6.1 concuerda con modelos previamente propuestos para matraces con agitación orbital; en la Figura 6.4 se muestra una comparación de la correlación propuesta con la de otros autores. Las diferencias observadas en la Figura 6.4 se explican en términos de las propiedades fisicoquímicas de cada sistema, además de las variaciones en cuanto a la geometría del matraz, el tipo de tapón y la metodología empleada, tales condiciones en algunos casos no se especifican. Es por ello que la comparación de los resultados que se representa en la Figura 6.4 estuvo dentro de un pequeño intervalo de condiciones de operación (Maier y Büchs, 2001).

Liu y colaboradores (2006) propusieron un modelo similar (Ecuación 6.2), ($n[=]$ rpm) a partir de datos experimentales, donde determinaron el k_{La} por el método de oxidación de sulfito usando Co^{2+} como catalizador. Esta correlación tuvo un ajuste muy alto ($R^2=0.997$), sin embargo la aplicación es limitada debido al intervalo estrecho de condiciones experimentales a partir de las cuales se obtuvo el modelo ($V_N=250$ mL; $V_F=20, 14$ y 8% ; $n=200, 250$ rpm; $d_0=25$ mm).

$$k_L a = 0.141 \cdot n^{0.88} \cdot (V_N/V)^{0.80} \quad (\text{Ecuación 6.2})$$

Cabe destacar que los valores de las constantes b y c fueron cercanos entre cada sistema de agitación (RAM y orbital), lo que sugiere un impacto similar de cada parámetro operacional evaluado sobre el $k_L a$, aun cuando los mecanismos de aeración en cada sistema son completamente diferentes. En la constante a se incluyen las conversiones de unidades respectivas.

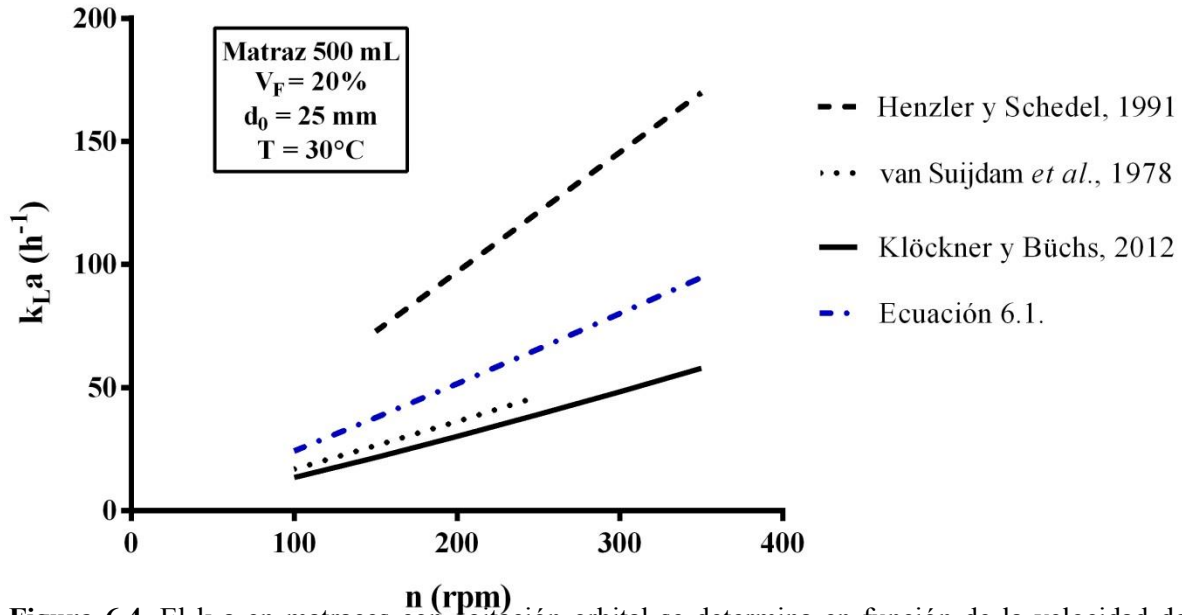


Figura 6.4. El $k_L a$ en matraces con agitación orbital se determina en función de la velocidad de agitación. Los parámetros operacionales considerados para la comparación incluyen un matraz de 500 mL ($d=105$ mm), con 100 mL de agua ($V_F=20\%$), con un diámetro de agitación de 25 mm, a 30°C (en caso de los modelos que consideran parámetros fisicoquímicos). La representación gráfica está dentro el intervalo de condiciones que fueron validadas para cada modelo (Reynoso-Cereceda *et al.*, 2016).

La validación de los modelos empíricos generados se muestra en la Figura 6.5 y 6.6, como una comparación de los valores de $k_L a$ experimentales y estimados, para matraces agitados en el sistema RAMbio (Figura 6.5A, B $30, 37^\circ\text{C}$) y orbital (Figura 6.6 A, B $30, 37^\circ\text{C}$). En el Anexo 2 se pueden ver la validación del modelo representado con gráficos 3D. Los modelos describen una interacción positiva entre la velocidad de agitación y la relación A/V , y son consistentes con los datos experimentales. En la Tabla 6.1 se presenta la bondad del ajuste para cada modelo y se observa un ajuste adecuado de los modelos ($\text{adj } R^2 \geq 0.908$ y $\text{adj } R^2 \geq 0.832$ con agitación en RAMbio y orbital respectivamente), con una desviación del $\pm 30\%$.

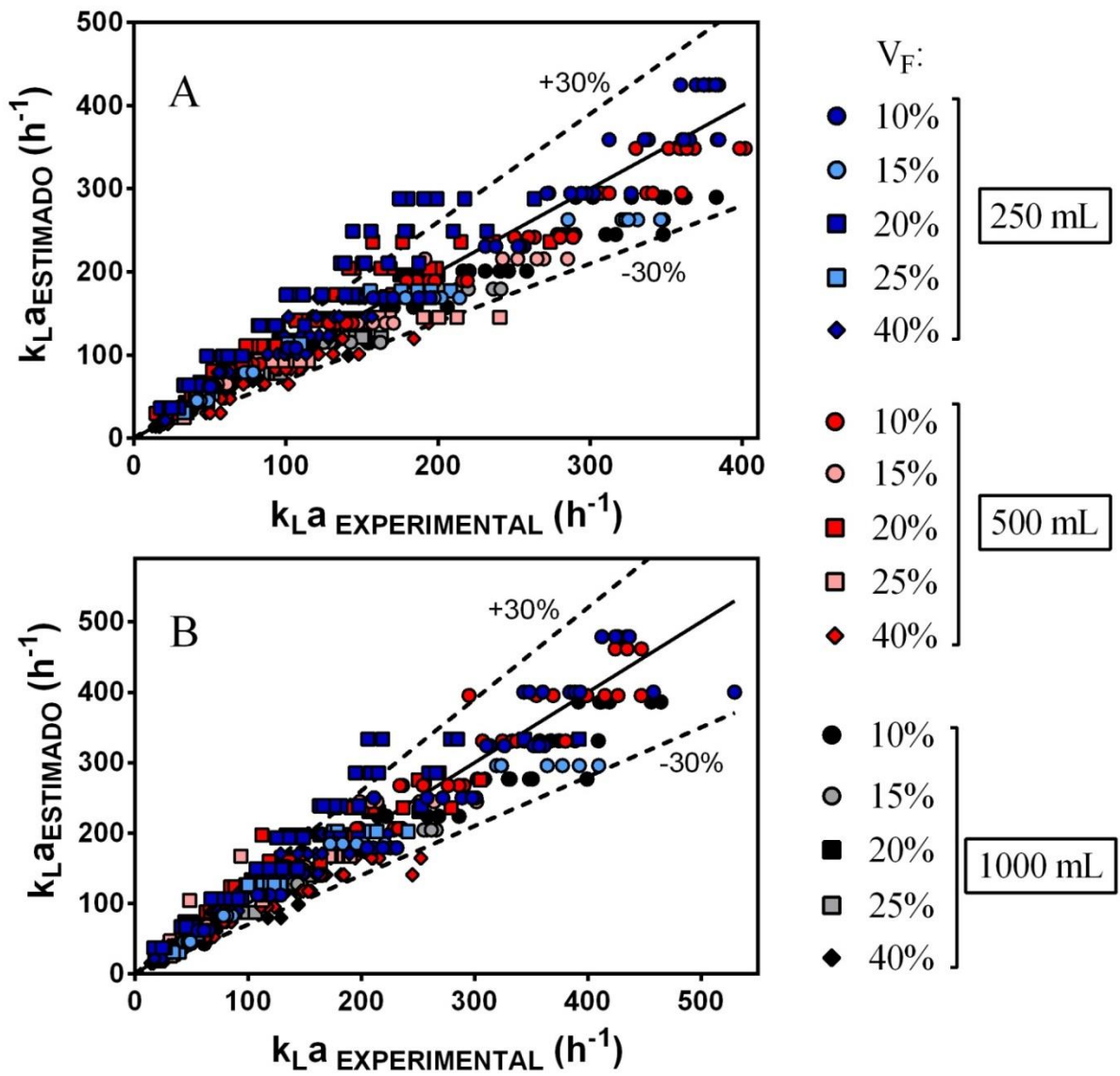


Figura 6.5. Validación de los modelos empíricos propuestos para estimar el k_{La} en matraces agitados en el sistema RAMbio. Se muestran los gráficos espejo que comparan los valores de k_{La} estimados contra los experimentales, para matraces incubados a dos temperaturas (A) 30°C y (B) 37°C; que se obtuvieron variando el volumen nominal (250, 500 y 1000 mL), el volumen de llenado relativo (10-40%), y las velocidades de agitación (3-20 g). La línea de 45° representa un ajuste perfecto entre el valor experimental y el predicho.

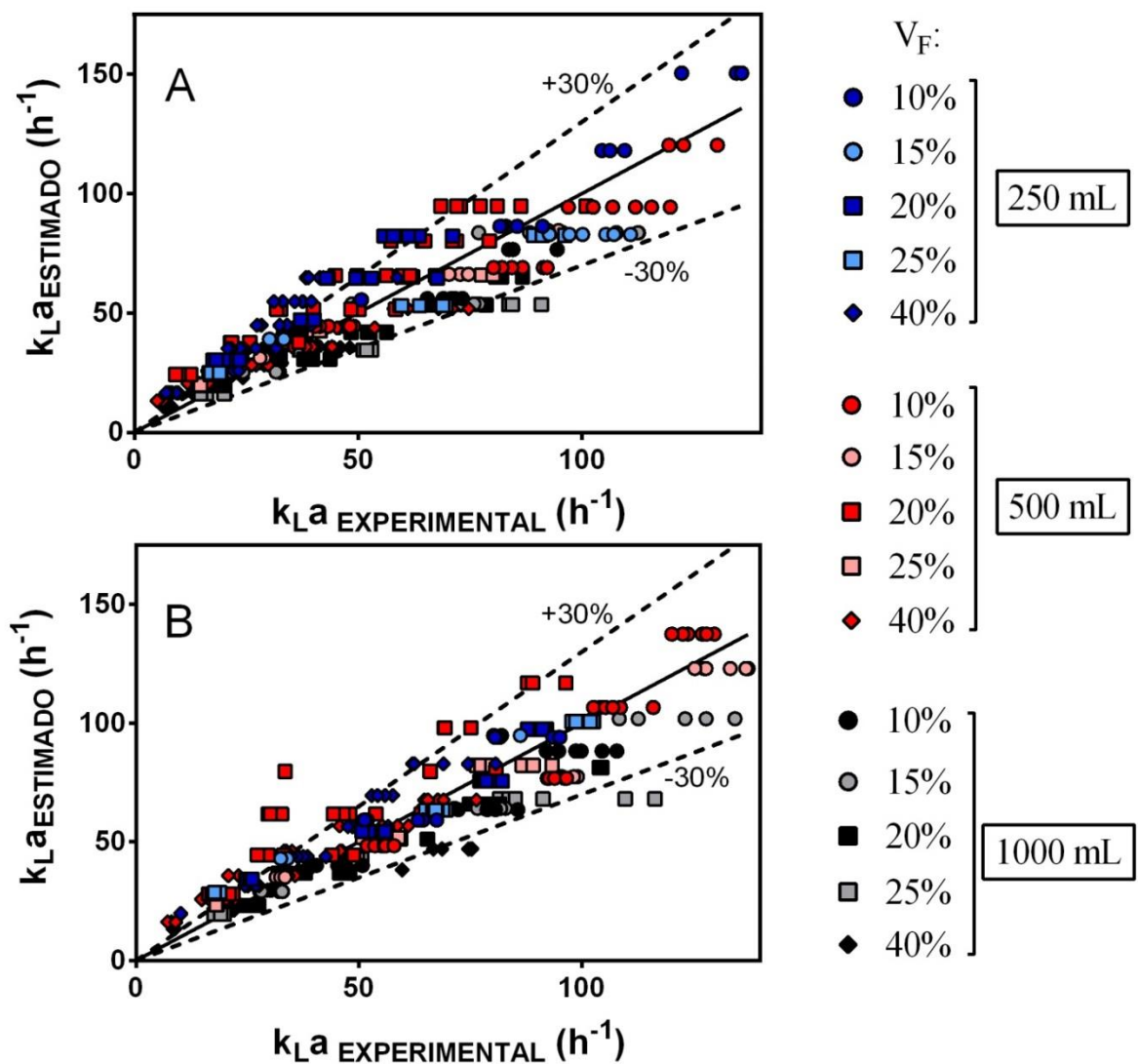


Figura 6.6. Validación de los modelos empíricos propuestos para estimar el k_{La} en matraces agitados a 37°C. Se muestran los gráficos espejo que comparan los valores de k_{La} estimados contra los experimentales, para matraces incubados a dos temperaturas (A) 30°C y (B) 37°C; que se obtuvieron variando el volumen nominal (250, 500 y 1000 mL), el volumen de llenado relativo (10-40%), y las velocidades de agitación (100-350 rpm). La línea de 45° representa un ajuste perfecto entre el valor experimental y el predicho.

Se observan varios datos atípicos con alta desviación (>30%), principalmente a valores bajos de k_{La} (<200 h⁻¹ y <50 h⁻¹ con agitación en los sistemas RAMbio y orbital) (Figura 6.4, 6.5). Cuando el volumen de llenado es bajo ($\leq 15\%$) y en consecuencia la relación A/V es elevada, los valores de k_{La} incrementan más rápido con la velocidad de agitación, en contraste a cuando se trabaja con volúmenes de llenado superiores (Figura 6.1). Usar la relación A/V en las correlaciones propuestas logra conciliar estas diferencias, pero aun así el modelo parece subestimar los valores de k_{La} . Resulta evidente que la relación A/V no se relaciona proporcionalmente con el área de transferencia gas-líquido en las diferentes velocidades de agitación en el sistema RAMbio donde las diferencias son más pronunciadas y se pueden explicar por los patrones de flujo formados, los cuales pueden ser similares al trabajar con altas velocidades de agitación, pero diferentes con bajas aceleraciones (Osorio y Muzzio, 2015). Mejorar el desarrollo del sistema RAMbio en cuanto a la transferencia de masa podría lograrse con el diseño de otras geometrías diferentes a la de los matraces, que permitan incrementar el contacto entre las fases gas y líquido, donde los patrones hidrodinámicos sean tomados en cuenta.

Los valores experimentales obtenidos a 30 y 37°C se ajustaron por separado debido a que el análisis estadístico concluye que las diferencias fueron significativas entre temperaturas. Evaluar el valor de k_{La} en dos temperaturas diferentes no da la información suficiente para incluir al efecto de la temperatura en los modelos empíricos pero ayuda a visualizar el efecto de este parámetro al trabajar en condiciones típicas de laboratorio para el crecimiento de microorganismos. La temperatura afecta la solubilidad de oxígeno y otras características fisicoquímicas del fluido, como la viscosidad, la densidad, la tensión superficial y la difusividad de los gases, que se relacionan con la resistencia del oxígeno para atravesar la interfase gas-líquido, donde la difusividad del oxígeno tiene un papel principal. Se ha visto que el k_{La} incrementa con la temperatura; debido a un aumento directo en la velocidad de difusión de oxígeno hacia la fase líquida, e indirecto al disminuir la viscosidad (Veglio *et al.*, 1998; Vogelaar *et al.*, 2000).

6.3. Cultivos de *E. coli* en matraces con agitación acústica y orbital

6.3.1. Cultivos no inducidos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD en matraces con agitación acústica y orbital

Se estudió el efecto de dos sistemas diferentes de agitación de matraces sobre cultivos no inducidos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD en cuanto a crecimiento bacteriano, consumo de glucosa, perfiles de oxígeno disuelto y pH, así como la producción de ácidos orgánicos. Primero seleccionamos condiciones ordinarias de operación para crecer cultivos de bacterias en matraces agitados de 500 mL, con tapones de algodón, 20% de volumen de llenado y una velocidad de agitación de 200 rpm (Henzler y Schedel, 1991; Veglio *et al.*, 1998; Mrotzek *et al.*, 2001). Estas condiciones corresponden a un valor de k_{La} de 46 h^{-1} , como se midió previamente (Figura 6.1E). Se trabajó también a una velocidad de agitación superior: 350 rpm, que es la mayor velocidad a la que se pudo operar la agitadora (New Brunswick Scientific C251, Eppendorf, Inc. CT, USA) sin desbalancearse; a esta velocidad el valor de k_{La} fue de 92 h^{-1} (Figura 6.1E). La comparación entre los sistemas de agitación RAMbio y orbital se realizó ajustando las velocidades de agitación en cada sistema para lograr valores iniciales equivalentes de k_{La} (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Condiciones operacionales y parámetros cinéticos representativos de los cultivos de *E. coli*. Se muestra la media y la desviación estándar de al menos dos cultivos independientes.

	RAMbio	Orbital	RAMbio	Orbital
n_e, n	5 g	200 rpm	10 g	350 rpm
k_{La}^* (h^{-1})	45.7±0.8	46.2±1.9	93.8±4.6	91.1±4.7
μ (h^{-1})	0.46±0.01	0.46±0.00	0.36±0.02	0.46±0.01
D.O. final (u.a. 600 nm)	4.3±0.2	4.3±0.4	5.2±0.2	4.6±0.3
$Y_{x/gluc}$ (g células/g gluc)**	0.31±0.01	0.32±0.00	0.59±0.05	0.38±0.00
q_s (g gluc/g células.h)	1.53±0.09	1.47±0.02	0.60±0.03	1.23±0.02
$Y_{ac/x}$ (g ac/g células)**	1.31±0.01	1.48±0.06	0.82±0.15	0.99±0.05
q_p (g ac/g células.h)	0.61±0.01	0.69±0.03	0.29±0.04	0.46±0.01
T (h), OD→0%	5.0±0.2	15.0±1.7	0	4.4±0.5
pH final	5.30 ±0.01	5.34±0.01	5.46±0.03	5.39±0.03

* Valores experimentales ($V_M=500\text{mL}$; $V_F=20\%$ volumen de agua desionizada; $T=37^\circ\text{C}$), se muestra la media y la desviación estándar de al menos tres repeticiones.

**Calculados a las 10 h de cultivo (Figura 6.7).

En este trabajo descartamos cualquier efecto sobre el k_{La} debido a la composición del medio, considerando que los valores de k_{La} inicial son similares a los medidos en el sistema agua-aire. Sin embargo, cuando se trabaja con medios complejos, fluidos no-newtonianos o cultivos de alta densidad, se deben hacer correcciones pertinentes que tomen en cuenta las propiedades fisicoquímicas del cultivo (principalmente la difusividad de oxígeno y la viscosidad). El k_{La} de un sistema microbiano puede variar respecto al obtenido en soluciones acuosas. En términos de la descripción global de la transferencia de masa dentro de un biorreactor, el sistema aire-agua es un modelo apropiado (Maier y Büchs, 2001). En general, con el medio de cultivo, k_L tiende a disminuir debido a la reducida difusividad del oxígeno. Del mismo modo, el área de transferencia gas-líquido disminuye cuando se favorece la coalescencia en presencia de electrolitos y otros componentes del medio. Sin embargo, la transferencia de oxígeno en matraces (sin baffles) orbitalmente agitados no se ve afectada por la coalescencia. De hecho, la formación de la película en las paredes del matraz promueve inherentemente el suministro de oxígeno para los microorganismos con viscosidades moderadas y elevadas (Giese *et al.*, 2014). En este sentido, el efecto de la composición del medio sobre la transferencia de oxígeno en el sistema de agitación RAMbio, debe simular el estudiado en reactores de tanque agitado o columnas de burbujeo. El efecto de la viscosidad sobre el k_{La} se ha estudiado, por ejemplo, en cultivos creciendo en un biorreactor airlift variando las concentraciones de pulpa de papel y de CMC (carboximetil celulosa). Se observó que el efecto de la viscosidad sobre el k_{La} puede ser despreciable cuando las viscosidades son relativamente bajas (CMC 0.18% y pulpa de papel hasta 10 g/L). La presencia de iones tampoco impactó negativamente al k_{La} (0.05 M de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ + 0.1 M de NaCl) (Bai *et al.*, 2001).

El desarrollo de los cultivos de *E. coli* en matraces agitados con un k_{La} inicial equivalente a 46 h^{-1} se presentan la Figura 6.7 A-D, y los parámetros cinéticos representativos se resumen en la Tabla 6.2. Después de 23 h de cultivo se encontraron valores similares de biomasa final, el consumo total de la glucosa y las mismas concentraciones de acetato acumulado. En general, no se encontraron diferencias en el desarrollo global de los cultivos (Tabla 6.2). Por lo tanto, establecer las mismas capacidades de aireación para cada sistema de agitación de matraces, en términos del k_{La} inicial (46 h^{-1}), nos permitió desarrollar cultivos reproducibles de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD.

Los perfiles de oxígeno disuelto muestran el desarrollo de periodos limitados por oxígeno (OD=0%) durante los cultivos. Sin embargo, dicho periodo fue más corto en los cultivos crecidos en el sistema RAMbio en comparación al sistema de agitación orbital (Figura 6.7C, Tabla 6.2). La caída del perfil de oxígeno disuelto de los matraces con agitación orbital podría indicar diferencias en las fases adaptativas de crecimiento, pero ese no fue el caso como se observa en la Figura 6.7A. Una explicación adecuada a los diferentes perfiles de oxígeno disuelto es la capacidad incrementada del sistema RAMbio y los tapones Oxpump para reabastecer la fase gaseosa con aire fresco, y asegurar durante todo el cultivo un valor máximo de la presión parcial de oxígeno en el espacio de cabeza del matraz, logrando de esta manera una mayor OTR.

Cultivos previos de *E. coli* K12 expresando GFP en matraces agitados por el sistema de resonancia acústica lograron una mayor velocidad específica de crecimiento (20% superior), así como mayor concentración de biomasa final (hasta un 300% más, en matraces con 40% de llenado con medio de cultivo) y mayor producción de proteína recombinante (medida como expresión específica de GFP), comparados con cultivos crecidos con agitación orbital, si bien esta comparación careció de un enfoque que estableciera las mismas capacidades de aireación/agitación para cada sistema (Applikon Biotechnology®, 2013). Con los modelos empíricos aquí propuestos es posible predecir los valores de k_{La} en el trabajo mencionado; para el sistema RAMbio sería de 333.4 h^{-1} ($V_F=20\%$, $n_g=20 \text{ g}$ a 37°C , asumiendo $V_N=250 \text{ mL}$ con un diámetro correspondiente de $d=82 \text{ mm}$). Por otro lado, el valor de k_{La} en el matraz con agitación orbital sería de 70.7 h^{-1} (con el modelo propuesto por Klöckner y Büchs (2012); $n=400 \text{ rpm}$; $d_0=19.05 \text{ mm}$ considerando el mismo matraz). Con base en lo anterior, es predecible que la OTR fuera superior en el sistema de agitación por resonancia acústica donde el perfil de oxígeno disuelto solo cayó brevemente pero se mantuvo siempre por encima de 20% sat. aire; en comparación a la agitación orbital, donde el oxígeno disuelto cayó precipitadamente hasta un 0% y se mantuvo así durante hasta que el crecimiento se detuvo, 24 h después de inocular.

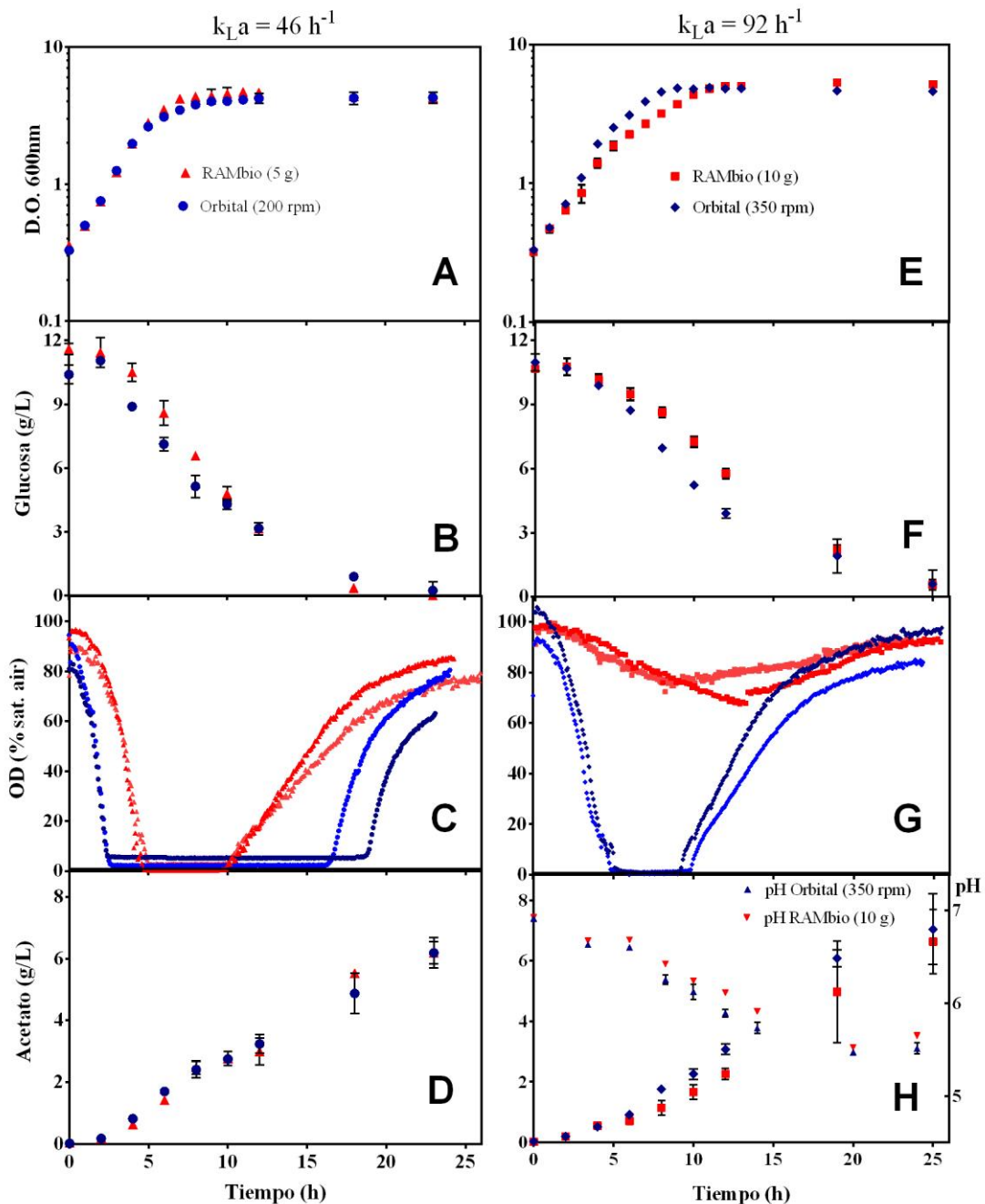


Figura 6.7. Desarrollo de los cultivos no inducidos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD crecidos en matraces agitados por resonancia acústica y orbital, a dos valores equivalentes de k_{La} inicial (46 y 92 h^{-1}) Tabla 6.2; (A), (E) Cinética de crecimiento; (B), (F) consumo de glucosa; (C), (G) perfiles de oxígeno disuelto (D) acumulación de acetato, y (H) acumulación de acetato y caída de pH. Las condiciones de operación fueron: $V_N=500 \text{ mL}$, $V_F=20\%$ (100 mL de medio SM) a 37°C . Se muestran la media y la desviación estándar de al menos dos repeticiones independientes de los datos de concentración de biomasa, glucosa, acetato y pH. En los perfiles de oxígeno disuelto se muestran dos tendencias típicas.

En la Figura 6.7E-H se observa el desarrollo de los cultivos de *E. coli*, para los que se ajustó un valor equivalente de k_{La} inicial a 92 h^{-1} en cada sistema de agitación (Tabla 6.2). Luego de 25 h se registraron valores similares de las concentraciones de biomasa, glucosa y acetato. Los perfiles de pH son consecuencia de la producción de ácidos orgánicos, particularmente acetato, conforme incrementó la producción y excreción de acetato el pH disminuyó en consecuencia (Figura 6.7H). La caída de pH indica que la capacidad amortiguadora del medio fue superada (Kunze *et al.*, 2011). Cabe mencionar que no se detectó en el sobrenadante lactato, oxalato, malato ni formato en ninguna condición; y a pesar de que se detectaron bajas concentraciones de succinato, el método analítico no permitió una resolución adecuada para su cuantificación. La concentración de citrato se mantuvo cercana a 1 g/L durante todo el cultivo (Anexo 3).

Los perfiles de oxígeno disuelto fueron diferentes: para el caso de los matraces agitados en el sistema RAMbio el oxígeno disuelto se mantuvo siempre por encima del 65% sat. aire, mientras que los cultivos con agitación orbital agotaron el oxígeno disuelto durante 4-5 h (OD=0% sat. aire; Figura 6.7G). Como se propuso para la Figura 6.7C, las diferencias pueden explicarse con una transferencia de gases activa y diferencial a través de los tapones Oxympump, comparada a la difusión pasiva que se da con los tapones de algodón. Como se describe en la sección 2.1.2, Mrotzek y colaboradores (2001) reportaron una disminución en el intercambio de gases entre el matraz y la atmósfera de los alrededores (medida como la difusividad del CO_2 a través de tapón) de entre el 25 y el 38% empleando tapones de algodón con una densidad de $0.06\text{-}0.25 \text{ g/cm}^3$. La condición limitante de la difusión a través del tapón se incrementa cuando la actividad respiratoria del microorganismo es alta y en consecuencia se trabaja a mayores valores de OTR, por ejemplo, incrementando las velocidades de agitación. Además, la reducción en las velocidades específicas de crecimiento (cerca de un 20%) y consumo de glucosa (alrededor del 50%) de los cultivos con agitación acústica, se asocia con una menor demanda de oxígeno, lo que contribuye con el perfil de oxígeno disuelto resultante.

La desaceleración del crecimiento y el comienzo de la fase estacionaria (Figura 6.7A, E) no están relacionados directamente a limitación de glucosa (Figura 6.7B, F). Sin embargo, se encuentran asociados con la acumulación de acetato (Figura 6.7D, H) y la limitación de oxígeno (Figura 6.7C, G). Es sabido que concentraciones de acetato desde $0.5\text{-}2.0 \text{ g/L}$

disminuyen la velocidad de crecimiento en *E. coli* que pueden detener la producción de biomasa y proteína, se ha visto que este metabolito inhibe la producción de proteína en mayor medida en cepas recombinantes (Åkesson *et al.*, 1999; Shiloach y Fass, 2005; Eiteman y Altman, 2006). Concentraciones de acetato superiores a 0.5 g/L se detectaron después de las 4 h de cultivo, alcanzando hasta 6 g/L al final del cultivo, en todas las condiciones de agitación, (incluyendo los cultivos donde $k_{La}=46h^{-1}$).

El incremento en la concentración de acetato como único metabolito excretado al medio, y la consecuente caída de pH, comienza y se mantiene cuando aún hay oxígeno disponible, esto se observa al comparar los perfiles de oxígeno disuelto y la acumulación de acetato en todas las condiciones evaluadas (Figuras 6.7C-D, G-H). La producción de acetato en cultivos aerobios de *E. coli* ocurre a velocidades altas de crecimiento y/o altas velocidades de consumo de glucosa (Åkesson, *et al.*, 1999; Eiteman y Altman, 2006) y se ha propuesto que es causada por el desequilibrio entre el consumo de glucosa, la energética celular y los flujos de biosíntesis, principalmente con glucosa como fuente de carbono (Losen *et al.*, 2004; Valgepea *et al.*, 2010). Durante el sobreflujo metabólico, y a pesar de las condiciones aerobias, la formación de acetato se relaciona con la velocidad de consumo de oxígeno y no es dependiente de su disponibilidad. Lo cual quiere decir que aunque el suministro de oxígeno dentro del biorreactor sea rápido, *E. coli* solo puede consumirlo a una velocidad máxima (Eiteman y Altman, 2006). En niveles intermedios de aerobiosis, los procesos fermentativos y la respiración coexisten, y al incrementar la disponibilidad de oxígeno las células incrementan gradualmente la respiración para la regeneración del poder reductor (Bettenbrock *et al.*, 2014).

En general el incremento del suministro de oxígeno junto a los valores iniciales de k_{La} de 46 a 92 h^{-1} logró disminuir las productividades específicas de acetato y los rendimientos acetato-biomasa (Tabla 6.2, Figuras 6.10C, E), pero estas respuestas fueron diferenciales en cada sistema de agitación. Como se mencionó anteriormente el suministro de oxígeno en el sistema RAMbio mostró ser superior al del sistema orbital cuando se ajustó el k_{La} a 92 h^{-1} ; a pesar de ello, se observó una disminución significativa en las velocidades específicas de crecimiento y consumo de glucosa (Tabla 6.2, Figuras 6.10A, B). Tal reducción puede relacionarse a un efecto desencadenado por los valores altos de oxígeno disuelto que se

mantienen durante el cultivo y/o la intensidad de la resonancia generada por el sistema acústico.

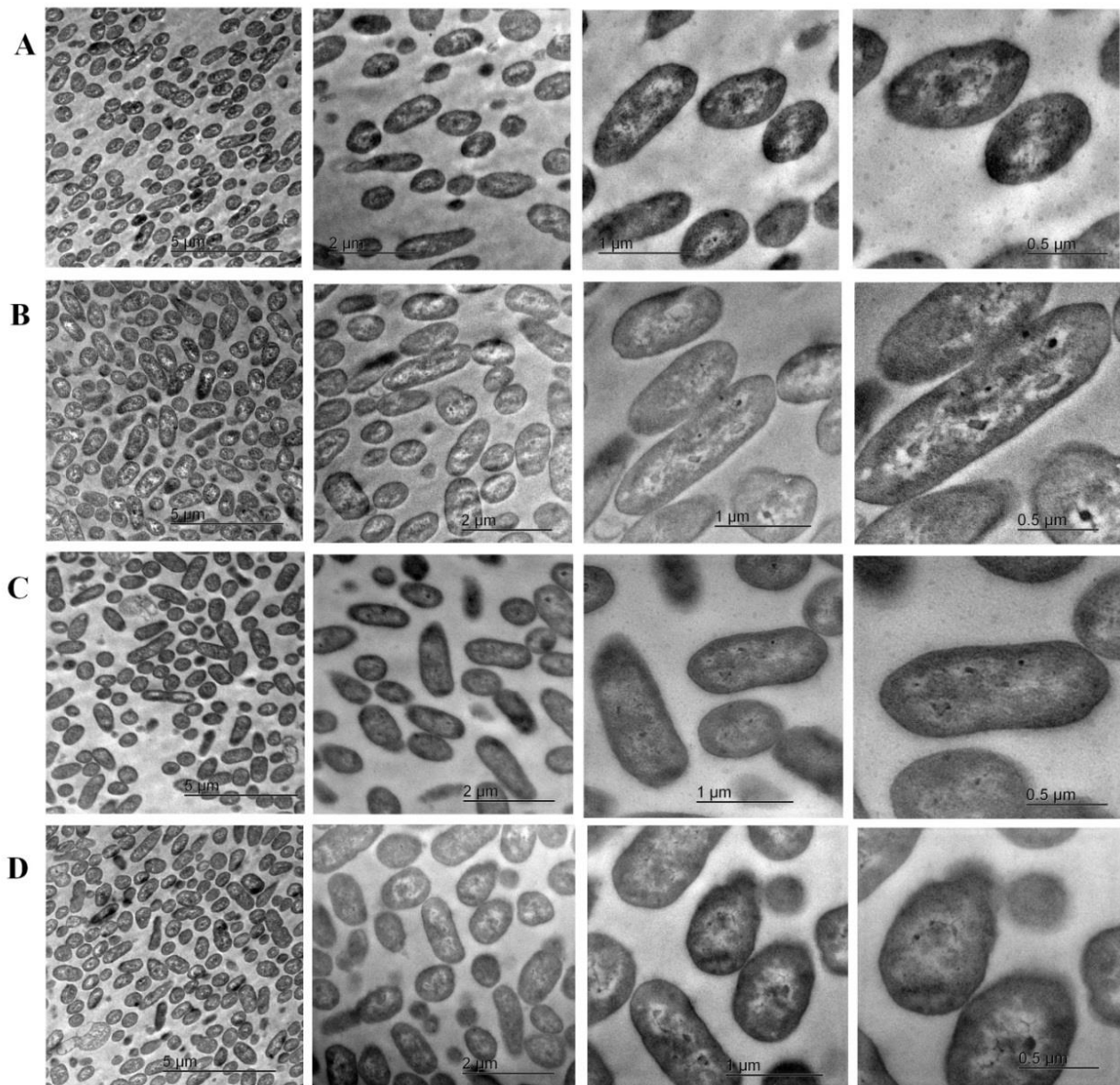


Figura 6.8. Cortes transversales de las células de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD (cultivos sin inducir) vistas con microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se observan células en fase exponencial de un cultivo en matraces agitados por el sistema RAMbio a dos valores de $k_L a$ inicial (A) 46 h^{-1} (5 g) y (B) 92 h^{-1} (10 g); y con agitación orbital a (C) 46 h^{-1} (200 rpm) y (D) 92 h^{-1} (350 rpm). Los cultivos se crecieron en medio SM a 37°C (Figura 6.7) (barras de escala de 5.0, 2.0, 1.0 y 0.5 μm).

Hasta el momento se desconoce el efecto que la agitación por resonancia acústica pueda tener sobre las células. En este trabajo se tomaron muestras de las bacterias durante la fase exponencial de crecimiento (Figura 6.7A, E) y se observaron con microscopía de transmisión electrónica (TEM). Fotos representativas de las microscopías se muestran en la Figura 6.8, donde no hay diferencias visibles entre la morfología microscópica de *E. coli* creciendo en cada condición de agitación evaluada. La medición del tamaño de las células puede cuantificar diferencias, en caso de que las hubiera, entre los cultivos crecidos en cada sistema de medición, para esto se requiere tomar más fotografías mediante TEM y realizar un análisis de las imágenes. En este sentido, la citometría de flujo permite medir el tamaño de las células y evaluar otros parámetros como la permeabilidad de membrana en poblaciones celulares (Hewitt *et al.*, 1998; Hewitt *et al.*, 2000).

6.3.2. Efecto de los tapones Oxypump sobre el desarrollo de los cultivos no inducidos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD en matraces con agitación acústica

Se realizaron cultivos de *E. coli* usando tapones Oxypump con el movimiento de fuelle cancelado (Figura 5.1B) con el fin de evaluar el efecto de la transferencia activa de gases a través del tapón en el desempeño del cultivo bacteriano. Los cultivos de *E. coli* se incubaron en el sistema RAMbio a una velocidad de agitación de 10 g bajo las mismas condiciones que los experimentos anteriores (Sección 6.3.1). El valor de k_{La} en los matraces agitados usando los tapones modificados fue el mismo que el de los matraces con los tapones Oxypump sin modificar (Anexo 4) $96.1 \pm 3.4 \text{ h}^{-1}$ (Tabla 6.3). Los resultados se muestran en la Figura 6.9A-D donde se observa el crecimiento, el consumo de glucosa, y los perfiles de oxígeno disuelto y pH en comparación con los cultivos realizados bajo las mismas condiciones usando los tapones Oxypump sin modificación que se mostraron en la Figura 6.7E-H. Los principales parámetros se muestran en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3. Condiciones operacionales y parámetros cinéticos representativos de los cultivos de *E. coli* creciendo en el sistema de agitación RAMbio a 10 g usando el tapón Oxypump con y sin modificación. Se muestra la media y la desviación estándar de al menos dos cultivos independientes.

	Tapón Oxypump	Oxypump modificado
k_{La}^* (h^{-1})	93.8±4.6	96.1±3.4
μ (h^{-1})	0.36±0.02	0.49±0.01
D.O. final (u.a. 600 nm)	5.2±0.2	5.2±0.4
$Y_{x/gluc}$ (g células/g gluc)**	0.59±0.05	0.52±0.00
q_s (g gluc/g células.h)	0.60±0.03	0.95±0.02
T (h), OD→0%	0	0
pH final	5.46±0.03	5.84±0.09

* Valores experimentales ($V_M=500\text{mL}$; $V_F=20\%$ volumen de agua desionizada; $T=37^\circ\text{C}$), se muestra la media y la desviación estándar de al menos tres repeticiones.

**Calculados a las 10 h de cultivo (Figura 6.9).

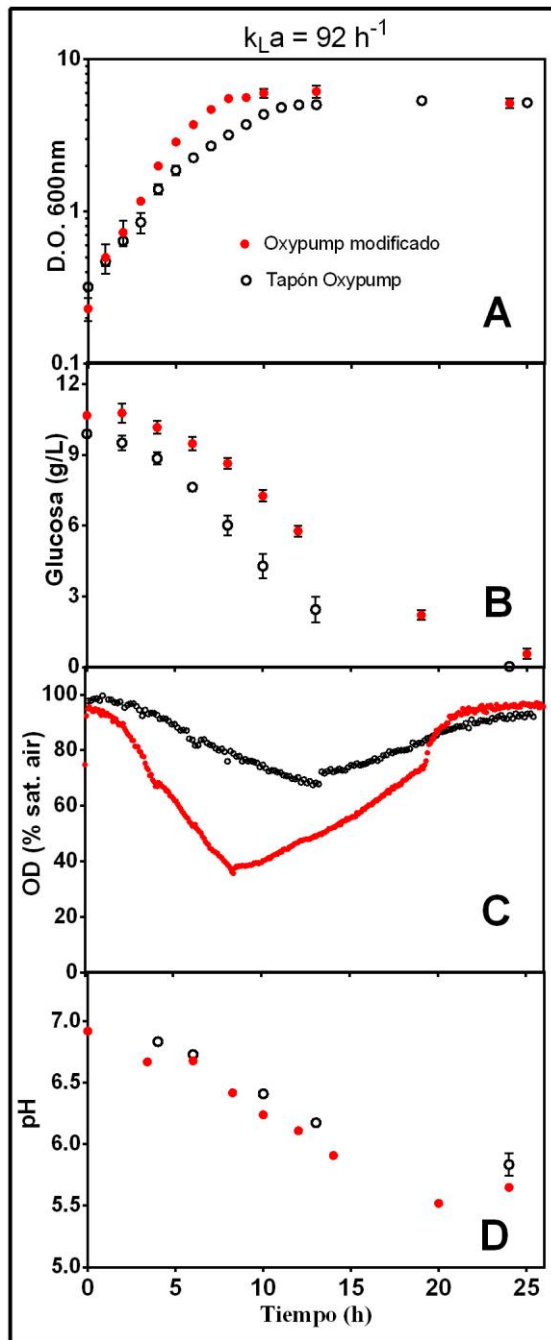


Figura 6.9. Desarrollo de los cultivos no inducidos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD crecidos en matraces agitados por el sistema RAMbio a 10 g usando tapones Oxypump normales y modificados a un k_{La} inicial de 92 h^{-1} . (A) Cinética de crecimiento; (B) consumo de glucosa; (C) perfil de oxígeno disuelto y (D) caída de pH. Las condiciones de operación fueron: $V_N=500 \text{ mL}$, $V_F=20\%$ (100 mL de medio SM) a 37°C . Se muestran la media y la desviación estándar de al menos dos repeticiones independientes de los datos de concentración de biomasa, glucosa y pH. Para el oxígeno disuelto se muestra el perfil de una tendencia típica.

Resulta interesante que los cultivos crecidos con el tapón modificado tuvieron velocidades específicas de crecimiento, consumo de glucosa y rendimiento biomasa-glucosa similares a los cultivos con agitación orbital (Figura 6.10A, B, D). Los perfiles de oxígeno disuelto muestran diferencias, el oxígeno disuelto llegó a valores más bajos, hasta un 35% sat. aire mientras que con los tapones Oxypump el oxígeno disuelto se mantuvo siempre por encima de 65% sat. aire (Figura 6.7G). Este resultado hace evidente que la transferencia de gases es activa a través del tapón Oxypump y permite una rápida reposición de la fase gaseosa en el espacio de cabeza del matraz.

El resultado concuerda con la discusión previa de la limitación a la transferencia mediante difusión pasiva que se da en los matraces con tapones de algodón. El oxígeno disuelto disminuye mientras las bacterias crecen donde el oxígeno disponible juega un papel importante en su metabolismo. La relación del oxígeno disuelto con el crecimiento se ha visto con anterioridad, por ejemplo, en un reporte previo donde se mantuvo la TOD durante el cultivo a diferentes valores (0, 50, 100% sat. aire), los resultados mostraron efectos impredecibles a valores altos de TOD durante cultivos de 4 cepas de *E. coli* JM101/pY EJ001 y TB-1/pY EJ001 (expresando cloranfenicol acetiltransferasa), y las cepas TB-1/p 1034 y TB-1/pUC 19 (expresando β -galactosidasa), en cuanto a la velocidad específica de crecimiento, la estabilidad y contenido de los plásmidos y la producción de proteína recombinante (Li *et al.*, 1992).

El comportamiento de los cultivos de *E. coli* creciendo en el sistema de agitación RAMbio con un k_{La} inicial de 92 h^{-1} parece estar asociado a las altas concentraciones de oxígeno disuelto que se mantienen a lo largo del cultivo, como se explicó anteriormente la célula enfrenta una condición de sobreflujo metabólico, la disminución en la velocidad de crecimiento podría relacionarse con la carga energética adicional generada a partir de tensiones de oxígeno superiores al 65%.

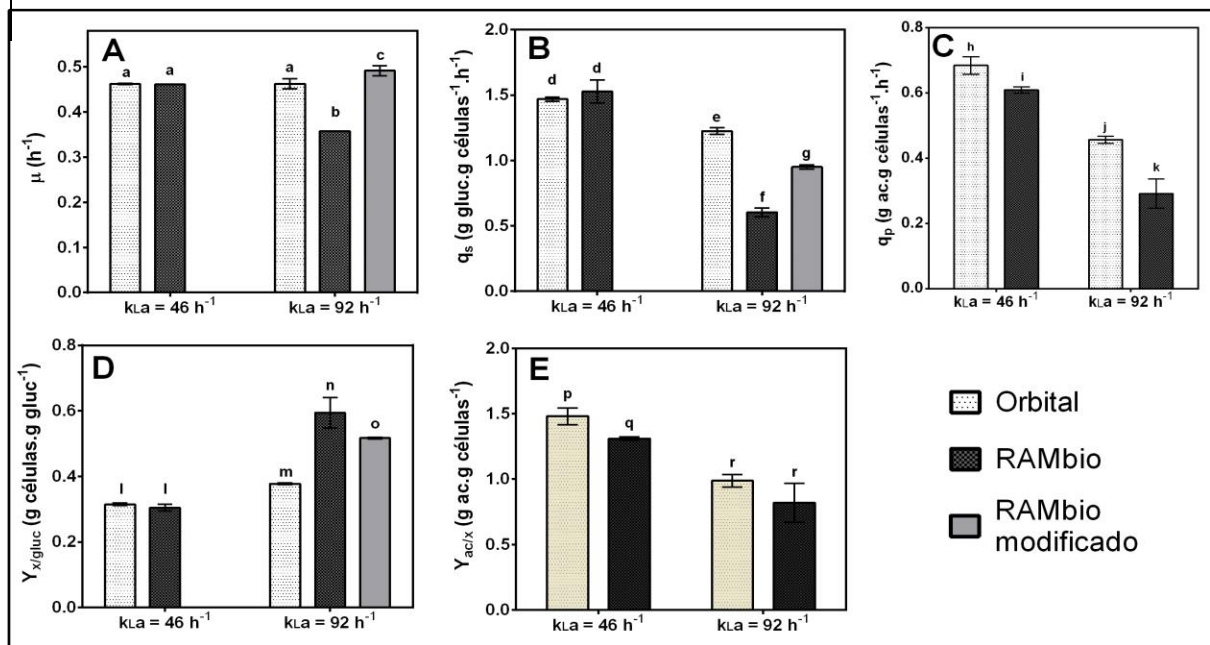


Figura 6.10. Comparación de los parámetros cinéticos de los cultivos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD crecidos en matraces agitados en los sistemas RAMbio, orbital, y RAMbio utilizando los tapones Oxypump modificados; a dos valores equivalentes de k_{La} (46 y 92 h^{-1}). (A) Velocidad específica de crecimiento (fase de crecimiento exponencial); además se muestran (B) velocidad específica de consumo de glucosa, (C) velocidad específica de producción de acetato, (D) rendimiento biomasa glucosa y (E) rendimiento acetato-biomasa calculados a las 10 h de cultivo (Figura 6.7). Las condiciones de operación fueron: tamaño nominal de matraz 500 mL con 20% de volumen de llenado (100 mL de medio SM) a 37°C . Se muestran la media y la desviación estándar de al menos dos repeticiones independientes. De acuerdo al análisis estadístico las letras diferentes indican diferencias significativas: $0.01 < P < 0.05$,

6.3.3. Efecto de la velocidad de agitación sobre los cultivos no inducidos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD en matraces con agitación acústica

Incrementar la velocidad de agitación de los cultivos que se crecieron con agitación por resonancia acústica de 5 a 10 g resultó en una reducción de la velocidad específica de crecimiento (Tabla 6.2, Figura 6.10A), la velocidad específica de consumo de glucosa (Figura 6.10B), la producción específica de acetato (Figura 6.10C) y el rendimiento acetato-biomasa (Figura 6.10E); acompañado de mayores valores del rendimiento biomasa-glucosa (Figura 6.10D). El reducido desempeño parece estar relacionado con los valores altos de oxígeno disuelto que a su vez indican altas OTR (Sección 6.3.2). Sin embargo, podrían relacionarse a los patrones hidrodinámicos, como hemos discutido antes al trabajar con matraces agitados los fenómenos de transferencia de masa y momento son difíciles de aislar (Veglio *et al.*, 1998; Marín-Palacio *et al.*, 2014).

Tabla 6.4. Condiciones operacionales y parámetros cinéticos representativos de los cultivos de *E. coli*. Creciendo en el sistema de agitación RAMbio a 12.5 g. Se muestra la media y la desviación estándar de al menos dos cultivos independientes.

	10 g	12.5 g
$k_L a^*$ (h^{-1})	93.8±4.6	94.3±3.4
μ (h^{-1})	0.36±0.02	0.51±0.05
D.O. final (u.a. 600 nm)	5.2±0.2	4.9±0.5
$Y_{x/gluc}$ (g células/g gluc)**	0.59±0.05	0.40±0.02
q_s (g gluc/g células.h)	0.60±0.03	1.29±0.19
T (h), OD→0%	0	0
pH final	5.46±0.03	5.71±0.16

* Valores experimentales ($V_M=1000$ mL; $V_F=45\%$ volumen de agua desionizada; $T=37^\circ C$), se muestra la media y la desviación estándar de al menos tres repeticiones.

**Calculados a las 10 h de cultivo (Figura 6.11).

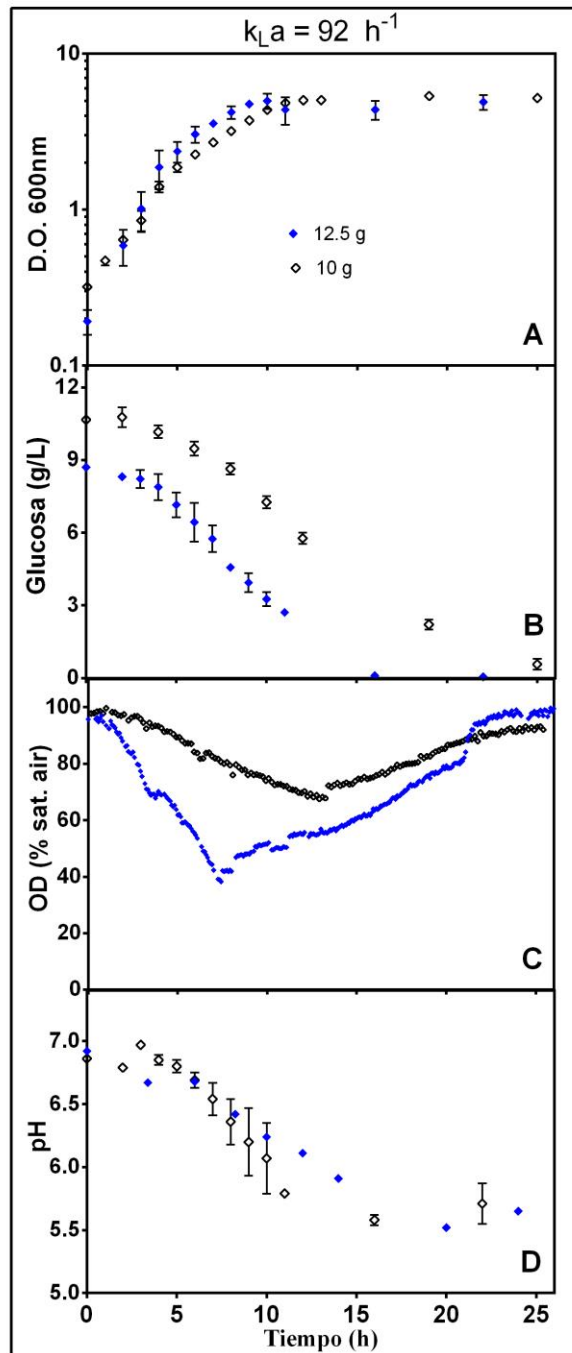


Figura 6.11. Desarrollo de los cultivos no inducidos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD crecidos en matraces agitados por el sistema RAMbio a diferentes velocidades de agitación (10 y 12.5 g) con un valor equivalente de $k_L a$ inicial (92 h^{-1}). **(A)** Cinética de crecimiento; **(B)** consumo de glucosa; **(C)** perfil de oxígeno disuelto y **(D)** caída de pH. Las condiciones de los cultivos fueron de $V_N=1000 \text{ mL}$, $V_F=45\%$ (450 mL de medio SM) a 37°C . Se muestran la media y la desviación estándar de al menos dos repeticiones independientes de los datos de concentración de biomasa, glucosa y pH. Para el perfil de oxígeno disuelto se muestra una tendencia típica.

Se realizaron cultivos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD creciendo en el sistema RAMbio a una valor de k_{La} similar al de los experimentos anteriores ($94.3 \pm 3.4 \text{ h}^{-1}$), variando las condiciones para operar a un valor de agitación más elevado (12.5 g), con el fin de separar el fenómeno de la transferencia de masa y evaluar únicamente el impacto de la intensidad de agitación sobre los cultivos y el flujo hidrodinámico generado; la estrategia fue cambiar la relación A/V usando matraces de 1000 mL con $V_F=45\%$. La Tabla 6.4 resume los parámetros cinéticos de crecimiento y consumo de glucosa, que no difieren de los que se obtuvieron en el sistema orbital (Tabla 6.2). El desarrollo cinético del cultivo mejoró en comparación a los cultivos creciendo a 10 g (Figura 6.11A-D) en términos de la velocidad de crecimiento y consumo de glucosa. No se encontraron diferencias significativas en las mediciones de pH. Por otro lado, los perfiles de oxígeno disuelto muestran valores una caída más pronunciada, lo cual es de esperarse debido a la disminución proporcional del volumen de gas en el espacio de cabeza del matraz, respecto al volumen de llenado del cultivo. En consecuencia, no se observaron efectos negativos asociados al estrés hidrodinámico en las células de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD relacionados con la velocidad de agitación en el sistema RAMbio hasta de 12.5 g.

Se ha demostrado previamente que *E. coli* presenta alta resistencia al estrés mecánico, al someter un cultivo continuo en reactor agitado mecánicamente de *E. coli* W3110 en condiciones controladas de TOD (40% y 10% air. sat) manteniendo la aireación a un flujo de 1 vvm, e incrementando la velocidad de agitación del impulsor de 400 a 1200 rpm (de 1 a 30 kWm^{-3}) durante 7 h; el único efecto observado mediante SEM se dio sobre la capa exterior de polisacáridos, resultado que fue corroborado mediante análisis de TEM y citometría de flujo (Hewitt *et al.*, 1998).

En general el papel que juegan los patrones hidrodinámicos y la distribución de nutrientes alrededor de las células sobre las respuestas celulares no se consideran relevantes cuando se trabaja a pequeña escala y el sistema es homogéneo. Sin embargo, se ha demostrado que la turbulencia favorece el desempeño de cultivos de *E. coli*, mediante la técnica de velocimetría por imágenes de partículas (PIV) para cuantificar los gradientes de velocidad en un reactor cuadrado de rejilla oscilante (cámara cuadrada de Plexiglas $50 \times 50 \times 47$ cm con una rejilla con unas barras de $48 \times 1.3 \times 1.3$ cm oscilando verticalmente a diferentes frecuencias $f=1-6$ Hz) (Al-Homoud y Hondzo, 2008). Los autores midieron diferentes

velocidades de crecimiento ($0.02-0.11 \text{ h}^{-1}$), de consumo de glucosa ($4.2-8.0 \times 10^{-6} \text{ mM gluc.célula}^{-1}.\text{h}^{-1}$) y de consumo de oxígeno ($2.2-8.9 \times 10^{-8} \text{ mg O}_2.\text{célula}^{-1}.\text{h}^{-1}$) como una función de las diferentes velocidades de la energía de disipación en el sistema ($0-176.1 \times 10^{-6} \text{ m}^2.\text{s}^{-3}$); que aumentaron cuando se incrementaba la turbulencia y por lo tanto la energía de disipación se aceleraba. La respuesta celular observada, si bien indicaba mayor crecimiento a mayores velocidades de energía de disipación, estuvo en función del oxígeno disponible, ya que los cultivos estuvieron limitados por este nutriente en todas las condiciones, aumentar la turbulencia favoreció los parámetros evaluados debido al incremento en la OTR del sistema (Al-Homoud y Hondzo, 2008).

En reportes previos se concluyó que el desempeño biológico de cultivos de bacterias y levaduras debido a las variaciones en la intensidad de la agitación/aeración no se pueden atribuir a estrés hidrodinámico asociado con la turbulencia generada por los impulsores o las burbujas reventadas, la estimación de los eddies de Kolmogoroff en la microescala sugieren los microorganismos son aun más pequeños (Nienow, 2009). En el caso de la tecnología RAM, los eddies a microescala se asumen tener un tamaño de alrededor de $50 \mu\text{m}$ (Howe *et al.*, 2011), que es un tamaño superior al de las bacterias (*E. coli* mide alrededor de $2-5 \mu\text{m}$ de largo, Figura 6.8). *E. coli* presenta alta resistencia al estrés hidrodinámico lo que concuerda con los cultivos realizados en este trabajo donde no se observaron efectos negativos por la intensidad de la resonancia generada por el sistema de agitación RAMbio.

6.3.4. Cultivos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) en matraces con agitación acústica y orbital

En este trabajo se utilizó la cepa *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD como modelo para estudiar el efecto del suministro de oxígeno en matraces agitados por el sistema RAMbio en comparación al orbital. También se realizaron cultivos usando la cepa parental *E. coli* BL21-Gold (DE3) sin transformar en ausencia de ampicilina en matraces agitados bajo las mismas condiciones que los experimentos anteriores (Sección 5.7) con un k_{La} de 92 h^{-1} (Figura 6.7E-H). La Tabla 6.5 resume los principales parámetros de dichos cultivos, y el desarrollo del crecimiento, el consumo de glucosa, y los perfiles de oxígeno disuelto y pH se muestran en la Figura 6.12A-D.

Tabla 6.5. Condiciones operacionales y parámetros cinéticos representativos de los cultivos de la cepa silvestre de *E. coli*. BL21-Gold (DE3). Se muestra la media y la desviación estándar de al menos dos cultivos independientes.

n_g, n	Orbital 350 rpm	RAMbio 10 g
k_{La}* (h⁻¹)	91.1±4.7	93.8±4.6
μ (h⁻¹)	0.69±0.02	0.73±0.06
D.O. final (u.a. 600 nm)	9.8±0.3	13.77±0.7
Y_{x/gluc} (g células/g gluc)**	0.48±0.01	0.61±0.02
q_s (g gluc/g células.h)	1.43±0.00	1.19±0.13
T (h), OD→0%	7.2	6.7±0.6
pH final	6.84±0.04	6.79±0.01

* Valores experimentales ($V_M=1000 \text{ mL}$; $V_F=45\%$ volumen de agua desionizada; $T=37^\circ\text{C}$), se muestra la media y la desviación estándar de al menos tres repeticiones.

**Calculados a las 10 h de cultivo (Figura 6.12).

El desempeño de los cultivos de la cepa sin transformar fue superior comparado al de la cepa transformada, se alcanzaron mayores velocidades específicas de crecimiento y consumo de glucosa, así como una mayor concentración celular (Tabla 6.5). En este caso, los cultivos disminuyeron la producción de biomasa cuando el oxígeno del cultivo se volvió limitante y se detuvieron cuando se agotó la glucosa en el medio (Figura 6.12A-C).

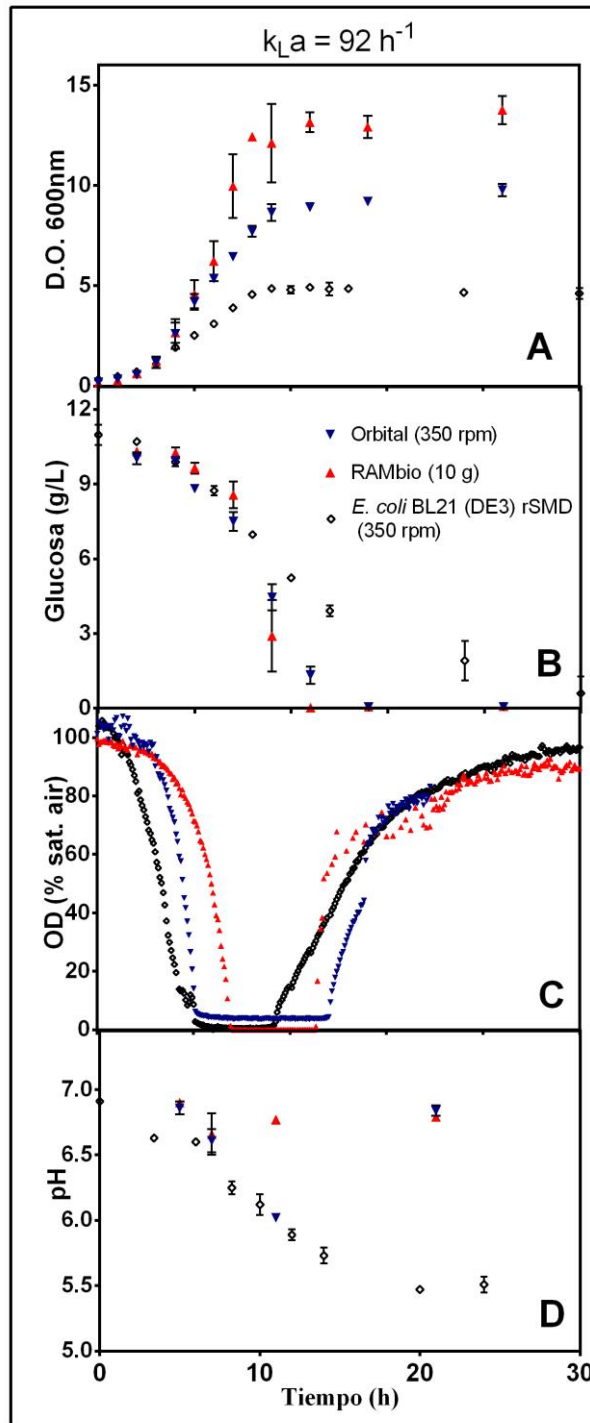


Figura 6.12. Desarrollo de los cultivos de la cepa silvestre de *E. coli* BL21-Gold (DE3) crecidos en matraces agitados por resonancia acústica y orbital, a un valor de k_La inicial de 92 h^{-1} Tabla 6.5; **(A)** Cinética de crecimiento; **(B)** consumo de glucosa; **(C)** perfiles de oxígeno disuelto y **(D)** perfil de pH. Las condiciones de operación fueron: $V_N=500 \text{ mL}$, $V_F=20\%$ (100 mL de medio SM) a 37°C . Se muestran la media y la desviación estándar de al menos dos repeticiones independientes de los datos de concentración de biomasa, glucosa, acetato y pH. En los perfiles de oxígeno disuelto se muestran tendencias típicas.

En concordancia, el crecimiento fue superior en el sistema RAMbio, asociado a un incremento en la capacidad del sistema para suministrar oxígeno (demostrada previamente). El pH se mantuvo cerca de la neutralidad durante todo el cultivo, lo que indica una disminuida o incluso nula producción y excreción de acetato, que junto al elevado rendimiento glucosa-biomasa, lleva a concluir que el consumo de glucosa se utilizó principalmente para el crecimiento.

En principio decidimos trabajar con las células no inducidas para evaluar el crecimiento no asociado a la producción de la proteína heteróloga. La inducción representa una fuerte carga metabólica adicional (Kunze *et al.*, 2011); la cepa estudiada sobreexpresa SMD de garrapata formando cuerpos de inclusión cuya estructura depende de condiciones operacionales como las variaciones de pH (Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014). En los cultivos de la cepa transformada bajo las condiciones evaluadas, usando el medio definido SM; se detectaron y cuantificaron altas concentraciones de acetato (6 g/L) que se produjo aún en condiciones de aerobiosis (Figura 6.7G). Lo anterior es consecuencia del sobreflujo metabólico en el que la célula consume oxígeno a una velocidad limitada independiente de la OTR del sistema (Eiteman y Altman, 2006), aumentar la oferta de oxígeno significó una disminución parcial en la producción de acetato (Figura 6.10 C, E). Por otra parte, la célula disminuyó su velocidad de crecimiento cuando se incrementó la oferta de oxígeno, posiblemente en relación a una demanda energética adicional (Figura 6.10A).

Se ha reportado la habilidad de las cepas B de *E. coli* para crecer en altas concentraciones de glucosa sin producir acetato (van de Walle y Shiloach, 1998; Phue y Shiloach, 2005), una sobrecarga metabólica debe abatir tal capacidad. Esto puede suceder si en la cepa utilizada presenta fuga en el sistema de expresión de rSMD en ausencia del inductor. Se corrieron geles SDS-PAGE y no se observó producción de la proteína heteróloga (Anexo 5). En el caso de la cepa de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD aún sin inducir, el estrés asociado con el mantenimiento del plásmido afectó el crecimiento (Nineow, 2009; Kunze, *et al.*, 2011). Esto indica que la carga metabólica que representa mantener el plásmido y sobrevivir a la presión de selección que impone la ampicilina en el medio promueve el desarrollo de sobreflujo metabólico, como se ha visto el efecto del acetato es mayor en cepas recombinantes (Eiteman y Altman, 2006).

Se ha reportado que *E. coli* B (BL21), a diferencia de la cepa *E. coli* K (JM109), consume glucosa de forma eficiente y acumula considerablemente menos acetato (Shiloach, 1998). Sin embargo, en los cultivos con la cepa *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD se acumularon cantidades significativas de acetato. Anteriormente, se ha reportado un comportamiento similar, donde al crecer *E. coli* B en glucosa controlando la TOD a diferentes valores, se acumuló menos acetato cuando se incrementaba la concentración de oxígeno disuelto: 10 g/L a 1% sat. aire y 4 g/L a 6% sat. aire, y se evitó la acumulación únicamente cuando la TOD se mantuvo a 30% sat. aire. El análisis de los genes expresados reveló una menor expresión de los genes que expresan las enzimas relacionadas con la actividad del TCA y otros genes asociados con las enzimas participantes en el metabolismo de la glucosa y el acetato, en consecuencia se incrementó la acumulación de acetato en la condición con el menor valor de TOD. Se observó que cuando la velocidad de crecimiento a partir de glucosa es alta y la concentración de oxígeno es limitada, se incrementa la formación de acetato. La disminución en la acumulación de acetato es el resultado de la transcripción constitutiva de los genes que codifican para las enzimas participantes en la vía del glioxilato, la gluconeogénesis y las vías anapleróticas. Los resultados actuales indican que la limitación de oxígeno supera este comportamiento de transcripción constitutiva (Phue y Shiloach; 2005).

Usar la cepa *E. coli* BL21-Gold (DE3) sin transformar cultivada en matraces agitados por dos sistemas diferentes, hace evidente las diferencias en el desempeño de los cultivos en función del suministro de oxígeno, la capacidad incrementada del sistema RAMbio para transferir oxígeno al cultivo, permitió que el crecimiento se favoreciera logrando una mayor velocidad específica de crecimiento y mayor concentración de biomasa final, así como un rendimiento biomasa-sustrato más elevado, en comparación a los cultivos que se agitaron de forma orbital.

7. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se propusieron modelos empíricos que sirven para predecir los valores de k_{La} en matraces agitados por dos sistemas diferentes: orbital y RAMbio en función de la velocidad de agitación y la relación A/V. Tal estimación es útil para seleccionar las condiciones operacionales que aseguren un suministro inicial de oxígeno acorde a la demanda del cultivo de interés.
- Se presenta por primera vez la caracterización del sistema de agitación RAMbio en términos del k_{La} , el equipo tiene la capacidad para lograr altas velocidades de transferencia de oxígeno lo que es útil para estudiar cultivos biológicos con demandas elevadas de oxígeno a nivel matraz.
- El k_{La} es un criterio adecuado para reproducir cultivos de *E. coli* en matraces con agitación en los sistemas RAMbio y orbital, mejorar la reproducibilidad requiere tomar en cuenta los efectos hidrodinámicos y los perfiles de la OTR a lo largo del cultivo.

8. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto del suministro de oxígeno en la producción de proteínas recombinantes, un ejemplo podría ser la misma rSMD presentada en este trabajo y la formación de cuerpos de inclusión en cultivos de *E. coli* BL21-Gold (DE3).
- Evaluar el efecto de la agitación por resonancia acústica en cultivos productores de exopolisacáridos que puedan modificar la reología del cultivo. Por ejemplo, usar *Azotobacter vinelandii* en función del suministro de oxígeno, sobre el crecimiento y producción de alginatos (exopolisacáridos) y acumulación intracelular de PHB (polihidroxibutirato).
- Ampliar el estudio sobre los coeficientes de transferencia de gases a través del tapón Oxypump.
- Desarrollar estudios del efecto de la viscosidad y variaciones geométricas sobre la transferencia de oxígeno en matraces agitados por el sistema RAMbio.
- Análisis de los patrones de hidrodinámicos generados en matraces con agitación en el sistema RAMbio con cámara de alta velocidad.
- Desarrollo de cultivos por lote alimentado en el sistema RAMbio.

9. REFERENCIAS

- Åkesson M, Karlsson EN, Hagander P, Axelsson JP, Tocaj A. (1999) On-line detection of acetate formation in *Escherichia coli* cultures using dissolved oxygen responses to feed transients. *Biotechnol Bioeng* 64:590-598
- Al-Homoud A, Hondzo M. (2008) Enhanced uptake of dissolved oxygen and glucose by *Escherichia coli* in a turbulent flow. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:643-655
- Anderlei T, Büchs J. (2001) Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochem Eng J* 7:157-162
- Anderlei T, Zangb W, Papaspyrou M, Büchs J. (2004) Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochem Eng J* 17:187-194
- Andersen KB, von Meyenburg K. (1980) Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? *J Bacteriol* 144(1):114-123
- Applikon Biotechnology® (2013) Improvement of culture growth and protein expression via use of Resonant Acoustic Mixing. Application note.
- Baeshen MN, Al-Hejin AM, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, Saini KS, Baeshen NA, Redwan EM. (2015) Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives. *J Microbiol Biotechnol* 25(7):953-962
- Baez A, Shiloach J. (2013) *Escherichia coli* avoids high dissolved oxygen stress by activation of SoxRS and manganese superoxide dismutase. *Microb Cell Fact* 12:23
- Bai F, Wang L, Huang H, Xu J, Caesar J, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M. (2001) Oxygen mass-transfer performance of low viscosity gas-liquid-solid system in a split-cylinder airlift bioreactor. *Biotechnol Lett* 23(14):1109-1113
- Bambot SB, Holavanahali R, Lakowicz JR, Carter GM, Rao G. (1994) Phase fluorometric sterilizable optical oxygen sensor. *Biotechnol Bioeng* 43:1139-1145
- Bettenbrock K, Bai H, Ederer M, Green J, Hellingwerf KJ, Holcombe M, Kunz S, Rolfe MD, Sanguinetti G, Sawodny O, Sharma P, Steinsiek S, Poole RK. (2014) Towards a systems level understanding of the oxygen response of *Escherichia coli*. *Adv Microb Physiol* 64:65-114
- Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B. (2000) Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. *Biotechnol Bioeng* 68(6):594-601
- Büchs J. (2001) Introduction of advantages and problems of shaken cultures. *Biochem Eng J* 7:91-98
- Büchs J, Lotter S, Milbradt C. (2001) Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochem Eng J* 7:135-141
- Castellanos-Mendoza A, Castro-Acosta RM, Olvera A, Zavala G, Mendoza-Vera M, García-Hernández E, Alagón A, Trujillo-Roldán MA, Valdez-Cruz NA. (2014) Influence of pH control in

the formation of inclusion bodies during production of recombinant sphingomyelinase-D in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 13:137

Demain AL, Vaishnav P. (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* 27:297-306

Diederichs S, Korona A, Staaden A, Kroutil W, Honda K, Ohtake H, Büchs J. (2014) Phenotyping the quality of complex medium components by simple online-monitored shake flask experiments. *Microb Cell Fact* 13:149

Dunn IJ, Heinzle E, Ingham J, Pfenosil JE. (2003) Biological Reaction Engineering, Second Edition, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany. 117-128

Eiteman MA, Altman E. (2006) Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends Biotechnol* 24(11):530-536

Fenn WO, Gerschman R, Gilbert DL, Terwilliger DE, Cothran FV. (1957) Mutagenic effects of high oxygen tensions on *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 43(12):1027-1032

Finn RK. (1954) Agitation-aeration in the laboratory and in industry. *Bacterial Rev* 18:254-274

Freedman D. (1970) The shaker in bioengineering. En: Norris JR, Ribbons DW (Eds.), *Methods in Microbiology* London: Academic Press. 175-185

Freyer SA, König M, Kunkel A. (2004) Validating shaking flasks as representative screening systems. *Biochem Eng J* 17(3):169-173

Gamboa-Suasnavart RA, Valdez-Cruz NA, Cordova-Davalos LE, Martínez-Sotelo JA, Servín-González L, Espitia C, Trujillo-Roldán MA. (2011) The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 kDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks. *Microb Cell Fact* 10:110

Gamboa-Suasnavart RA, Marín-Palacio LD, Martínez-Sotelo JA, Espitia C, Servín-González L, Valdez-Cruz NA, Trujillo-Roldán MA (2013) Scale-up from shake flasks to bioreactor, based on power input and *Streptomyces lividans* morphology, for the production of recombinant APA (45/47 kDa protein) from *Mycobacterium tuberculosis*. *World J Microbiol Biotechnol* 29:1421-1429

García-Ochoa F, Gómez E. (2009) Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnol Adv* 27 153-176

García-Ochoa F, Gómez E, Santos VE, Merchuk JC. (2010) Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview. *Biochem Eng J* 49:289-307

Ge X, Rao G. (2012) Real-time monitoring of shake flask fermentation and off gas using triple disposable noninvasive optical sensors. *Biotechnol Prog* 28(3):872-877

Giese H, Azizan A, Kümmel A, Liao A, Peter CP, Fonseca JA, Hermann R, Duarte TM, Büchs J. (2014) Liquid films on shake flask walls explain increasing maximum oxygen transfer capacities with elevating viscosity. *Biotechnol Bioeng* 111(2):295-308

Gupta A, Rao G. (2003) A study of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor. *Biotechnol Bioeng* 84:351-358

- Hansen S, Kensy F, Käser A, Büchs J. (2011) Potential errors in conventional DOT measurement techniques in shake flasks and verification using a rotating flexitube optical sensor. *BMC Biotechnol* 11:49
- Henzler HJ, Schedel M. (1991) Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures. *Bioprocess Eng* 7:123–131
- Hewitt CJ, Boon LA, McFarlane CM, Nienow AW. (1998) The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 59(5):612-620
- Hewitt CJ, Nebe-Von Caron G, Axelsson B, McFarlane CM, Nienow AW. (2000) Studies related to the scale-up of high-cell-density *E. coli* fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. *Biotechnol Bioeng* 70(4):381-390
- Howe HW, Warriner JJ, Cook AM, Coguill SL, Farrar LC. (2011) United States Patent: Method for resonant-vibratory mixing. No.: US 7,866,878 B2
- Humphrey A. (1998) Shake flask to fermentor: what have we learned?. *Biotechnol Prog* 14:3-7
- Imlay JA. (2009) Oxidative stress. En: Neidhardt FC (Ed.), *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. ASM Press 1-34
- Imlay JA. (2015) Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. *Curr Opin Microbiol* 24:124-131
- Klöckner W, Büchs J. (2011) Shake-Flask Bioreactors. En: Murray Moo-Young (Eds.), *Comprehensive Biotechnology*, Elsevier, (2.17):213-226
- Klöckner W, Büchs J. (2012) Advances in shaking technologies. *Trends Biotechnol* 30(6):307-314
- Klöckner W, Gacem R, Anderlei T, Raven N, Schillberg S, Lattermann C, Büchs J. (2013) Correlation between mass transfer coefficient $k_L a$ and relevant operating parameters in cylindrical disposable shaken bioreactors on a bench-to-pilot scale. *J Biol Eng* 7:28
- Kunze M, Huber R, Gutjahr C, Müllner S, Büchs J. (2011) Predictive tool for recombinant protein production in *Escherichia coli* shake-flask cultures using an on-line monitoring system. *Biotechnol Prog* 28(1):103-113
- Kunze M, Roth S, Gartz E, Büchs J. (2014) Pitfalls in optical on-line monitoring for high-throughput screening of microbial systems. *Microb Cell Fact* 13:53
- Ladner T, Flitsch D, Schlepütz T, Büchs J. (2015) Online monitoring of dissolved oxygen tension in microtiter plates based on infrared fluorescent oxygen-sensitive nanoparticles. *Microb Cell Fact* 14:161
- Lara AR, Vazquez-Limón C, Gosset G, Bolívar F, López-Munguía A, Ramírez OT (2006) Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and reduce formation of by-products during recombinant protein production under transient intermittent. *Biotechnol Bioeng* 94:1164-1175

Lara AR. (2011) Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10(2):209-223

Li X, Robbins JW Jr, Taylor KB. (1992) Effect of the levels of dissolved oxygen on the expression of recombinant proteins in four recombinant *Escherichia coli* strains. *J Ind Microbiol* 9(1):1-9

Liu T, Su G, Li J, Qi X, Zhan X. (2010) Numerical simulation of flow in erlenmeyer shaken flask, computational fluid dynamics. En: Hyung WO (Ed.), *Computational Fluid Dynamics*, InTech, (7):157-172

Liu YS, Wu JY, Ho Kp. (2006) Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochem Eng J* 27:331-335

Losen M, Frölich B, Pohl M, Büchs J. (2004) Effect of oxygen limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures. *Biotechnol Prog* 20:1062-1068

Mancilla E, Palacios-Morales CA, Córdova-Aguilar MS, Trujillo-Roldán MA, Ascanio G, Zenit R. (2015) A hydrodynamic description of the flow behavior in shaken flasks. *Biochem Eng J* 99:61-66

Maier U, Büchs J. (2001) Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochem Eng J* 7(2):99-106

Maier U, Losen M, Büchs J. (2004) Advances in understanding and modeling the gas-liquid mass transfer in shake flasks. *Biochem Eng J* 17:155-167

Marín-Palacio LD, Gamboa-Suasnavart RA, Valdez-Cruz NA, Servín-González L, Córdova-Aguilar MA, Soto E, Klöckner W, Büchs J, Trujillo-Roldán MA. (2014) The role of volumetric power input in the growth, morphology, and production of a recombinant glycoprotein by *Streptomyces lividans* in shake flasks. *Biochem Eng J* 90:224-233

McAdams TA, Howe HW, Draper JE, Farrar LC, (2014) United States Patent: Selfcontained breathing closure and container. No.: US 8,696,778 B2

McDaniel LE, Bailey EG, Zimmerli A. (1965) Effect of oxygen supply rates on growth of *Escherichia coli* I. Studies in unbaffled and baffled shake flasks. *Appl Microbiol* 13(1):109-114

Mollenhauer HH. (1964) Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. *Stain Technol* 39:111-114

Mrotzek C, Anderlei T, Henzler HJ, Jochen J. (2001) Mass transfer resistance of sterile plugs in shaking bioreactors. *Biochem Eng J* 7:107-112

Nienow AW. (2009) Scale-up considerations based on studies at the bench scale in stirred bioreactors *J Chem Eng Jpn* 42(11):789-796

Orozco-Sánchez F, Sepúlveda-Jiménez G, Trejo-Tapia G, Zamilpa A, Rodríguez-Monroy M. (2011) Limitaciones por oxígeno para crecer un cultivo de células de *Azadirachta indica* en matraces. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10(3):343-352

Osorio JG, Muzzio FJ. (2015) Evaluation of resonant acoustic mixing performance. *Powder Technol* 278:46-56

Peña C, Millán M, Galindo E. (2008) Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* in a stirred fermentor simulating the evolution of power input observed in shake flasks. *Process Biochem* 43:775-778

Peter CP, Lotter S, Maier U, Büchs J. (2004) Impact of out-of-phase conditions on screening results in shaking flask experiments. *Biochem Eng J* 17:205-215

Phue JN, Shiloach J. (2005) Impact of dissolved oxygen concentration on acetate accumulation and physiology of *E. coli* BL21, evaluating transcription levels of key genes at different dissolved oxygen conditions. *Metab Eng* 7(5-6):353-63

Rahmen N, Fulton A, Ihling N, Magni M, Jaeger KE, Büchs J. (2015) Exchange of single amino acids at different positions of a recombinant protein affects metabolic burden in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 14:10

Reyes C, Peña C, Galindo E. (2003) Reproducing shake flasks performance in stirred fermentors: production of alginates by *Azotobacter vinelandii*. *J Biotechnol* 105:189-198

Reynoso-Cereceda GI, Garcia-Cabrera RI, Valdez-Cruz NA, Trujillo-Roldán MA. (2016) Shaken flasks by resonant acoustic mixing versus orbital mixing: Mass transfer coefficient k_La characterization and *Escherichia coli* cultures comparison. *Biochem Eng J* 105(B):379-390

Seletzky JM, Noak U, Fricke J, Welk E, Eberhard W, Knocke C, Büchs J. (2007) Scale-up from shake flasks to fermenters in batch and continuous mode with *Corynebacterium glutamicum* on lactic acid based on oxygen transfer and pH. *Biotechnol Bioeng* 98:800-811

Shiloach J, Fass R. (2005) Growing *E. coli* to high cell density-A historical perspective on method development. *Biotechnol Adv* 23(5):345-57

Suresh S, Srivastava VC, Mishra IM. (2009a) Techniques for oxygen transfer measurement in bioreactors: a review. *J Chem Technol Biotechnol* 84(8):1091-1103

Suresh S, Srivastava VC, Mishra IM. (2009b) Critical analysis of engineering aspects of shaken flask bioreactors. *Crit Rev Biotechnol*. 29(4):255-278

Tolosa L, Kostov Y, Harms P, Rao G. (2002) Noninvasive measurement of dissolved oxygen in shake flasks. *Biotechnol Bioeng* 80:594-597

Torres-Rivera A. (2014) Evaluación del crecimiento bacteriano y producción de proteínas recombinantes en cultivos de *Escherichia coli* BL21 (DE3) gold en una incubadora de matraces agitada por resonancia acústica. Tesis de Licenciatura. Universidad Politécnica de Tlaxcala.

Trujillo-Roldán MA, Valdez-Cruz NA, Gonzalez-Monterrubio CF, Acevedo-Sánchez EV, Martínez-Salinas C, García-Cabrera RI, Gamboa-Suasnavart RA, Marín-Palacio LD, Villegas J, Blancas-Cabrera A. (2013) Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:9665-9674

Valgepea K, Adamberg K, Nahku R, Lahtvee PJ, Arike L, Vilu R. (2010) Systems biology approach reveals that overflow metabolism of acetate in *Escherichia coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase. *BMC Systems Biol* 4:166

- van de Walle M, Shiloach J. (1998) Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation. *Biotechnol Bioeng* 57(1):71-78
- Van't Riet K. (1979) Review of measuring methods and results in mass transfer in stirred vessels nonviscous gas-liquid. *Ind Eng Chem Process Des Dev* 18:357-364
- van Suijdam JC, Kossen NWF, Joha AC. (1978) Model for oxygen transfer in a shake flask. *Biotechnol Bioeng* 20:1695-1709
- Veglio F, Beolchini F, Ubaldini S. (1998) Empirical models for oxygen mass transfer, a comparison between shake flask and lab-scale fermentor and application to manganiferous ore bioleaching. *Process Biochem* 33(4):367-376
- Veljkovic V, Nikolic S, Lazic M, Engeler C. (1995) Oxygen transfer in flasks shaken on orbital shakers. *Hem Ind* 49(6):265-272
- Vogelaar JCT, Klapwijkm A, Van Lierm JB, Rulkens WH. (2000) Temperature effects on the oxygen transfer rate between 20 and 55°C. *Wat Res* 34(3):1037-1041
- Wittmann C, Min-Kim H, Gernot John G, Heinzle E. (2003) Characterization and application of an optical sensor for quantification of dissolved O₂ in shake-flasks. *Biotechnol Lett* 25:377-380
- Zimmermann HF, Anderlei T, Büchs J, Binder M. (2006) Oxygen limitation is a pitfall during screening for industrial strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 72(6):1157-1160

10. ANEXOS

ANEXO 1. Materiales y métodos: información suplementaria

A1.1. Elaboración de los tapones algodón

Los tapones de algodón se usan con los matraces cuando se trabajan con agitación orbital. Fueron elaborados a mano cortando rectángulos de gaza del mismo tamaño, aproximadamente 16 x 14.5 cm, que se rellenan con la misma cantidad de algodón, la gaza se anuda y se corta el exceso. Se realizan varios tapones a la vez que deben ajustar adecuadamente el cuello del matraz. Se evita su uso cuando han sido mojados, quemados, sucios, entre otros, y se fabricaron nuevos tapones periódicamente. En la Tabla A.1 se presentan los pesos de una muestra representativa de los tapones usados durante los experimentos realizados en este trabajo.

Tabla A.1. Medidas de una muestra representativa de tapones de algodón con gasa.

Matraz V _N (mL)	Algodón (g)	Tapón (g)	Densidad* (g/cm ³)	Matraz V _N (mL)	Algodón (g)	Tapón (g)	Densidad* (g/cm ³)	Matraz V _N (mL)	Algodón (g)	Tapón (g)	Densidad* (g/cm ³)
250	4.21	5.33	0.092	500	4.26	5.33	0.196	1000	6.63	8.35	0.152
	4.17	5.15	0.089		4.18	5.12	0.188		6.53	7.99	0.145
	4.23	5.23	0.090		4.20	5.10	0.188		6.68	8.20	0.149
	4.24	5.27	0.091		4.21	5.16	0.190		6.64	8.18	0.149
	4.21	5.17	0.089		4.25	5.31	0.195		6.64	8.41	0.153
	4.24	5.20	0.090		4.21	5.17	0.190		6.59	8.15	0.148

* El estimado de la densidad de los tapones considera el peso total del algodón y el volumen de un cilindro con las medidas del cuello del matraz correspondiente (Tabla 5.1).

A1.2. Ejemplo de la determinación de $k_{L}a$ en matraces agitados con el método dinámico

Los datos para la determinación del $k_{L}a$ se obtienen como se describe en la Sección 5.3, el software OxyView PST3v602 (PreSens, Regensburg, Germany) los guarda como un archivo con formato .txt del que se importan los datos a Excel para realizar los cálculos correspondientes, un ejemplo se muestra en la Figura A.1.

Determinación de $k_L a$ en matraces agitados								
Agitación:		acústica RAMbio						
Condiciones de operación:				T (°C) =	37	Líquido: Agua milli Q		
P (mbar) =	780			Va (g) =	20			
%VF=	10			VT (L) =	0.5			
C* (%air.sat)	100.00			VF (L) =	0.05			
DD/MM/YY	hh:mm:ss	time (min)	c (%air.sat) [O ₂]	T (°C)	t (s) =t(min)*60	t (h) =t(s)/3600	% aire disuelto	ln ((c*- c1)/(c*-c2))
26/06/14	13:09:55	0	0.966	37				
26/06/14	13:09:56	0.018	0.84	37				
26/06/14	13:09:57	0.034	0.647	37				
26/06/14	13:09:58	0.051	0.545	37				
26/06/14	13:09:59	0.068	0.477	37				
26/06/14	13:10:00	0.085	0.488	37				
26/06/14	13:10:01	0.102	0.5	37				
26/06/14	13:10:02	0.119	1.23	37				
26/06/14	13:10:03	0.136	4.483	37				
26/06/14	13:10:04	0.153	10.898	37	0	0.0000	10.9	0.0000
26/06/14	13:10:05	0.17	18.182	37	1	0.0003	18.2	-0.0853
26/06/14	13:10:06	0.187	26.183	37	2	0.0006	26.2	-0.1882
26/06/14	13:10:07	0.204	34.059	37	3	0.0008	34.1	-0.3010
26/06/14	13:10:08	0.221	42.291	37	4	0.0011	42.3	-0.4343
26/06/14	13:10:09	0.239	48.433	37	5	0.0014	48.4	-0.5469
26/06/14	13:10:11	0.255	54.833	37	6	0.0017	54.8	-0.6794
26/06/14	13:10:12	0.272	60.61	37	7	0.0019	60.6	-0.8162
26/06/14	13:10:13	0.289	65.29	37				
26/06/14	13:10:14	0.306	69.313	37				
26/06/14	13:10:15	0.324	72.893	37				
26/06/14	13:10:16	0.341	76.34	37				
26/06/14	13:10:17	0.358	79.179	37				
26/06/14	13:10:18	0.375	81.24	37				
26/06/14	13:10:19	0.392	82.675	37				
26/06/14	13:10:20	0.409	85.24	37				
26/06/14	13:10:21	0.426	85.956	37				
26/06/14	13:10:22	0.442	86.841	37				
26/06/14	13:10:23	0.459	88.811	37				
26/06/14	13:10:24	0.476	88.811	37				
26/06/14	13:10:25	0.493	90.07	37				
26/06/14	13:10:26	0.51	89.732	37				
26/06/14	13:10:27	0.527	90.665	37				
26/06/14	13:10:28	0.544	90.75	37				
26/06/14	13:10:29	0.561	90.239	37				
26/06/14	13:10:30	0.578	91.092	37				

Figura A.1. Ejemplo de hoja de Excel donde se importan los datos de oxígeno disuelto para el cálculo de $k_L a$ ($V_N=500$ mL, $VF=10\%$, $n_g= 20$ g y 37°C).

El valor de $k_L a$ se determina a partir de los datos de oxígeno disuelto entre el 10 y el 60% sat. aire, de acuerdo a la Figura A.2A y B.

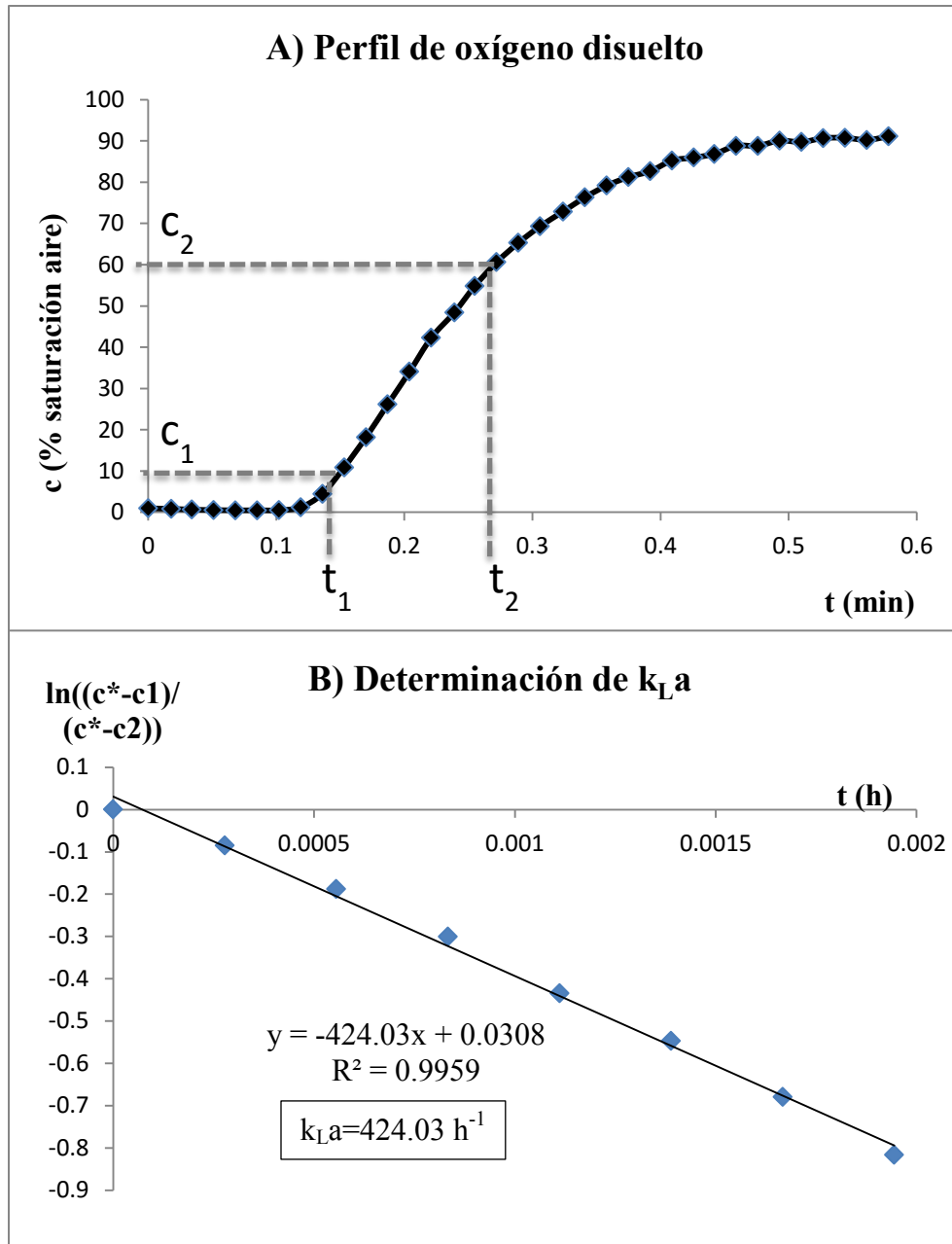


Figura A.2. Ejemplo de la determinación experimental de $k_L a$ con el método dinámico (Sección 5.3) ($V_N=500 \text{ mL}$, $V_F=10\%$, $n_g= 20 \text{ g}$ y 37°C). **(A)** Desarrollo del perfil de oxígeno disuelto, al inicio el líquido está desoxigenado ($OD=0\%$ sat. aire); luego de iniciar la agitación, el oxígeno disuelto se incrementa. Se observan los límites de integración de la Ecuación 5.1. **(B)** Los datos del incremento del oxígeno disuelto del 10 al 60% sat. aire se utilizan para determinar el $k_L a$ como la pendiente de la Ecuación 5.2.

A1.3. Cálculo de las condiciones de operación “fuera de fase” en matraces agitados

Con el fin de poder predecir el desarrollo del fenómeno “fuera de fase”, se propuso el uso del número de fase adimensional (Ecuación A.1), que considera el número de Reynolds de la película (Ecuación A.2) (Büchs *et al.*, 2000).

$$Ph = \frac{d_0}{d} \cdot [1 + 3 \log_{10}(Re_f)] > 1.26 \quad \text{Ecuación A.1}$$

$$Re_f = \left(\frac{\rho \cdot n \cdot d^2}{\eta} \right) \cdot \frac{\pi}{2} \left[1 - \sqrt{1 - \frac{4}{\pi} \left(\frac{V^{1/3}}{d} \right)^2} \right]^2 \quad \text{Ecuación A.2}$$

Las variables de las ecuaciones A.1 y A.2 incluyen al diámetro de agitación (d_0), el diámetro interior máximo del matraz (d), la densidad del líquido (ρ), la velocidad de agitación (n), la viscosidad dinámica (η) y el volumen de líquido (V). Adicionalmente, para poder usar la Ecuación A.1, se define el número axial de Froude (Ecuación A.3), donde se considera también la aceleración de la gravedad (g).

$$Fr_a = \frac{(2 \cdot \pi \cdot n)^2 \cdot d_0}{2 \cdot g} > 0.4 \quad \text{Ecuación A.3}$$

Las condiciones de operación se consideran en fase cuando se cumplen los criterios de $Fr_a > 0.4$ y $Ph > 1.26$, de acuerdo a las ecuaciones A.1 y A.3 (Büchs *et al.*, 2000).

Para asegurar que durante los experimentos realizados durante este trabajo cumplieran con la condición de trabajar en fase, se calcularon los números Fr_a y Ph bajo todas las condiciones operacionales ($V_N = 250, 500$ y 1000 mL; $V_F = 10, 15, 20, 25, 40\%$; $d_0 = 25$ mm; $n = 100-350$ rpm; $n_g = 3-20$ g; $T = 30, 37^\circ\text{C}$). Los datos generados se enlistan en las tablas A.2 y A.3. Se puede observar el entero cumplimiento del criterio del número de fase ($Ph > 1.26$). Mientras que el criterio del número Fr_a fue inferior a lo establecido en algunos casos. A partir de los experimentos realizados con diámetros de agitación de entre 25 y 50 mm y volúmenes nominales de matraces menores de 1 L; el régimen de “fuera de fase” ocurre únicamente cuando los cultivos tienen viscosidades elevadas (Büchs *et al.*, 2001). En nuestro caso se tiene un sistema con agua y cultivos de *E. coli* de baja densidad. Concluimos que todos los experimentos conducidos operaron siempre en fase.

Tabla A.2. Números adimensionales de Fr_a , Re_f y Ph bajo las condiciones de trabajo* a 37°C.

V n (mL)	%Vf	n (1/min)	n (1/s)	d (m)	V (m ³)	Fr_a	$Re_f(30^\circ\text{C})$	Ph
250	10	100	1.67	0.082	0.000025	0.14	65.8	2.00
250	10	150	2.50	0.082	0.000025	0.32	98.7	2.16
250	10	200	3.33	0.082	0.000025	0.57	131.5	2.28
250	10	250	4.17	0.082	0.000025	0.89	164.4	2.37
250	10	300	5.00	0.082	0.000025	1.28	197.3	2.44
250	10	350	5.83	0.082	0.000025	1.74	230.2	2.50
250	10	400	6.67	0.082	0.000025	2.27	263.1	2.56
500	10	100	1.67	0.102	0.00005	0.14	107.3	1.77
500	10	150	2.50	0.102	0.00005	0.32	160.9	1.90
500	10	200	3.33	0.102	0.00005	0.57	214.5	1.99
500	10	250	4.17	0.102	0.00005	0.89	268.1	2.06
500	10	300	5.00	0.102	0.00005	1.28	321.8	2.12
500	10	350	5.83	0.102	0.00005	1.74	375.4	2.17
500	10	400	6.67	0.102	0.00005	2.27	429.0	2.22
1000	10	100	1.67	0.128	0.0001	0.14	171.7	1.53
1000	10	150	2.50	0.128	0.0001	0.32	257.5	1.63
1000	10	200	3.33	0.128	0.0001	0.57	343.4	1.71
1000	10	250	4.17	0.128	0.0001	0.89	429.2	1.77
1000	10	300	5.00	0.128	0.0001	1.28	515.1	1.81
1000	10	350	5.83	0.128	0.0001	1.74	600.9	1.85
1000	10	400	6.67	0.128	0.0001	2.27	686.8	1.89
250	15	100	1.67	0.082	0.0000375	0.14	114.9	2.22
250	15	150	2.50	0.082	0.0000375	0.32	172.3	2.39
250	15	200	3.33	0.082	0.0000375	0.57	229.7	2.50
250	15	250	4.17	0.082	0.0000375	0.89	287.2	2.59
250	15	300	5.00	0.082	0.0000375	1.28	344.6	2.67
250	15	350	5.83	0.082	0.0000375	1.74	402.0	2.73
250	15	400	6.67	0.082	0.0000375	2.27	459.4	2.78
500	15	100	1.67	0.102	0.000075	0.14	187.4	1.95
500	15	150	2.50	0.102	0.000075	0.32	281.1	2.08
500	15	200	3.33	0.102	0.000075	0.57	374.8	2.17
500	15	250	4.17	0.102	0.000075	0.89	468.5	2.24
500	15	300	5.00	0.102	0.000075	1.28	562.2	2.30
500	15	350	5.83	0.102	0.000075	1.74	655.9	2.35
500	15	400	6.67	0.102	0.000075	2.27	749.6	2.40
1000	15	100	1.67	0.128	0.00015	0.14	300.1	1.67
1000	15	150	2.50	0.128	0.00015	0.32	450.1	1.78
1000	15	200	3.33	0.128	0.00015	0.57	600.1	1.85
1000	15	250	4.17	0.128	0.00015	0.89	750.2	1.91
1000	15	300	5.00	0.128	0.00015	1.28	900.2	1.96
1000	15	350	5.83	0.128	0.00015	1.74	1050.2	2.00
1000	15	400	6.67	0.128	0.00015	2.27	1200.2	2.03

Tabla A.2. (Continuación)

V n (mL)	%Vf	n (1/min)	n (1/s)	d (m)	V (m ³)	Fr _a	Re _f (30°C)	Ph
250	20	100	1.67	0.082	0.00005	0.14	171.2	2.39
250	20	150	2.50	0.082	0.00005	0.32	256.8	2.55
250	20	200	3.33	0.082	0.00005	0.57	342.4	2.67
250	20	250	4.17	0.082	0.00005	0.89	428.0	2.76
250	20	300	5.00	0.082	0.00005	1.28	513.6	2.83
250	20	350	5.83	0.082	0.00005	1.74	599.2	2.89
250	20	400	6.67	0.082	0.00005	2.27	684.8	2.94
500	20	100	1.67	0.102	0.0001	0.14	279.5	2.08
500	20	150	2.50	0.102	0.0001	0.32	419.2	2.21
500	20	200	3.33	0.102	0.0001	0.57	558.9	2.30
500	20	250	4.17	0.102	0.0001	0.89	698.7	2.37
500	20	300	5.00	0.102	0.0001	1.28	838.4	2.43
500	20	350	5.83	0.102	0.0001	1.74	978.1	2.48
500	20	400	6.67	0.102	0.0001	2.27	1117.9	2.53
1000	20	100	1.67	0.128	0.0002	0.14	447.5	1.78
1000	20	150	2.50	0.128	0.0002	0.32	671.3	1.88
1000	20	200	3.33	0.128	0.0002	0.57	895.0	1.96
1000	20	250	4.17	0.128	0.0002	0.89	1118.8	2.01
1000	20	300	5.00	0.128	0.0002	1.28	1342.5	2.06
1000	20	350	5.83	0.128	0.0002	1.74	1566.3	2.10
1000	20	400	6.67	0.128	0.0002	2.27	1790.0	2.13
250	25	100	1.67	0.082	0.0000625	0.14	233.9	2.51
250	25	150	2.50	0.082	0.0000625	0.32	350.9	2.67
250	25	200	3.33	0.082	0.0000625	0.57	467.8	2.79
250	25	250	4.17	0.082	0.0000625	0.89	584.8	2.88
250	25	300	5.00	0.082	0.0000625	1.28	701.8	2.95
250	25	350	5.83	0.082	0.0000625	1.74	818.7	3.02
250	25	400	6.67	0.082	0.0000625	2.27	935.7	3.07
500	25	100	1.67	0.102	0.000125	0.14	382.0	2.18
500	25	150	2.50	0.102	0.000125	0.32	573.0	2.31
500	25	200	3.33	0.102	0.000125	0.57	764.0	2.40
500	25	250	4.17	0.102	0.000125	0.89	955.0	2.48
500	25	300	5.00	0.102	0.000125	1.28	1146.0	2.53
500	25	350	5.83	0.102	0.000125	1.74	1337.1	2.58
500	25	400	6.67	0.102	0.000125	2.27	1528.1	2.63
1000	25	100	1.67	0.128	0.00025	0.14	611.8	1.86
1000	25	150	2.50	0.128	0.00025	0.32	917.7	1.96
1000	25	200	3.33	0.128	0.00025	0.57	1223.6	2.04
1000	25	250	4.17	0.128	0.00025	0.89	1529.5	2.09
1000	25	300	5.00	0.128	0.00025	1.28	1835.4	2.14
1000	25	350	5.83	0.128	0.00025	1.74	2141.3	2.18
1000	25	400	6.67	0.128	0.00025	2.27	2447.3	2.22

Tabla A.2. (Continuación)

V n (mL)	%Vf	n (1/min)	n (1/s)	d (m)	V (m ³)	Fr _a	Re _{f(30°C)}	Ph
250	40	100	1.67	0.082	0.0001	0.14	455.9	2.78
250	40	150	2.50	0.082	0.0001	0.32	683.9	2.94
250	40	200	3.33	0.082	0.0001	0.57	911.8	3.06
250	40	250	4.17	0.082	0.0001	0.89	1139.8	3.15
250	40	300	5.00	0.082	0.0001	1.28	1367.7	3.22
250	40	350	5.83	0.082	0.0001	1.74	1595.7	3.29
250	40	400	6.67	0.082	0.0001	2.27	1823.6	3.34
500	40	100	1.67	0.102	0.0002	0.14	745.5	2.39
500	40	150	2.50	0.102	0.0002	0.32	1118.2	2.53
500	40	200	3.33	0.102	0.0002	0.57	1491.0	2.62
500	40	250	4.17	0.102	0.0002	0.89	1863.7	2.69
500	40	300	5.00	0.102	0.0002	1.28	2236.5	2.75
500	40	350	5.83	0.102	0.0002	1.74	2609.2	2.80
500	40	400	6.67	0.102	0.0002	2.27	2982.0	2.84
1000	40	100	1.67	0.128	0.0004	0.14	1194.4	2.03
1000	40	150	2.50	0.128	0.0004	0.32	1791.6	2.14
1000	40	200	3.33	0.128	0.0004	0.57	2388.8	2.21
1000	40	250	4.17	0.128	0.0004	0.89	2986.0	2.27
1000	40	300	5.00	0.128	0.0004	1.28	3583.3	2.31
1000	40	350	5.83	0.128	0.0004	1.74	4180.5	2.35
1000	40	400	6.67	0.128	0.0004	2.27	4777.7	2.39

* $d_0=0.0254$ m; $\mu=0.000699$ kg.m⁻¹.s⁻¹; $\rho=994.4$ kg.m⁻³; $\nu=7.02936 \times 10^{-7}$ m².s⁻¹; $g=9.81$ m.s⁻².
 Considerando las características del agua a 37°C (Geankoplis CJ. Proceso de transporte y operaciones unitarias, CECSA 3ª ed., México, 1998).

Tabla A.3. Números adimensionales de Fr_a , Re_f y Ph bajo las condiciones de trabajo* a 30°C.

V n (mL)	%Vf	n (1/min)	n (1/s)	d (m)	V_L (m ³)	Fr_a	Re_f (30°C)	Ph
250	10	100	1.67	0.082	0.000025	0.14	57.5	1.94
250	10	150	2.50	0.082	0.000025	0.32	86.2	2.11
250	10	200	3.33	0.082	0.000025	0.57	115.0	2.22
250	10	250	4.17	0.082	0.000025	0.89	143.7	2.31
250	10	300	5.00	0.082	0.000025	1.28	172.5	2.39
250	10	350	5.83	0.082	0.000025	1.74	201.2	2.45
250	10	400	6.67	0.082	0.000025	2.27	230.0	2.50
500	10	100	1.67	0.102	0.00005	0.14	93.8	1.72
500	10	150	2.50	0.102	0.00005	0.32	140.6	1.85
500	10	200	3.33	0.102	0.00005	0.57	187.5	1.95
500	10	250	4.17	0.102	0.00005	0.89	234.4	2.02
500	10	300	5.00	0.102	0.00005	1.28	281.3	2.08
500	10	350	5.83	0.102	0.00005	1.74	328.1	2.13
500	10	400	6.67	0.102	0.00005	2.27	375.0	2.17
1000	10	100	1.67	0.128	0.0001	0.14	150.1	1.49
1000	10	150	2.50	0.128	0.0001	0.32	225.1	1.60
1000	10	200	3.33	0.128	0.0001	0.57	300.2	1.67
1000	10	250	4.17	0.128	0.0001	0.89	375.2	1.73
1000	10	300	5.00	0.128	0.0001	1.28	450.3	1.78
1000	10	350	5.83	0.128	0.0001	1.74	525.3	1.82
1000	10	400	6.67	0.128	0.0001	2.27	600.3	1.85
250	15	100	1.67	0.082	0.0000375	0.14	100.4	2.17
250	15	150	2.50	0.082	0.0000375	0.32	150.6	2.33
250	15	200	3.33	0.082	0.0000375	0.57	200.8	2.45
250	15	250	4.17	0.082	0.0000375	0.89	251.0	2.54
250	15	300	5.00	0.082	0.0000375	1.28	301.2	2.61
250	15	350	5.83	0.082	0.0000375	1.74	351.4	2.68
250	15	400	6.67	0.082	0.0000375	2.27	401.6	2.73
500	15	100	1.67	0.102	0.000075	0.14	163.8	1.90
500	15	150	2.50	0.102	0.000075	0.32	245.7	2.03
500	15	200	3.33	0.102	0.000075	0.57	327.6	2.13
500	15	250	4.17	0.102	0.000075	0.89	409.5	2.20
500	15	300	5.00	0.102	0.000075	1.28	491.5	2.26
500	15	350	5.83	0.102	0.000075	1.74	573.4	2.31
500	15	400	6.67	0.102	0.000075	2.27	655.3	2.35
1000	15	100	1.67	0.128	0.00015	0.14	262.3	1.64
1000	15	150	2.50	0.128	0.00015	0.32	393.4	1.74
1000	15	200	3.33	0.128	0.00015	0.57	524.6	1.82
1000	15	250	4.17	0.128	0.00015	0.89	655.7	1.88
1000	15	300	5.00	0.128	0.00015	1.28	786.9	1.92
1000	15	350	5.83	0.128	0.00015	1.74	918.0	1.96
1000	15	400	6.67	0.128	0.00015	2.27	1049.1	2.00

Tabla A.3. (Continuación)

V n (mL)	%Vf	n (1/min)	n (1/s)	d (m)	V _L (m ³)	Fr _a	Re _f (30°C)	Ph
250	20	100	1.67	0.082	0.00005	0.14	149.6	2.33
250	20	150	2.50	0.082	0.00005	0.32	224.5	2.49
250	20	200	3.33	0.082	0.00005	0.57	299.3	2.61
250	20	250	4.17	0.082	0.00005	0.89	374.1	2.70
250	20	300	5.00	0.082	0.00005	1.28	448.9	2.77
250	20	350	5.83	0.082	0.00005	1.74	523.8	2.84
250	20	400	6.67	0.082	0.00005	2.27	598.6	2.89
500	20	100	1.67	0.102	0.0001	0.14	244.3	2.03
500	20	150	2.50	0.102	0.0001	0.32	366.4	2.16
500	20	200	3.33	0.102	0.0001	0.57	488.6	2.26
500	20	250	4.17	0.102	0.0001	0.89	610.7	2.33
500	20	300	5.00	0.102	0.0001	1.28	732.8	2.39
500	20	350	5.83	0.102	0.0001	1.74	855.0	2.44
500	20	400	6.67	0.102	0.0001	2.27	977.1	2.48
1000	20	100	1.67	0.128	0.0002	0.14	391.2	1.74
1000	20	150	2.50	0.128	0.0002	0.32	586.8	1.85
1000	20	200	3.33	0.128	0.0002	0.57	782.3	1.92
1000	20	250	4.17	0.128	0.0002	0.89	977.9	1.98
1000	20	300	5.00	0.128	0.0002	1.28	1173.5	2.03
1000	20	350	5.83	0.128	0.0002	1.74	1369.1	2.07
1000	20	400	6.67	0.128	0.0002	2.27	1564.7	2.10
250	25	100	1.67	0.082	0.0000625	0.14	204.5	2.46
250	25	150	2.50	0.082	0.0000625	0.32	306.7	2.62
250	25	200	3.33	0.082	0.0000625	0.57	408.9	2.74
250	25	250	4.17	0.082	0.0000625	0.89	511.2	2.83
250	25	300	5.00	0.082	0.0000625	1.28	613.4	2.90
250	25	350	5.83	0.082	0.0000625	1.74	715.7	2.96
250	25	400	6.67	0.082	0.0000625	2.27	817.9	3.02
500	25	100	1.67	0.102	0.000125	0.14	333.9	2.13
500	25	150	2.50	0.102	0.000125	0.32	500.9	2.27
500	25	200	3.33	0.102	0.000125	0.57	667.8	2.36
500	25	250	4.17	0.102	0.000125	0.89	834.8	2.43
500	25	300	5.00	0.102	0.000125	1.28	1001.8	2.49
500	25	350	5.83	0.102	0.000125	1.74	1168.7	2.54
500	25	400	6.67	0.102	0.000125	2.27	1335.7	2.58
1000	25	100	1.67	0.128	0.00025	0.14	534.8	1.82
1000	25	150	2.50	0.128	0.00025	0.32	802.2	1.93
1000	25	200	3.33	0.128	0.00025	0.57	1069.6	2.00
1000	25	250	4.17	0.128	0.00025	0.89	1337.0	2.06
1000	25	300	5.00	0.128	0.00025	1.28	1604.4	2.11
1000	25	350	5.83	0.128	0.00025	1.74	1871.8	2.15
1000	25	400	6.67	0.128	0.00025	2.27	2139.2	2.18

Tabla A.3. (Continuación)

V n (mL)	%Vf	n (1/min)	n (1/s)	d (m)	V _L (m ³)	Fr _a	Re _f (30°C)	Ph
250	40	100	1.67	0.082	0.0001	0.14	398.5	2.73
250	40	150	2.50	0.082	0.0001	0.32	597.8	2.89
250	40	200	3.33	0.082	0.0001	0.57	797.0	3.01
250	40	250	4.17	0.082	0.0001	0.89	996.3	3.10
250	40	300	5.00	0.082	0.0001	1.28	1195.5	3.17
250	40	350	5.83	0.082	0.0001	1.74	1394.8	3.23
250	40	400	6.67	0.082	0.0001	2.27	1594.1	3.29
500	40	100	1.67	0.102	0.0002	0.14	651.6	2.35
500	40	150	2.50	0.102	0.0002	0.32	977.5	2.48
500	40	200	3.33	0.102	0.0002	0.57	1303.3	2.58
500	40	250	4.17	0.102	0.0002	0.89	1629.1	2.65
500	40	300	5.00	0.102	0.0002	1.28	1954.9	2.71
500	40	350	5.83	0.102	0.0002	1.74	2280.7	2.76
500	40	400	6.67	0.102	0.0002	2.27	2606.6	2.80
1000	40	100	1.67	0.128	0.0004	0.14	1044.1	2.00
1000	40	150	2.50	0.128	0.0004	0.32	1566.1	2.10
1000	40	200	3.33	0.128	0.0004	0.57	2088.1	2.17
1000	40	250	4.17	0.128	0.0004	0.89	2610.1	2.23
1000	40	300	5.00	0.128	0.0004	1.28	3132.2	2.28
1000	40	350	5.83	0.128	0.0004	1.74	3654.2	2.32
1000	40	400	6.67	0.128	0.0004	2.27	4176.2	2.35

* $d_0=0.0254$ m; $\mu=0.0008007$ kg.m⁻¹.s⁻¹; $p=995.68$ kg.m⁻³; $\nu=8.0417 \times 10^{-7}$ m².s⁻¹; $g=9.81$ m.s⁻².
 Considerando las características del agua a 37°C (Geankoplis CJ. Proceso de transporte y operaciones unitarias, CECSA 3ª ed., México, 1998).

A1.4. Principio de funcionamiento del sensor óptico de oxígeno disuelto

El sensor óptico de oxígeno se utiliza para medir en línea la presión parcial de oxígeno tanto disuelto como gaseoso. El sensor es un parche que contiene un colorante luminiscente sensible a oxígeno [1,2-bis(difenil fosfino)etano Pt[S₂C₂(CH₂-CH₂-N-2-pirimidina] (BPh₄), inmovilizado en una matriz de silicona. Su funcionamiento se basa en el apagamiento diferencial del tiempo de vida de la luminiscencia del cromóforo, en respuesta a la presión parcial de oxígeno. Esta diferencia se mide como un cambio de fase en la emisión luminosa del colorante luminiscente debido al apagamiento dinámico cuando se excita con un haz de luz de intensidad modulada tal como se ilustra en la Figura A.3 (Bambot *et al.*, 1994; Gupta y Rao, 2003).

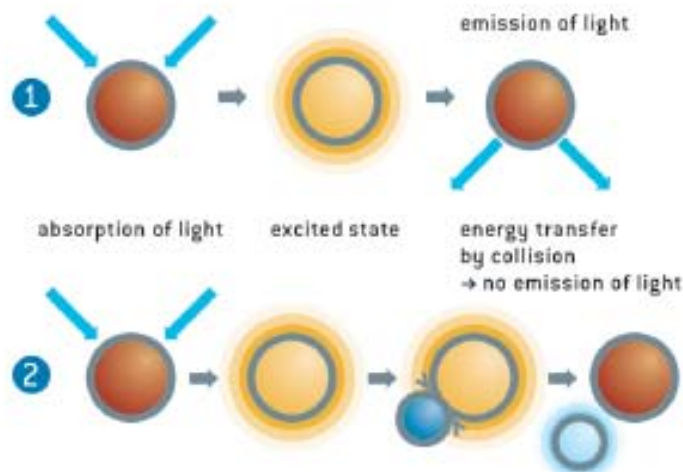


Figura A.3. La luz azul-verde que emite el LED (~505 nm) excita al cromóforo en el sensor de oxígeno que a su vez emite luminiscencia (~590 nm) (Kunze *et al.*, 2014). Si el sensor se encuentra con una molécula de oxígeno, el exceso de energía se transfiere a esta de una forma no-radiante, disminuyendo o apagando la señal de luminiscencia. El grado de apagamiento se relaciona con la presión parcial de oxígeno en la matriz, que está en equilibrio dinámico con el oxígeno de la muestra (Bambot *et al.*, 1994; Gupta y Rao, 2003).

El apagamiento dinámico sigue la ley de Stern-Volmer:

$$I_0/I = \tau_0/\tau = 1 + k_{sv}\tau_0[Q] \quad (\text{Ecuación A.4})$$

$$\tau_0/\tau = 1 + K_p O_2 \quad (\text{Ecuación A.5})$$

Donde I es la intensidad de emisión, τ es el tiempo de decaimiento, k_{sv} es la constante de Stern-Volmer, $[Q]$ es la concentración del apagador, que en este caso es oxígeno, K_p es la

constante global de apagamiento y el subíndice 0 refiere al valor de la constante en ausencia del apagador (Gupta y Rao, 2003).

El sistema óptico de medición incluye una fuente de excitación de luz como un diodo emisor de luz (LED), y un detector de fotones, como un fotodiodo o un tubo fotoamplificador, y una fibra óptica bifurcada que sirve para guiar las ondas de luz de excitación y emisión. En la Figura A.4 se presenta un esquema del montaje experimental dispuesto en este trabajo para medir con el sensor óptico el oxígeno disuelto dentro de matraces agitados (Bambot *et al.*, 1994; Gupta y Rao, 2003; Suresh *et al.*, 2009a).

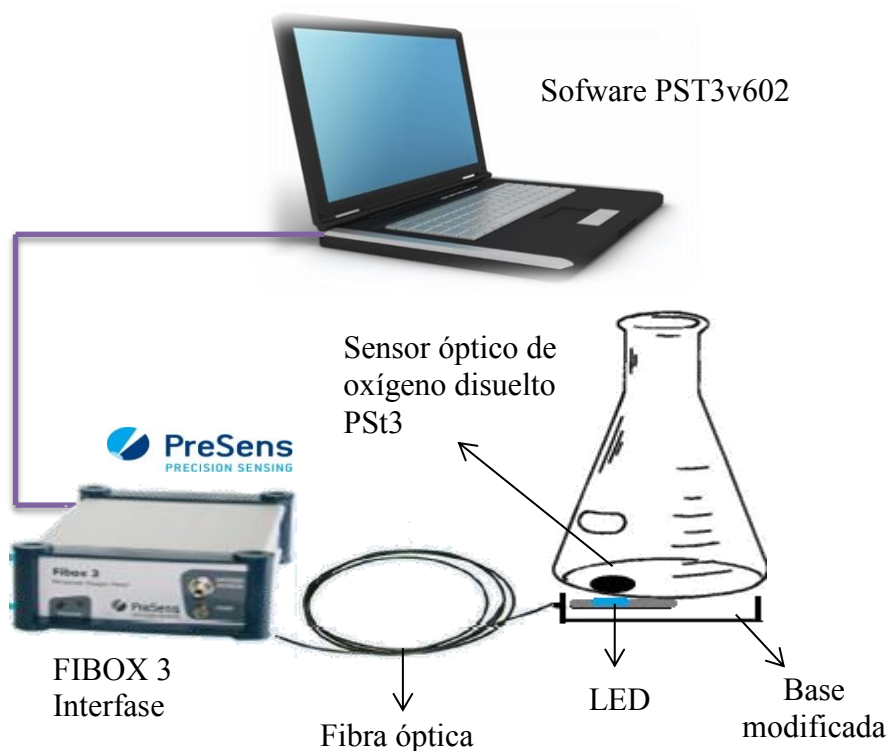


Figura A.4. Esquema que representa el montaje experimental del dispositivo de medición de oxígeno Fibox 3 con el sensor PSt3 adherido al fondo del matraz. Dentro del sistema de agitación (orbital o RAMbio) se coloca una base modificada donde se posiciona el LED emisor de la luz de excitación y el detector, sobre la base se coloca el matraz que tiene adherido el parche luminiscente. La señal se envía al software OxyView PST3v602 (PreSens, Regensburg, Germany).

Las especificaciones y propiedades principales del sensor óptico establecidas por el fabricante (PreSens, Regensburg, Germany) se resumen en la Tabla A.4.

Tabla A.4. Especificaciones y propiedades del sensor óptico de oxígeno disuelto PSt3 (PreSens, Regensburg, Germany).

Especificaciones	
Rango de medición	0-100% O ₂
	0-1000 hPa
Límite de detección	0.03% O ₂
Resolución	±0.01% O ₂ a 0.21% O ₂
	±0.1% O ₂ a 20.9% O ₂
Exactitud	±0.4% O ₂ a 20.9% O ₂
Tiempo de respuesta	t ₉₀ <6 s
Propiedades	
Compatibilidad	Soluciones acuosas, etanol, metanol
No presenta sensibilidad cruzada	pH 1-14
	CO ₂ , H ₂ S, SO ₂
	Especies iónicas
Presenta sensibilidad cruzada	Solventes orgánicos (acetona, tolueno, cloroformo, etc.)
	Cloro gaseoso
Esterilización	Vapor
	Óxido de etileno
	Radiación gamma
Procedimiento de limpieza	Limpieza in situ 5% NaOH, 90°C
	3% H ₂ O ₂
	Ácidos (HCl, H ₂ SO ₄), máx. 4-5%
Calibración	Dos puntos de calibración con ambiente libre de oxígeno (N ₂ , sulfito de sodio) y ambiente saturado con aire
Estabilidad de almacenamiento	Dos años guardado en la oscuridad (de -10 a 60°C)

A1.5. Factor de conversión de D.O. (u.a. 600 nm) - g células de *E. coli*

Las mediciones de biomasa se realizaron por el método de turbidimetría tal como se describe en materiales y métodos (Sección 5.8.1). Para el cálculo de los parámetros cinéticos se determinó experimentalmente la equivalencia de la concentración celular medida como D.O. (u.a. 600 nm) y el peso seco en g células.L⁻¹. A partir de cultivos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD creciendo en el medio SM tal como se describió en la Sección 5.7 (V_N=500 mL; V=100 mL; d₀=25 mm), se tomaron de 3-4 muestras durante la fase exponencial de crecimiento (<8 h después de inocular). Para la determinación de peso seco se tomaron 10 mL de muestra que se filtraron con membranas millipore (0.30 µm) de peso conocido y se llevaron a peso constante por al menos 24 h a 70°C. La pendiente de los valores de peso seco en función de las mediciones de D.O. es igual al factor de conversión, que se determinó en sistemas con agitación acústica y orbital sin diferencias significativas, como se observa en la Tabla A.5. También se observan las velocidades específicas de crecimiento que coinciden con las reportadas en la Tabla 6.2. El factor de conversión no es diferente al publicado por Castellanos-Mendoza y colaboradores (2014), por lo tanto decidimos usar dicho valor de 1 u.a.=0.5 g células.L⁻¹ en todos los cálculos correspondientes.

Tabla A.5. Factores de equivalencia D.O. (u.a. 600 nm) - g células.L⁻¹ de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD y velocidades específicas de crecimiento.

Agitación	RAMbio 10 g	Orbital 200 rpm
Factor*	0.54±0.04	0.47±0.08
µ* (h ⁻¹)	0.38±0.00	0.46±0.02

*Media y desviación estándar de las mediciones por triplicado.

A1.6. Cuantificación de ácidos orgánicos por HPLC

Tabla A.6. Composición de las sales de sodio correspondientes en el estándar comercial (No. catálogo 125-0586 Bio-Rad Hercules, CA).

Componente	μmol/mL
Oxalato	0.8
Citrato	4.0
Malato	8.0
Succinato	20.0
Formato	20.0
Acetato	40.0

Las siguientes Figuras (A5-A9) ejemplifican los cromatogramas a partir de los cuales se obtiene la concentración de los diferentes subproductos del metabolismo de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD (Tabla A.6) acumulados en el medio de cultivo. Los cultivos se realizaron en matraces agitados por resonancia acústica y orbital ($V_N=500$ mL, $V=100$ mL de medio SM a 37°C), a dos valores equivalentes de k_{La} inicial (46 y 92 h^{-1}) (Tabla 6.2). Las muestras se tomaron a diferentes tiempos del cultivo como se describe en la Sección 5.8.2.

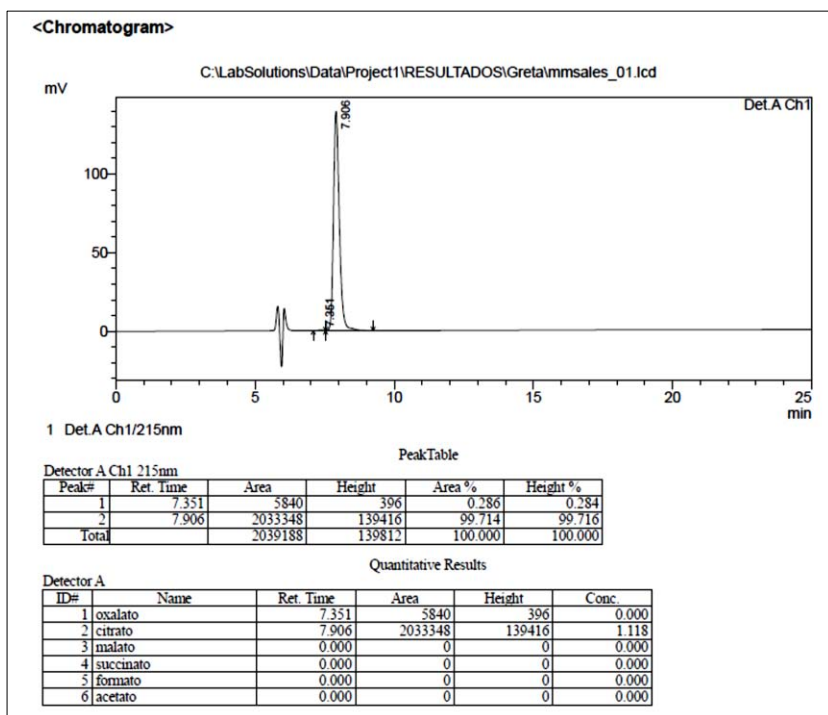


Figura A.5. Cromatograma del medio SM sin inocular.

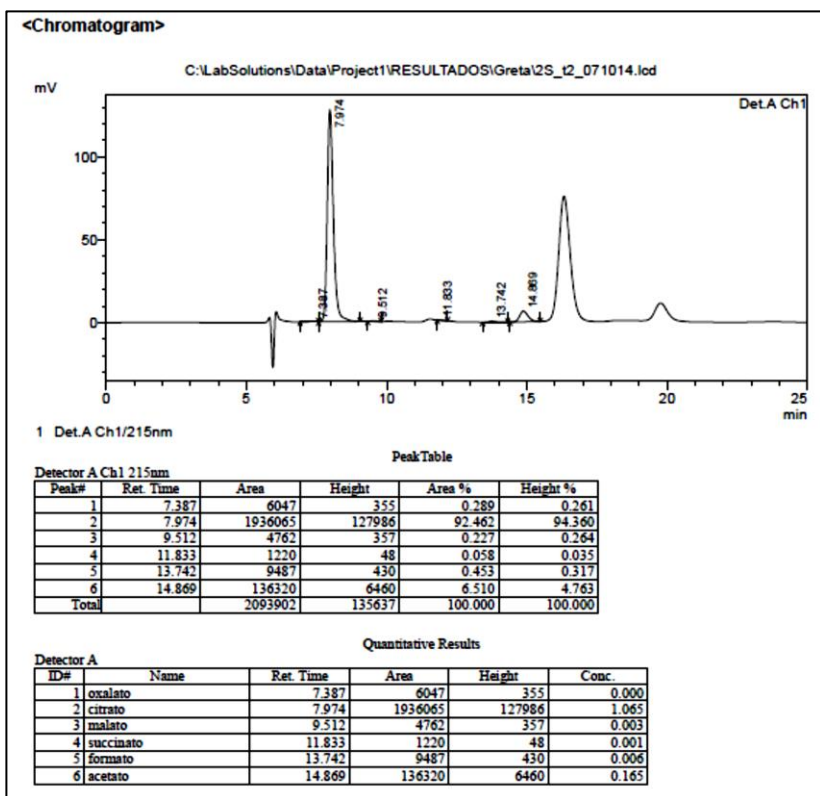


Figura A.6. Cromatograma sobrenadante cultivo con agitación orbital a 200 rpm (46 h^{-1}) $t=2 \text{ h}$.

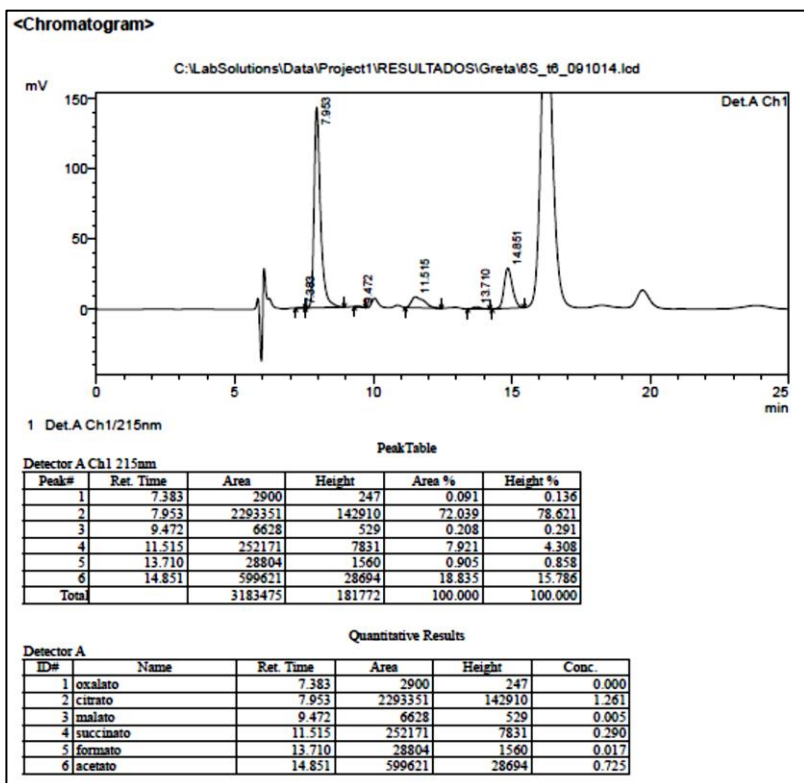


Figura A.7. Cromatograma sobrenadante cultivo con agitación acústica a 10 g (92 h^{-1}) $t=6 \text{ h}$.

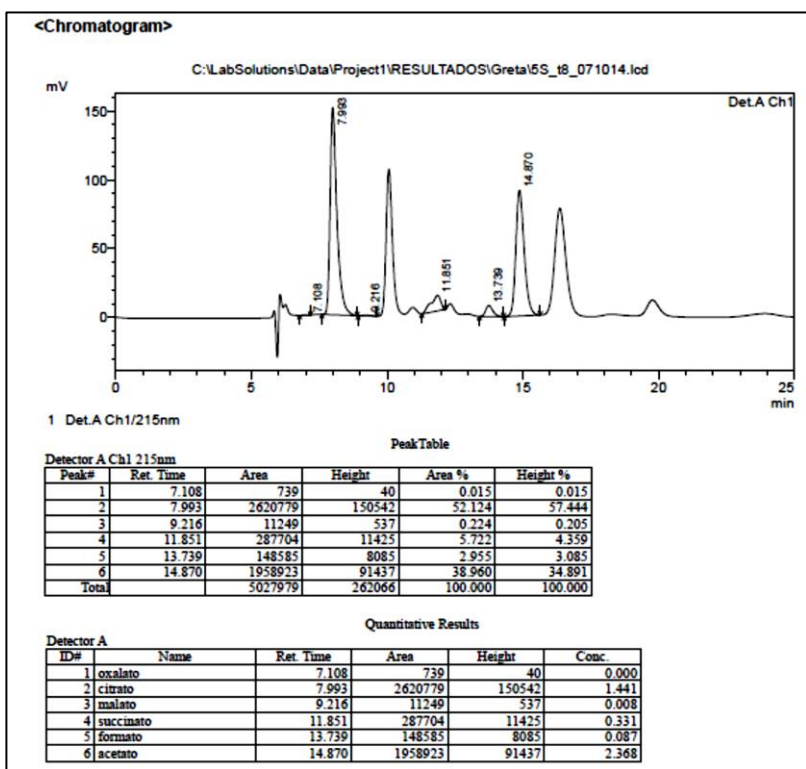


Figura A.8. Cromatograma sobrenadante cultivo con agitación acústica a 5 g (46 h^{-1}) $t=8 \text{ h}$.

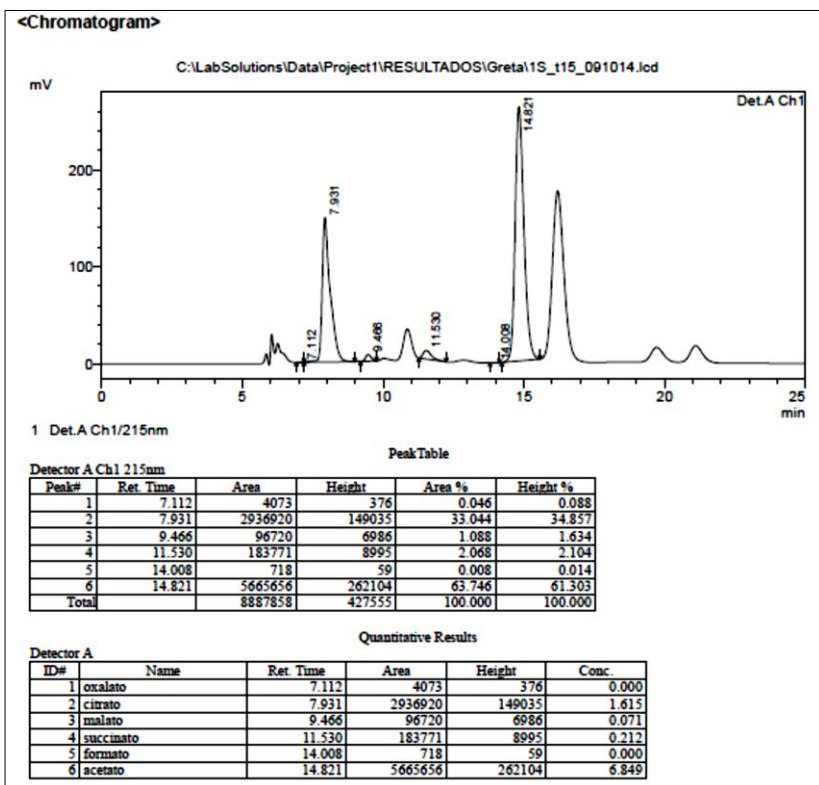


Figura A.9. Cromatograma sobrenadante cultivo con agitación acústica a 350 rpm (92 h^{-1}) $t=25 \text{ h}$.

A1.7.Limitación del uso del sensor óptico de oxígeno disuelto

La pérdida de contacto del sensor óptico de oxígeno PST3 adherido al fondo de los matraces ocasionó desviaciones en los valores de k_{La} , la más evidente se comportaba como el ejemplo en la Figura A.10 donde al iniciar la agitación el parche pasa a estar en contacto completo con la fase gaseosa, lo que se mediría como k_{La} es la velocidad que tarda el sensor en registrar el cambio de 0 a 100% de saturación con aire, lo que corresponde al tiempo de respuesta del sensor. Si usáramos los datos de la Figura A.10 para calcular el k_{La} obtendríamos que este vale $1266.4 \pm 85.1 \text{ h}^{-1}$, lo cual se aleja mucho de los valores obtenidos en condiciones de operación similares (Figura 6.1D).

Otro comportamiento observado fue la tendencia a un valor máximo de k_{La} en función de la velocidad de agitación a bajos volúmenes de llenado. Todas las mediciones que presentaran dichos comportamientos fueron descartadas para futuros análisis, y las condiciones bajo las cuales se sospechó que el parche no estuvo en completo contacto con la fase líquida se enlistan en el texto (Sección 6.1).

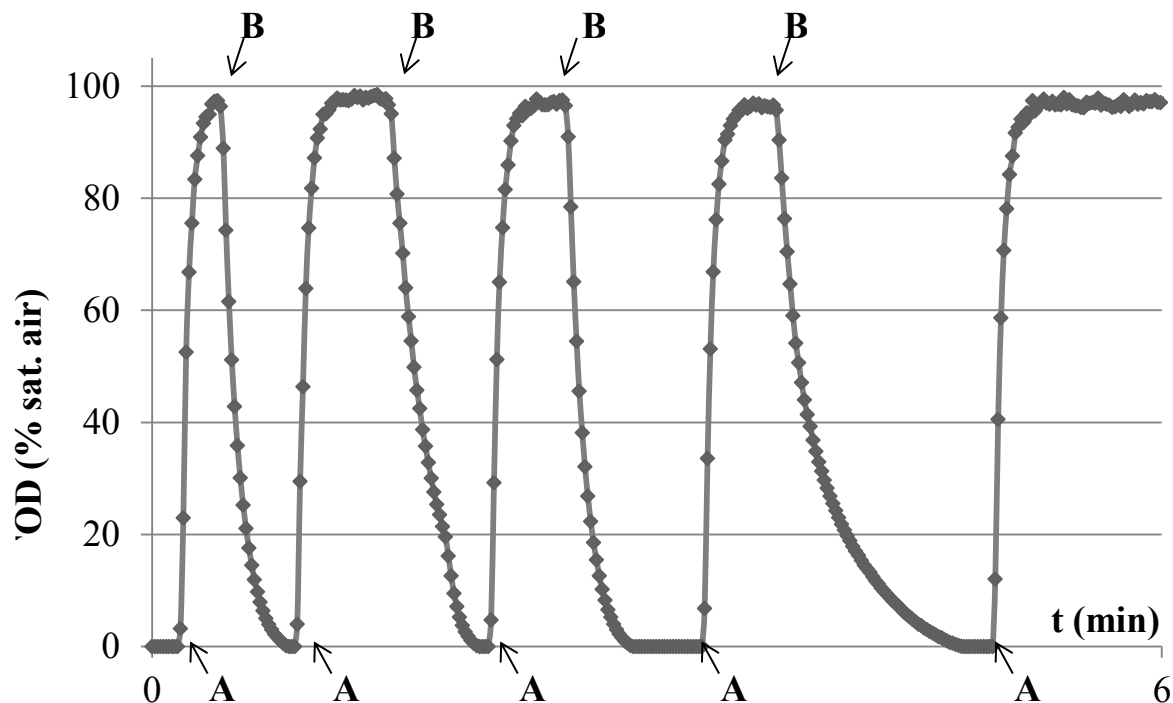


Figura A.10. Perfil de oxígeno disuelto de mediciones con el sensor óptico de oxígeno en contacto con la fase gaseosa ($V_N=250 \text{ mL}$; $V_F=10\%$ agua; $d_0=25 \text{ mm}$; $n=300 \text{ rpm}$; $T=37^\circ\text{C}$). Como se establece en la Sección A1.4 $t_{90}<6 \text{ s}$, y en este caso el tiempo que tomó al equipo registrar el cambio de 0 a 90% sat. aire estuvo alrededor de 6-7s.

ANEXO 2 Validación del modelo empírico para estimar el $k_L a$ en matraces agitados

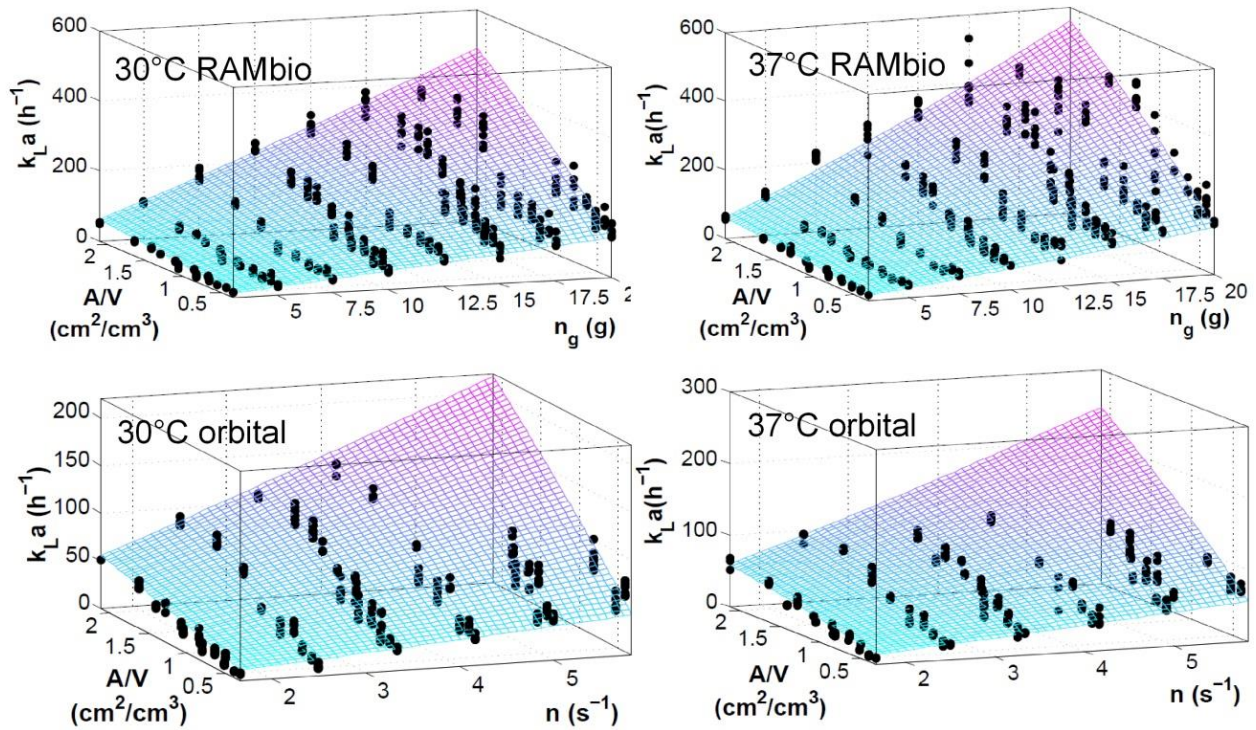


Figura A.11. Gráficos 3D de la validación de los modelos propuestos (Sección 6.2) el $k_L a$ se representa en función de los parámetros operacionales (n y A/V), donde las superficies coloreadas representan los modelos propuestos en comparación a los datos experimentales (puntos oscuros) para matraces agitados en los sistemas RAMbio y orbital.

ANEXO 3 Acumulación de ácidos orgánicos en el medio de cultivo

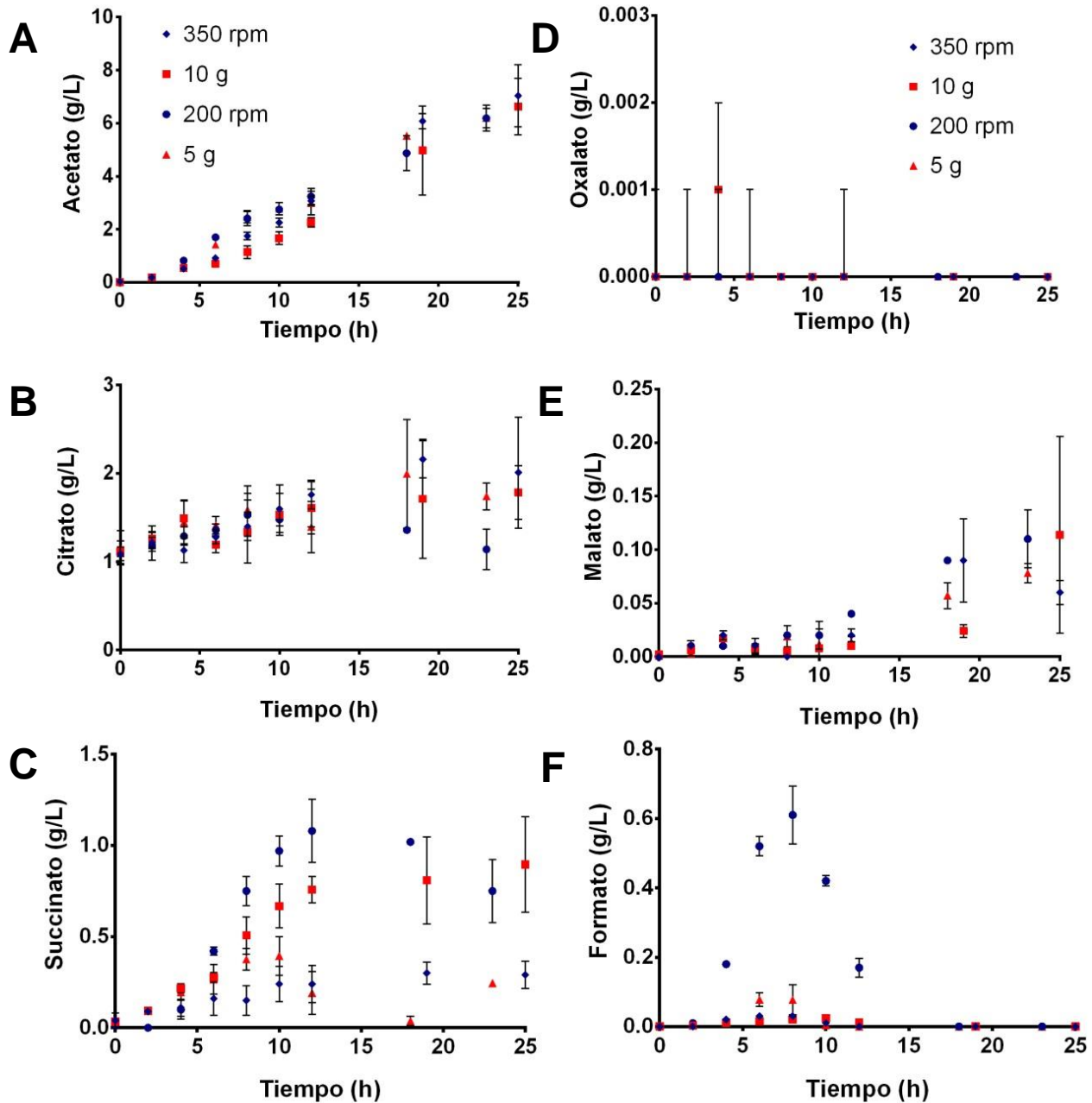


Figura A.12. Cuantificación de las sales de ácidos orgánicos mediante HPLC (Sección 5.8.2) durante el cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) rSMD en dos sistemas de agitación a dos diferentes valores de $k_L a$ inicial (46 y 92 h^{-1}) (Figura 6.7). (A) Acetato, (B) Citrato, (C) Succinato, (D) Oxalato, (E) Malato y (F) Formato.

ANEXO 4 Valores de k_{La} en matraces agitados por el sistema RAMbio usando tapones Oxyump con y sin el movimiento de fuelle

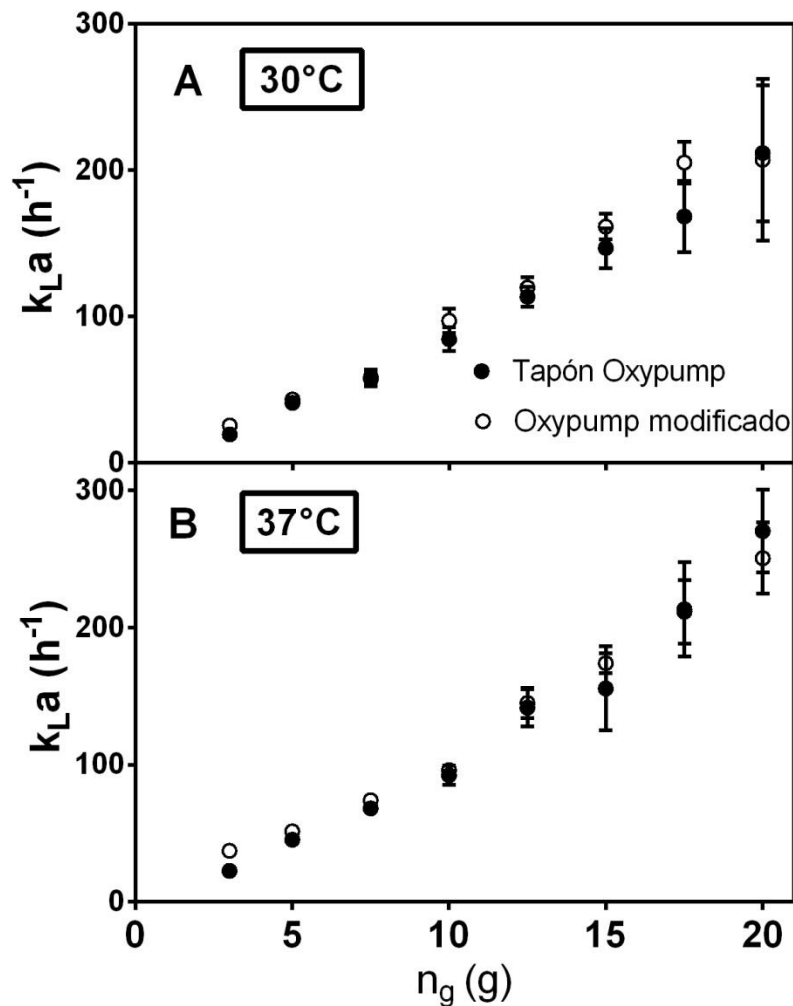


Figura A.13. Comparación de los valores de k_{La} en matraces agitados por el sistema RAMbio usando tapones Oxyump normales y modificados en función de la velocidad de agitación. Los tapones Oxyump modificados tienen el movimiento de fuelle cancelado, dicho movimiento participa en la transferencia activa de gases entre el interior del matraz y los alrededores, con el movimiento de oscilación generado por la resonancia mecánica. Los tapones con y sin modificación se observan en la Figura 5.1 A y B. Las mediciones de k_{La} se realizaron a (A) 30°C y (B) 37°C. Se muestran la media y la desviación estándar de al menos dos repeticiones.

ANEXO 5 Gel SDS-Page de la proteína total de *E. coli* BL21-Gold (DE3)

La SMD de la garrapata *B. microplus* tiene un peso molecular de 33.1 kDa. Dado que se producen pequeñas cantidades de SMD por garrapata, su producción recombinante es importante para el estudio de los mecanismos implicados en la alimentación de sangre de la garrapata, con el fin de desarrollar nuevos antiseros frente a esta proteína y el posible control contra las infestaciones de garrapatas (Castellanos-Mendoza *et al.* 2014).

Se tomaron muestras al final de la fase exponencial de crecimiento de los cultivos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD crecidos en el medio definido SM en diferentes condiciones de agitación. Las células se cosecharon por centrifugación y se lisaron con ciclos de sonicación. Para evidenciar la presencia de la producción de rSMD se llevó a cabo electroforesis en un gel de acrilamida al 15%, y los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250. La proteína se produce únicamente en presencia del inductor IPTG.

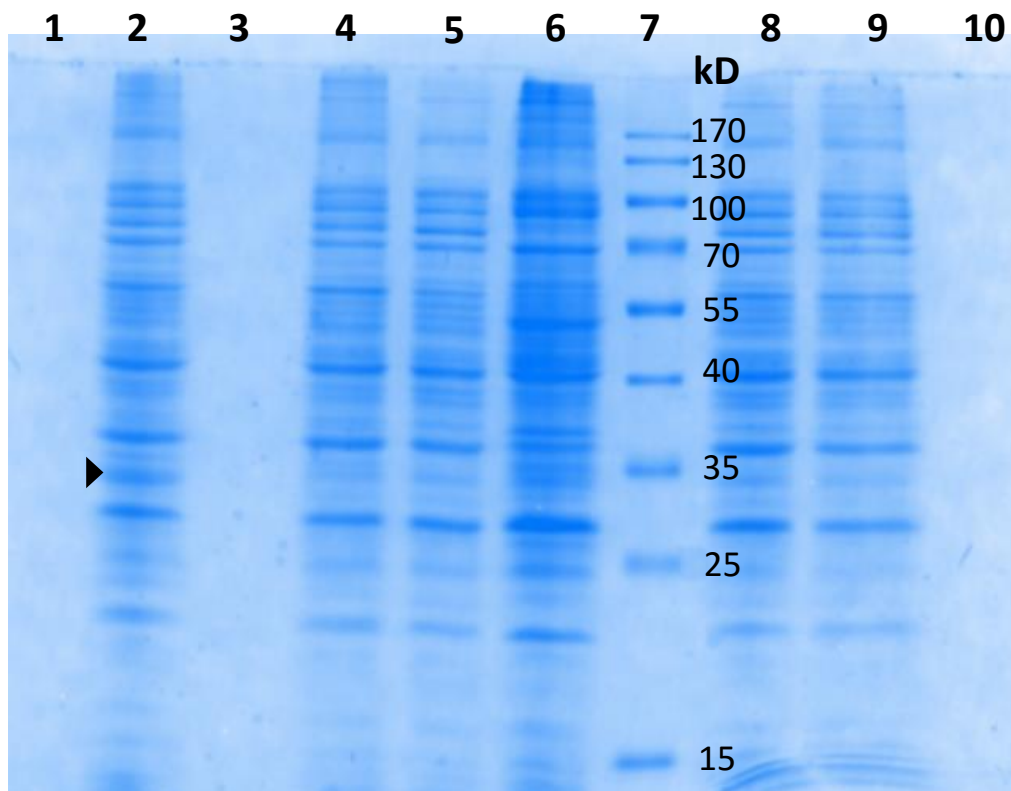


Figura A.14. Carriles: **1** /; **2** Control positivo (cultivo inducido con IPTG 0.1 mM, agitación orbital 350 rpm); **3** /; **4** Orbital 350 rpm; **5** RAMbio 10 g; **6** Control negativo (*E. coli* BL21-Gold (DE3) wild type, agitación RAMbio 10 g); **7** Marcador de peso molecular; **8** RAMbio 10 g (Tapón modificado); **9** RAMbio 12.5 g ($V_N=1000$ mL; $V_F=45\%$); **10** /.

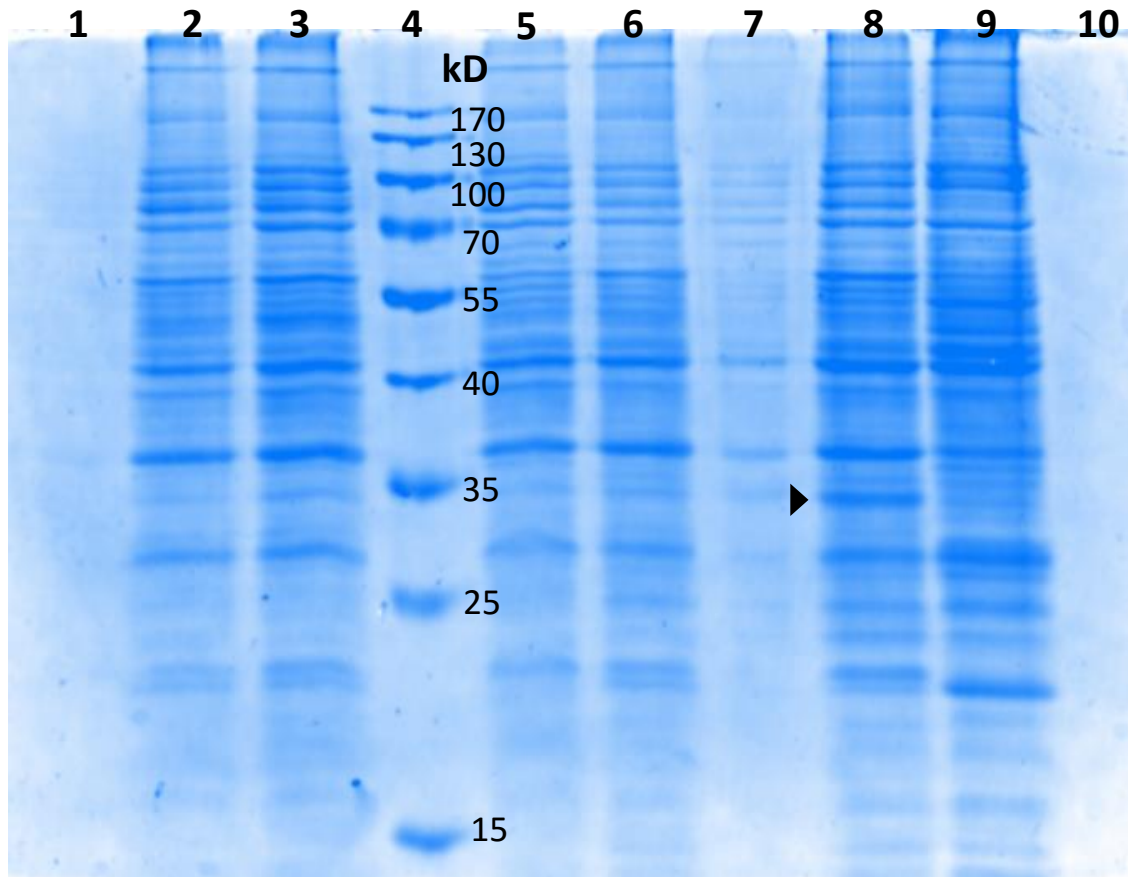


Figura A.15. Carriles: **1** /; **2** Orbital 200 rpm; **3** RAMbio 5 g; **4** Marcador de peso molecular; **5** RAMbio 10 g; **6** Orbital 350 rpm; **7** Orbital 350 rpm; **8** Control positivo (cultivo inducido con IPTG 0.1 mM, agitación orbital 350 rpm); **9** Control negativo (*E. coli* BL21-Gold (DE3) wild type, agitación orbital 350 rpm); **10** /.

ANEXO 6 Publicación de resultados

Como resultado de este trabajo se publicó el siguiente artículo, copia del cual se anexa a continuación:

Reynoso-Cereceda GI, Garcia-Cabrera RI, Valdez-Cruz NA, Trujillo-Roldán MA. (2016) Shaken flasks by resonant acoustic mixing versus orbital mixing: Mass transfer coefficient k_{La} characterization and *Escherichia coli* cultures comparison. *Biochem Eng J* 105(B):379-390 (Open Access: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X15300863>)



Shaken flasks by resonant acoustic mixing versus orbital mixing: Mass transfer coefficient $k_L a$ characterization and *Escherichia coli* cultures comparison

Greta I. Reynoso-Cereceda, Ramses I. Garcia-Cabrera, Norma A. Valdez-Cruz, Mauricio A. Trujillo-Roldán*

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70228, México, D.F. CP. 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2015

Received in revised form

18 September 2015

Accepted 19 October 2015

Keywords:

Mixing

Dissolved oxygen

Mass transfer

Microbial growth

Resonant acoustic mixer

Shaken flasks

ABSTRACT

Shaken flasks are widely applied in bioprocesses due to their flexibility and ease of operation. Resonant acoustic mixing (RAM) enables non-contact mixing by the application of low frequency acoustic energy, and is proposed as an alternative to solve oxygen limitations in orbital mixing (OM). The aim of this study is to experimentally determine empirical $k_L a$ correlations for RAM and compare it with OM by its measurement at different shaking frequencies, nominal flask volumes, and filling volumes. The maximum $k_L a$ here obtained were $131.3 \pm 5.1 \text{ h}^{-1}$ for OM and $435.4 \pm 11.7 \text{ h}^{-1}$ for RAM. Empirical correlations were validated for $k_L a$ as a function of shaking frequency and superficial area/filling volume ratio and rendered adequate values for the adjusted R^2 with an accuracy of $\pm 30\%$. Further, we compared the *Escherichia coli* kinetics of growth, glucose uptake, dissolved oxygen tension (DOT), and organic acids production in RAM and OM at two equivalent initial $k_L a$. Similar *E. coli* kinetics were observed at an initial $k_L a$ of 46 h^{-1} , but not at 92 h^{-1} where differences in DOT and culture parameters were found, mainly in growth rate and biomass yield on glucose, which is the result of different oxygen transfer rates due to the increased gas pressures in RAM.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Orbital shaken flasks are well established bioreactors mainly due to its flexibility, low cost and ease of operation; hence, they are

widely applied for screening experiments during the early stages of bioprocesses development, such as clone selection and determination of culture optimal conditions [1–3]. The insufficient supply of oxygen through the gas–liquid interface or/and the flask closure is a major deficiency in using orbital shaken flasks as culture bioreactors [1]. Since drastic effects on aerobic cultures (such as decreased metabolism, development of anaerobic metabolism or low production of desired metabolites) are often generated by differences in the availability of oxygen, changes in the operational conditions are needed in order to avoid oxygen limitation [1,4–8]. During microbial cultures, the available oxygen is given by Eq. (1), where the oxygen transfer rate (OTR) is defined as the rate of oxygen transferred through the gas–liquid interphase (liquid surface in shaken flasks) into the bulk liquid as described in Eq. (2), as follows:

$$\frac{dC_L}{dt} = \text{OTR} - \text{OUR} \quad (1)$$

$$\text{OTR} = k_L a (C_L^* - C_L) \quad (2)$$

where $(C_L^* - C_L)$ corresponds to the oxygen concentration gradient between the interfacial saturation and the liquid bulk, and the $k_L a$ is the volumetric mass transfer coefficient which is used to compare

Abbreviations: A, superficial area of the liquid at the inner diameter of the motionless flask, cm^2 ; a, b, c , coefficients for the empirical models specific for each agitation system; $\text{adj } R^2$, adjusted R -square; A/V , superficial area/filling volume ratio, cm^{-1} ; C_L^* , oxygen concentration at the interfacial saturation; C_L , oxygen concentration in the liquid bulk; d , maximum inner flask diameter, m ; d_0 , shaking diameter, cm ; DOT, dissolved oxygen tension, % air saturation; DOF, degrees of freedom; Fr, Froude number; a , acceleration of gravity, $\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$; $k_L a$, volumetric oxygen transfer coefficient, h^{-1} ; n , shaking frequency, s^{-1} ; Ph, phase number; RAM, resonant acoustic mixing; RMSE, root mean squared error; V_N , nominal volume, mL ; V_F , filling Volume, % liquid volume/nominal flask volume; V , villing volume, mL .

* Corresponding author at: Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70228, México City, D.F. CP. 04510, México. Fax: +52 5 6223369.

E-mail addresses: gretareynoso@gmail.com (G.I. Reynoso-Cereceda), ramses@biomedicas.unam.mx (R.I. Garcia-Cabrera), adrialvarez1@gmail.com (N.A. Valdez-Cruz), maurotru@gmail.com, maurotru@biomedicas.unam.mx (M.A. Trujillo-Roldán).

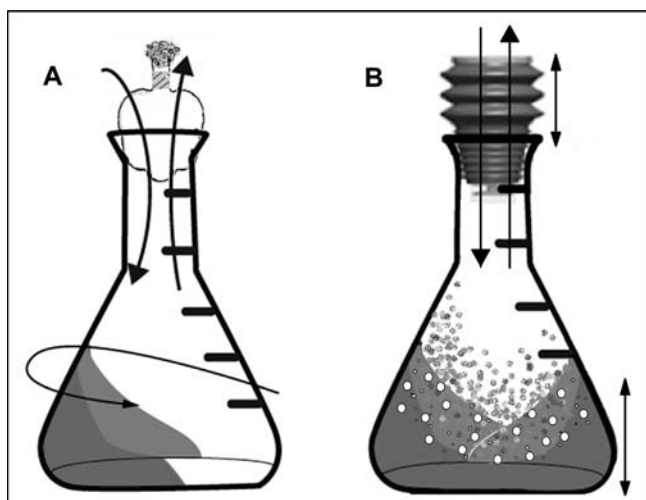


Fig. 1. Aeration of flasks shaken by two different systems. (A) Orbital movement in two dimensions, where the aeration of unbaffled flasks is accomplished only by diffusion [1,4]. The first resistance is through the plug, where the gas transfer occurs only by diffusion [13,32]; and (B) the RAMbio system oscillates in one dimension through low frequency acoustic resonance generating axial flow patterns; then, aeration is accomplished by diffusion, the entrapment of droplets that separate from the liquid bulk, and the formation of small bubbles [24]. The closure has an active participation, so the headspace is actually oscillated while mixing, creating a substantial driving force pumping gas molecules into and out of the flask [19].

the efficiency of bioreactors and their mixing devices, and also as an important bioprocess scaling-up criteria [8–11]. The empirical correlations for the prediction of the $k_{L,a}$ in orbital shaken flasks are based on considering the operational parameters, for example the shaking frequency, the internal diameter of the flask, the filling volume, and the shaking diameter, along with the physicochemical properties of the liquid [8,10,12,13].

Oxygen limitation occurs when the oxygen uptake rate (OUR), which depends on the specific oxygen uptake rate and the biomass concentration, exceeds the oxygen transfer rate (OTR) (Eq. (1)). This situation was previously difficult to avoid in shaken flasks, since monitoring in small-scale bioreactors required the development of suitable technologies [3,8]. Nowadays, this limitation has been overcome, and technologies like the RAMOS device for OTR online recording [14,15] or the optical oxygen probes for DOT in-situ measurements [6,9,16], have proven its worth for evaluating the role of oxygen availability during screening experiments, along with a deeper study of the mass transfer phenomena and successful scale-up strategies.

New mixing technologies should be evaluated as an alternative to solve oxygen transfer limitations in orbital shaken flasks. The resonant acoustic mixing (RAM) is a non-contact mixing technology, that induces a low-frequency acoustic field to facilitate mixing through mechanical resonance [17,18]. This newly introduced technology has potential for mixing multiphase systems, as was recently evaluated for powders homogenization using low concentration of active pharmaceutical ingredient (acetaminophen, 3% w/w) and lubricant (magnesium stearate, 1% w/w). A highly efficient mixing performance was achieved by taking less mixing time to reach better blend homogeneity when compared to other batch blenders [18].

Introducing RAM to biotechnology begins with the RAMbio system (RAMbio®, Applikon® Biotechnology, Foster City CA, USA) which was designed to mix microbial cultures grown in flasks (Fig. 1), and provide them with plenty of oxygen when used along with the standard flexible silicone plugs (Oxy-Pump® stoppers by Applikon Biotechnology®). Those stoppers are capable of keeping the media inside the flask, with a membrane at the top through

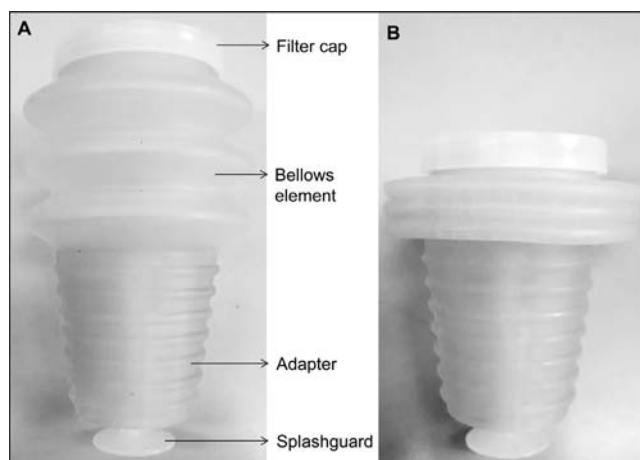


Fig. 2. Oxy-pump stoppers. (A) These silicone plugs, are comprised of four main parts with specific functions. The special design of the plug intends to enhance gas exchange within the flask, while preventing airborne particles from contaminating the culture and droplets from escaping from the flask. (B) Modified Oxy-pump stoppers with the bellows element fixed, consequently the pumping movement is cancelled.

which air and gases are filtered (Fig. 2A). Hence, the mixing and aeration mechanisms differ with those from the orbital mixing (Fig. 1). Scientific information regarding the performance of the RAMbio system is scarce, and just a few technical notes have been published [17]. Performance of *Escherichia coli* K12 expressing Green Fluorescent Protein (GFP) was compared in shaken flasks (at both 20% and 40% medium volume/nominal volume) using an orbital shaker mixer (and Whatman Bugstopper closures with a shaking diameter of 1.9 cm) against a RAMbio acoustic mixer (and Oxy-pump® stoppers) for batch growth and protein production in rich media. Moreover, this technical report claimed that the RAM mixer at 20 g and the orbital mixer at 400 rpm are equivalent, lacking any engineered criteria [17]. At the end of cultures, the use of the RAM mixer resulted in an improved growth and biomass production (measured by optical density at 600 nm), as well as in an increased protein production (monitored by flow cytometry), versus traditional orbital shaken flask cultures.

The aim of this paper is to quantitatively compare the mass transfer phenomena in shaken flasks, particularly the oxygen transfer coefficient ($k_{L,a}$), in both mixers, the resonant acoustic mixer and the orbital mixer, as a function of the main operational conditions, including the shaking frequency, the flask geometry and the filling volume. Moreover, to compare the two mixing approaches based on the same initial $k_{L,a}$, *E. coli* cultures were carried out to evaluate growth kinetics, glucose consumption, dissolved oxygen tension (DOT), and acetate production profiles. In the present work, we introduce the first approximation to the understanding of the oxygen transfer phenomena in resonant acoustic shaken flasks.

2. Materials and methods

The experiments conducted during this work were performed in conventional Erlenmeyer flasks (unbaffled, Duran®, Erlenmeyer flask, narrow neck, Borosilicate Glass, USA) shaken by two different agitation systems; the resonant acoustic mixing in comparison with an orbital mixer.

2.1. Resonant acoustic mixing

The resonant acoustic mixer: RAMbio (Applikon® Biotechnology, Foster City CA, USA) operates by applying low frequency (58–66 Hz), high intensity acoustic field to induce oscillation at res-

Table 1
Representative dimensions of the Erlenmeyer glass flasks (Duran®) used through the experimentation.

Nominal volume (mL)	Maximum flask diameter ^a	Maximum neck diameter ^a	Neck height ^a	Total height ^a	Glass thickness ^a
250	85	40	54	165	1.5
500	105	34	36	180	
1000	131	42	46	223	

^a Dimensions are given in mm.

onance. Working at the resonant frequency allows potential energy to be stored in springs and efficiently transferred to two balanced plates where the flask clamps are located. The acoustic wave generates micro-mixing zones throughout the flask while facilitating the bulk movement of the culture. The device acceleration can be adjusted from 3 to 20 g (29.4–196 m.s⁻²).

The RAMbio was operated using the Oxyump® stoppers (Fig. 2A). These silicone plugs, are comprised of four main parts. First, the splashguard maintains liquid contents under vigorous agitation inside the flask without wetting the filter cap. The adaptor keeps the closure attached to the flask neck in a secure fashion. The bellows element works by pumping gases while oscillating and repeatedly changing the flask headspace content. Finally, the filter cap on the top, which is a hydrophobic gas-permeable barrier (0.2 μm) is intended to exclude small particles and/or microorganisms [19].

2.2. Orbital mixing

For comparison, a traditional orbital shaker (New Brunswick Scientific C251, Eppendorf, Inc. CT, USA) was operated with a shaking diameter of 25 mm, from 50 to 350 rpm. Cotton plugs were used as closures for the flasks, which are extensively used in the literature [1,4–7,12–14], and were made manually with equal amounts of gauzes and cotton. Plug weights were: 6.16 ± 0.16 g (250 and 500 mL flasks) and 8.21 ± 0.15 g (1000 mL flasks). The respective density of the cotton plugs was around 0.1–0.2 g/cm³.

2.3. Volumetric mass transfer coefficient (k_La) measurements by the gassing-out method

Three different nominal volumes of conventional Erlenmeyer glass flasks were used (250-, 500- and 1000-mL, Duran®). The necks of the flasks were modified to fit the Oxyump® stoppers, dimensions are shown in Table 1.

We choose the use of water–air and the gassing-out method as a universal approach to describe the mass transfer capabilities of the RAM system, compared to orbital mixing.

For this, each flask was filled to working volume (10, 15, 20, 25 or 40% deionized water volume/nominal flask volume). Then, oxygen was removed from water by adding Na₂SO₃ with CoCl₂ as catalyst to achieve a final concentration under 6 × 10⁻³ M and 5 × 10⁻⁷ M, respectively. The sulphite oxidation reaction was used for displacing dissolved oxygen in the liquid phase, and the k_La measurement took place only when the oxidation reaction was over, hence the impact of the reaction kinetics was not considered [20]. The mixer was started once assuring oxygen-free water, and dissolved oxygen tension (DOT) was recorded online, as described above in Section 2.4. All experiments were conducted at 30 °C and 37 °C.

The mass transfer coefficient (k_La) was obtained as the resulting linear slope by plotting the logarithmic expression against time, as shown in Eq. (3); this expression results after integration of Eq. (1) (between two different times), considering OTR as described in Eq. (2) and being OUR = 0 [11,21].

Since Eq. (3) is valid for a linear response, only data measured between 10 and 60% DOT were used for k_La estimation. It is worth

noticing that the optical sensor (Section 2.4) renders higher sensitivity at DO levels below 60% [6].

$$\ln \left(\frac{C_L^* - C_{L2}}{C_L^* - C_{L1}} \right) = -k_La \times (t_2 - t_1) \quad (3)$$

For flasks with orbital shaking, all conditions tested met the criteria of an in-phase operating system, as we evaluated the Ph and Fr number under all operational conditions in order to avoid out-of-phase operation, which is accompanied by strong decreases in power input, mixing performance, and mass transfer [22].

2.4. Dissolved oxygen tension (DOT) measurements

DOT measurement for k_La estimation and during *E. coli* cultures was recorded online with the oxygen optical meter Fibox 3 using a PST3 sensor (PreSens, Regensburg, Germany). The sensor was attached to the bottom of each Erlenmeyer flask, which was placed over a coaster [9,16]. The contact of the optical sensor with the liquid phase depends on its position inside the flask. For our experiments, the patch was placed at the bottom near the wall flask, and the respective distances from the patch to the flask bottom center were: 19 mm (250 mL flask), 28 mm (500 mL flask), and 40 mm (1000 mL flask). We were careful not to lose contact of the sensor with the liquid phase. A special clamp arrangement was designed under each flask, so the coaster was located around 2 mm distance below the sensor patch in one of each orbital or acoustic shaker. The optical sensor was calibrated to read 0% DOT with a solution of Na₂SO₃ (0.3 M) and CoCl₂ (≤ 5 × 10⁻⁷ M); and 100% DOT with water aerated in the respective shaker (following the supplier's methodology of calibration).

The response time of the sensor (t_r) t_{60} (0–60% air sat.) is ~3 s. Assuming a first order dynamic response of the electrode, characterized by a constant time, a simple criterion for the suitable selection of the electrode usually is: $t_r < 1/k_La$ [20]. The truncation of the first part of the electrode response curve helps for applying the first-order approximation [21]. Therefore, we discarded data below 10% air sat. in order to ensure we met the aforementioned criteria for all k_La measurements. Furthermore, changes in DOT profiles of microbial cultures took several minutes, hence, the response time of the electrode was fast enough and no considerations on these measurements were needed.

2.5. Use of an empirical correlation for k_La estimation in orbital shaken flasks

The empirical correlation reported by Klöckner and Büchs [8] (Eq. (4)) was used for the evaluation of k_La . This correlation was made by measuring OTR using a 1 M sodium sulphite system as a chemical oxygen consumer:

$$k_La_{\text{Sulf}} = 3.212 \cdot 10^{-4} \times d^{1.92} \times n^{1.16} \times d_0^{0.38} \times V^{-0.83} \quad (4)$$

where the operating parameters are considered in SI units; maximum inner shake flask diameter (d) [m], shaking frequency (n) [s⁻¹], shaking diameter (d_0) [cm], and filling volume (V) [m³].

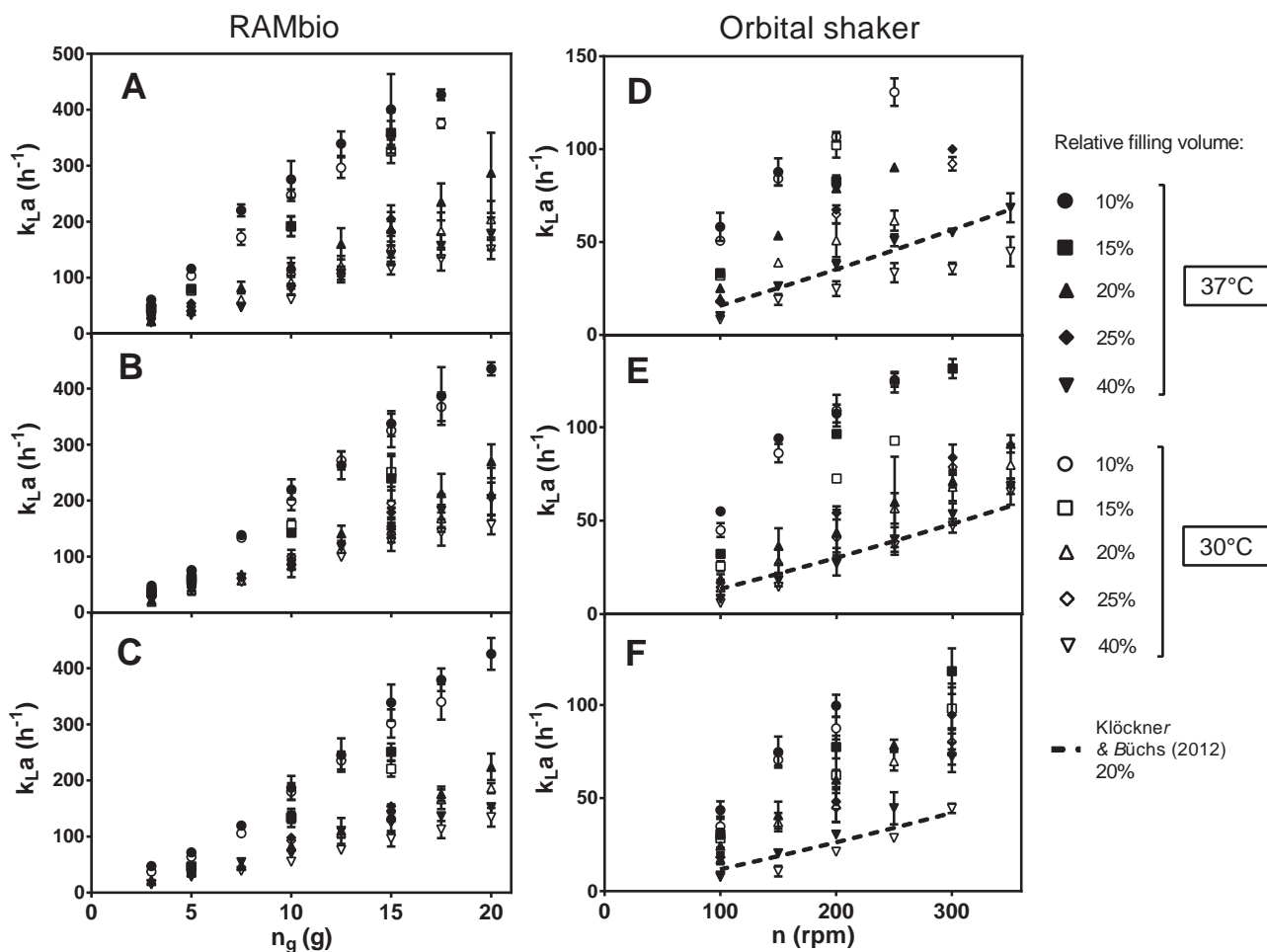


Fig. 3. k_{La} values of flasks shaken by two different agitation systems, obtained with different flask sizes and varying the relative filling volume, at 30 and 37 °C. Nominal volumes of the flasks shaken by resonant acoustic mixing (A) 250-mL, (B) 500-mL and (C) 1000-mL; and by orbital mixing (D) 250-mL, (E) 500-mL and (F) 1000-mL. Mean and standard deviation of at least three independent experiments are shown.

Table 2
A/V ratios of the flasks used with different filling volumes. Where A refers to the superficial area (cm^2) of the liquid at the maximum inner flask diameter in motionless condition; and V refers to the filling volume (cm^3).

V_N (mL)	250					500					1000				
V_F (% v/v)	10	15	20	25	40	10	15	20	25	40	10	15	20	25	40
V (mL)	25	37.5	50	62.5	100	50	75	100	125	200	100	150	200	250	400
A/V (cm^2/cm^3)	2.11	1.41	1.06	0.84	0.53	1.63	1.09	0.82	0.65	0.41	1.29	0.86	0.64	0.51	0.32

V_N : nominal volume.

V_F : filling volume (deionized water volume/nominal flask volume).

2.6. Empirical correlations for k_{La} estimation in shake flasks

The empirical correlations of k_{La} based on the operational parameters were obtained using MATLAB R2012b software as well as the goodness of fit comprising: the adjusted R -square (adj R^2), the Root Mean Squared Error (RMSE), and the degrees of freedom (DOF). The operational parameters considered were the shaking frequencies, and the A/V ratio, where A refers to the superficial area of the liquid at the inner diameter of the motionless flask (cm^2); and V refers to the filling volume (cm^3).

2.7. Culture conditions of *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD and culture media

The biological model used was a recombinant strain of *E. coli* BL21-Gold (DE3)-rSMD [23] maintained at -70°C in Luria-Bertani

(LB) (grams per liter: tryptone, 10.0; yeast extract, 5.0 and NaCl 5.0), supplemented with 50% v/v glycerol.

All cultures were performed in 500-mL flasks with 100 mL of semi-defined medium (SM) at 37 °C, unless otherwise mentioned. The culture media was prepared as previously described somewhere else [24,25] with some modifications. SM composition in grams per liter of distilled water was: glucose, 10.0; Na_2SO_4 , 2.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.7; NH_4Cl , 0.5; K_2HPO_4 , 19.0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5.2; Citric acid, 1.0; MgSO_4 , 0.24; thiamine, 0.01; and casamino acids, 2.0 and mineral salts. The pH of the culture medium was set to 7.0 ± 0.1 with HCl 2 N and sterilized at 121 °C for 20 min. Separately sterilized stock solutions of glucose, MgSO_4 and mineral salts were added to the medium once it was cold. Ampicillin was supplemented to a final concentration of 50 mg/L. Thiamine, casamino-acids and ampicillin stock solutions were filter sterilized ($0.22 \mu\text{m}$), and added to the medium just before the inoculum. The

Table 3

Coefficients of the empirical models (Eq. (4)), and goodness of fit (DF, adj R^2 and RMSE) for $k_L a$ estimation in shaken flasks, as function of the shaking frequency (g, rps) and the A/V ratio, with RAM and orbital shaking at 30 and 37 °C.

Agitation system	T (°C)	a	b	c	DF ^a	adj R^{2b}	RMSE ^c
RAM	30	10.570	1.089	0.771	544	0.908	29.0
Orbital		16.610	1.087	0.872	317	0.832	12.4
RAM	37	9.881	1.161	0.745	510	0.926	30.4
Orbital		18.350	1.140	0.788	313	0.863	12.0

^a Degrees of freedom.

^b Adjusted R -square.

^c Root mean squared error.

final composition of the mineral salts in the medium was (in milligrams per liter): $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.74; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.18; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.10; $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 22.25; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 16.7; CuSO_4 , 0.10; and $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.18.

Inoculum culture was grown in SM with 4% v/v of LB, instead of casamino-acids, and ampicillin concentration of 100 mg/L. The flasks were incubated at 30 °C with orbital shaking (200 rpm), and after 16–18 h the culture broth was centrifuged ($12,100 \times g$, 15 min), suspending the cells in SM fresh medium. Enough volume of this suspension was taken using a sterile pipette to start all cultures with an optical density (OD) of 0.25–0.3 A.U. at 600 nm.

For evaluation of the Oxy pump stoppers role on the microbial culture performance, an *E. coli* culture was developed as described above. The flask shaken by the RAMbio system had a modified stopper where the pumping movement of the bellows element was cancelled as shown in Fig. 2B.

2.8. Cell concentration, quantification of glucose and extracellular metabolites

Growth of the transformed and uninduced *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD was followed by optical density (OD) at 600 nm (Spectronic Genesys 20, Thermo USA), samples were diluted when OD values were higher than 0.7, where 1 OD was equivalent to 0.50 g dry cell weight per liter [23].

Organic acids and glucose were detected from 1 mL centrifuged ($17,900 \times g$, 15 min) sample of the culture broth. Samples for pH kinetic measurements were also taken (Corning, pH meter 430, USA).

Concentration of organic acids (acetate, oxalate, citrate, malate, succinate, and formate) was determined by high-pressure liquid chromatography (HPLC) analysis; HPLC (Shimadzu, Japan) using an AminexHPX-87H column (Bio-Rad Hercules, CA) equipped with an UV detector. Quantification was made running a commercial standard (Bio-Rad Hercules, CA) as established by the supplier. A mobile phase of 4 mM H_2SO_4 was used at 0.6 mL/min, and run at 30 °C; wavelength UV detector set at 215 nm. Glucose and lactate concentrations were measured using the Biochemistry Analyzer YSI2900 (YSI Life Sciences, USA).

2.9. TEM analysis

Morphology of *E. coli* was analyzed under transmission electron microscopy. Cell samples were taken at exponential phase of growth culture, washed three times with 0.16 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2 at 4 °C, fixed with 4% v/v paraformaldehyde and 2.5% v/v glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer pH 7.4 during 2 h at 4 °C. Post-fixed samples with 1% v/v osmium tetroxide during 90 min at 4 °C were rinsed twice in chilled buffer and six times in cold distilled water. Then, samples were dehydrated in ethanol series and embedded in Epon/Araldite [26]. Thin sections were stained with uranyl acetate and lead in citrate, and observed with a ZEISS Libra 120 plus electron microscope.

2.10. Statistical analysis

The *E. coli* cultures were made at least in duplicate. Two-way ANOVA for independent samples and multiple comparisons tests using Tukey (Test for Post-ANOVA) with a threshold significance level of 0.05 were carried out to estimate the statistical differences between the cultures parameters, considering as independent variables the agitation system and the initial $k_L a$. The analyses were done using GraphPad Prims 6.01 (2012).

3. Results and discussion

3.1. $k_L a$ in flasks shaken by RAMbio and orbital mixer

The $k_L a$ values were determined in flasks shaken by the RAMbio system against the orbital mixer under different operational conditions, in order to get a better understanding of the oxygen transfer phenomena with resonant acoustic mixing. Measurements were performed by varying the shaking frequencies (3–20 g and 100–350 rpm with RAM and orbital, respectively), the nominal flask volumes (250-, 500- and 1000-mL), and the filling volumes (10, 15, 20, 25 and 40% deionized water volume/nominal flask volume), at 30 and 37 °C.

The measured $k_L a$ values in function of the shaking frequency are presented in Fig. 3. Under all tested conditions, the RAM system achieved higher $k_L a$ values than those obtained with the orbital shaker. For example; in the 500-mL flask with 20% of filling volume at 37 °C, the acoustic mixer achieved a $k_L a$ value of $270.3 \pm 30.2 \text{ h}^{-1}$ (Fig. 3B), while the orbital shaker rendered $91.1 \pm 4.7 \text{ h}^{-1}$ (Fig. 3E). This could be explained by the extra mechanisms of aeration under the resonant mixing condition with acoustic wave comprising axial flow patterns, allowing the formation of drops in the headspace of the flask, and micro sized bubbles trapped in the fluid, which easily generate an increased gas–liquid interfacial area [27]. Nevertheless, a wider comparison of the RAM and the orbital mixing systems would require taking into account the volumetric power input, and the fluids hydrodynamics. In the literature, higher values of $k_L a$ for orbital shaken flask (unbaffled) can be found, but these values are obtained considering exceptional operational conditions, such as higher shaking diameters and lower filling volumes. For example, a $k_L a$ value of 565.2 h^{-1} has been reported for a 50-mL flask with a relative filling volume of 4% (sulphite solution), with a shaking frequency of 450 rpm, and a shaking diameter of 7 cm [28]. The maximum $k_L a$ values here obtained for the orbital shaker were $131.3 \pm 5.1 \text{ h}^{-1}$ in the 500-mL flask with a relative filling volume of 15%, and a shaking frequency of 300 rpm at 37 °C (Fig. 3E); whereas for the resonant acoustic mixer a value of $435.4 \pm 11.7 \text{ h}^{-1}$ was obtained in the 500-mL flask with a relative filling volume of 10% at 20 g and 37 °C (Fig. 3B). Higher $k_L a$ values were not further measured due to the loss of contact between the patch (a PSt3 sensor attached to the flask bottom: Fibox 3 by PreSens, Regensburg, Germany) and the liquid phase while mixing. This depends on the patch position inside the flask [29], and occurred while working in specific operational conditions, including orbital mixing: the

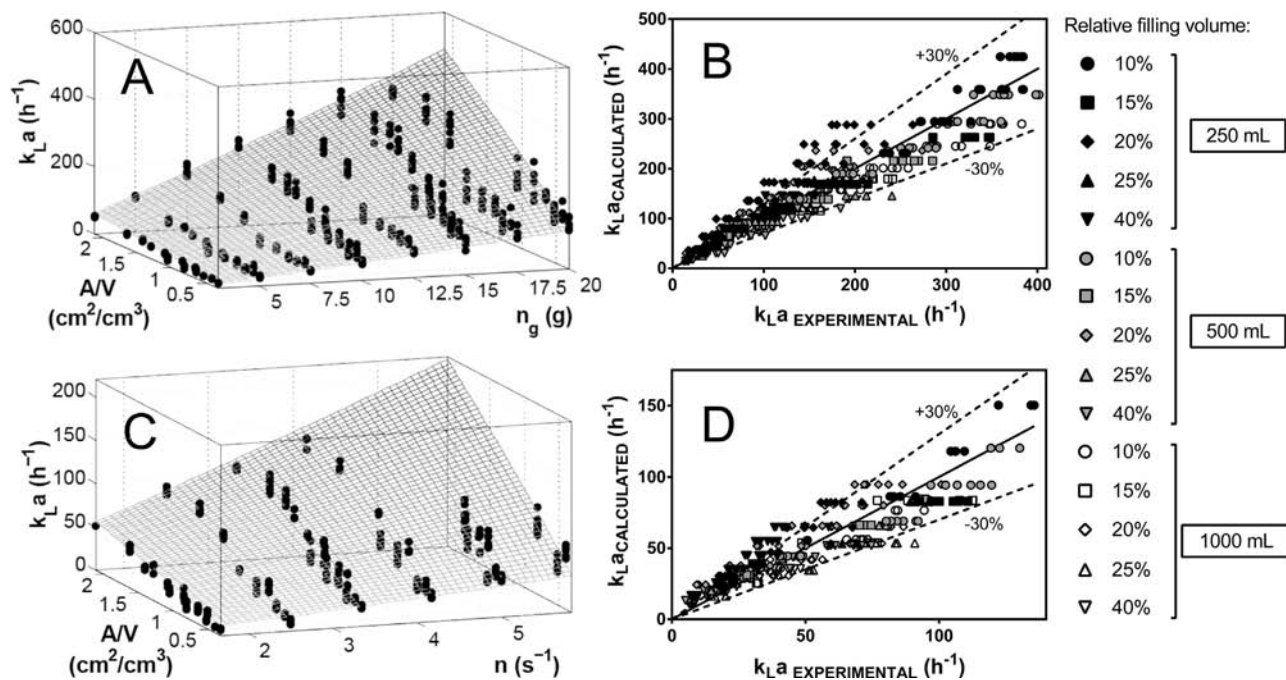


Fig. 4. Validation of the empirical model proposed for k_{La} estimation in shaken flasks at 30 °C. In the 3D graphics, the k_{La} is a function of the main operational parameters (n and A/V) where the proposed model is represented by the surface, and its comparison with the experimental data, the dark dots; is presented for flasks shaken by (A) a RAM (an interactive version of this plot can be found on the online version) and (C) an orbital mixer. Calculated k_{La} against measuring k_{La} values are also shown for shaken flasks with (B) RAMbio and (D) orbital mixing; for different flask sizes: 250-, 500- and 1000-mL, 10–40% relative filling volumes, 3–20 g and 50–350 rpm shaking frequencies, at 30 °C; k_{La} was determined with the gassing-out method as described in Materials and methods.

250 mL flask ($V_F = 10\%$ higher than 250 rpm, $V_F = 15\text{--}20\%$ higher than 300 rpm), the 500 mL flask ($V_F = 10\%$ higher than 300 rpm) and the 1000 mL flask ($V_F = 10\%$ higher than 250 rpm). Whereas, at 20 g in the 250 mL flasks ($V_F = 10\%$) the loss of contact with the patch occurred in the RAM. This limitation in measuring the DOT in shaken flasks by the optical sensor probes was previously reported at high shaking frequencies and low filling volumes [29]. In *E. coli* BL21-pET28a cultures high values of DOT were observed using the optical probe, while a full development of oxygen limitation was detected by OTR measurement by the RAMOS device, which implied an interaction between the oxygen probe and the flask headspace [29].

The k_{La} values measured in orbital shaken flasks are comparable to those predicted by a previously reported model [8] for each flask at 20% of relative filling volume (Fig. 3B and E–F). The experimental values of k_{La} obtained were around 1.6 and 2.0 times higher, at 30 and 37 °C, respectively, than those predicted; with the values being greater at the highest shaking frequencies. Those differences rely firstly on the methodology used to determine the k_{La} : the reported model was validated using the RAMOS device which establishes a balance of gas pressure in the headspace of the flasks [4,5]; while in this work we measured the DOT. Furthermore, other variables have to be taken into account, such as the geometry of the flask neck, the gas diffusivity through the cotton plugs, and the physicochemical features of the liquid (the model was obtained for a 1 M sodium sulphite system at 22.5 °C).

3.2. Influence of the operational conditions on the k_{La}

From Fig. 3 it is clear that the k_{La} increases with the shaking frequency for both agitation systems. As previously reported, the gas–liquid transfer area, for orbital shaken flasks, includes the surface exposed to the surrounding air and the film on the flask wall. At high shaking frequencies, the centrifugal force increases and higher the water crawls higher to flask wall [28]. Upon increasing agitation

intensity the liquid-side boundary layer thickness and therefore, the mass-transfer resistance decreases and the gas–liquid mass-transfer rate reaches higher values. This seems to be true also for RAM shaken flasks, including the aforementioned development of droplets and small bubbles. The influence of the flask geometry was evaluated by varying the flask nominal volume; when this was incremented, the k_{La} increased as well. Conversely, increasing the filling volume causes the reduction of this coefficient. The aforementioned effects have been widely discussed before for orbital shaken flasks [4,12,13,30,31], and herein were observed for the RAM system.

We looked for a practical model that allowed comparing the aeration capacity of the RAM system to the traditional orbital mixing. This first approximation would help in establishing the RAM operating conditions in order to achieve non-limiting oxygen cultures when the needs for oxygen of the biological model are known.

We used the A/V ratio as the variable that groups together both effects the flask geometry and the filling volume (Table 2). Hence, the effects of A/V and n (given in g or rps) over the k_{La} were quantified using empirical models. We kept the model simple with the best fitting of all data, represented by Eq. (5), where a , b and c are specific coefficients for each agitation system, and their values are listed in Table 3.

$$k_{La} = a \times n^b \times \left(\frac{A}{V}\right)^c \quad (5)$$

The values for the b coefficient are near 1.1, which is consistent with previous reports for k_{La} in orbital shaken flasks, where this coefficient is between 1.0 and 1.4 [8,12,13,30,31]. Besides, Eq. (5) is in good agreement with existing models; a narrow comparison is available in Fig. S1. As already discussed, differences are expected due to the specific operating and physicochemical conditions of each system. Interestingly, the values for the b and the c coefficients were very close between the RAM and the orbital system, suggesting a similar impact of each of the evaluated operational

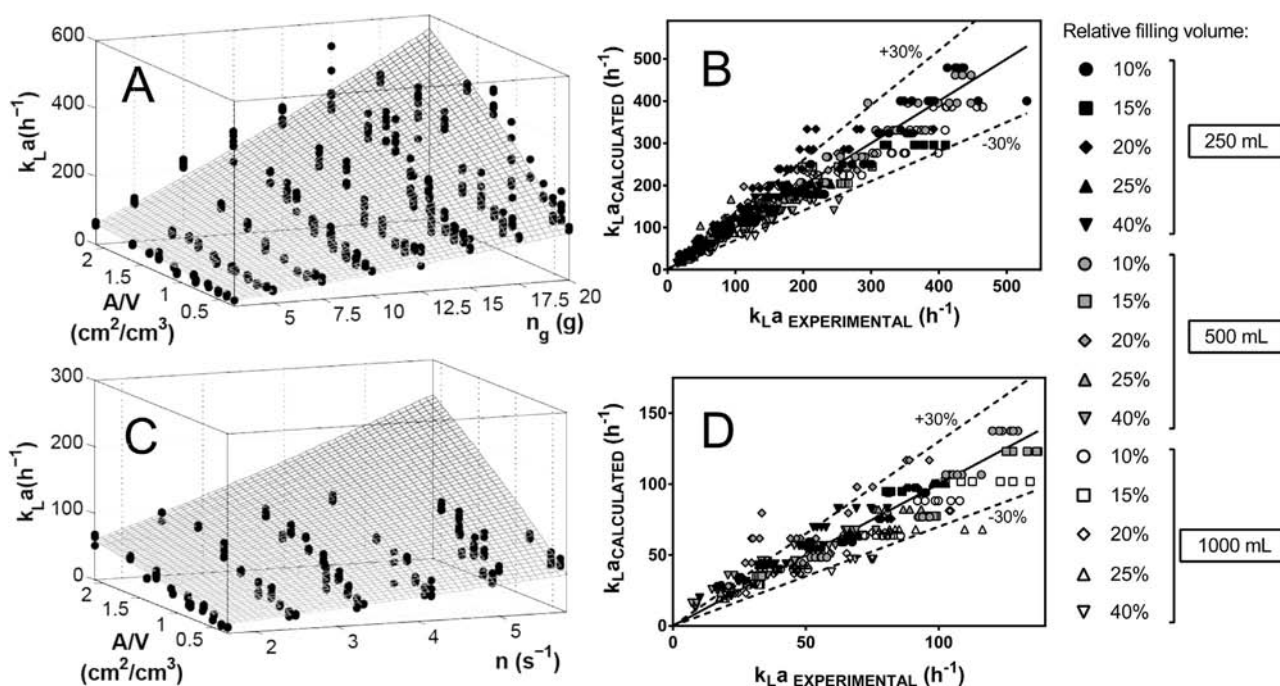


Fig. 5. Validation of the proposed empirical model for $k_{L,a}$ estimation in shaken flasks at 37 °C. In the 3D graphics, the $k_{L,a}$ is a function of the main operational parameters (n and A/V) where the proposed model is represented by the surface, and its comparison with the experimental data, the dark dots; is presented for flasks shaken by (A) a RAMbio and (C) an orbital mixer. Calculated $k_{L,a}$ against measuring $k_{L,a}$ values are also shown for shaken flasks with (B) RAM and (D) orbital mixing; for different flask sizes: 250-, 500- and 1000-mL, 10–40% relative filling volumes, 3–20 g and 50–350 rpm shaking frequencies, at 37 °C; $k_{L,a}$ was determined with the gassing-out method as described in Materials and methods.

parameters over the $k_{L,a}$, even when the aeration mechanism in each system is completely different.

The models proposed in function of the operational parameters are represented in 3D plots in addition to their validation as a comparison of the measured against calculated $k_{L,a}$ values. They are shown for each system at 30 °C in Fig. 4 (4A–B for the RAM system, 4C–D for the orbital system), and at 37 °C in Fig. 5 (5A–B for the RAM system, 5C–D for the orbital system). An interactive plot of Fig. 4A is available in the online version of this manuscript (Fig. S2). The models describe a positive interaction between the shaking frequency and the A/V ratio, and are fairly consistent with the experimental data for $k_{L,a}$ estimation in shaken flasks as it is observed in the plots of Figs. 4 and 5, in addition to the goodness of fit (Table 3), covering high and adequate values for the adjusted R^2 along with the Root Mean Squared Error (RMSE) that was equal or less than 30% for each agitation system. On the other hand, data at 30 and 37 °C had to be fitted separately based on the statistical analysis that established significant differences between both temperatures. The evaluation of the $k_{L,a}$ under two temperatures is not enough to include the temperature effect in the empirical model, but it does help to visualize the effect of this parameter under common laboratory conditions for microbial growth.

On the other hand, several outliers at low $k_{L,a}$ values (>30%) are observed (Figs. 4 and 5). When the filling volumes are low ($\leq 15\%$) and the A/V is high, the $k_{L,a}$ increased faster with the shaking frequency than when higher filling volumes are used (Fig. 3). Using the A/V ratio helped in diminishing those differences, but it seems the model could underestimate the $k_{L,a}$ values when lower A/V are used, mainly in the RAM system. These differences could be caused by the flow patterns formed that might be similar at higher accelerations, but different at lower accelerations [18].

Improving RAM performance for oxygen transfer would imply designing other geometries able to enhance the contact between gas–liquid phases, where hydrodynamics of the RAM system need to be taken into account.

3.3. *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD cultures in flasks shaken by RAM and orbital systems

We studied the influence of the aeration mechanisms in shaken flasks over transformed (uninduced) *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD growth, glucose consumption, DOT, acetate production and pH profiles. Our first interest was to determine if increasing the oxygen transfer rate into the RAM could prevent the accumulation of organic acids, particularly acetate. First, we chose common conditions to grow bacteria in shaken flask: 500-mL flasks with handmade cotton plugs, 20% of relative filling volume and a shaking frequency of 200 rpm. This approximately corresponded to a $k_{L,a}$ value of 46 h^{-1} , as previously measured (Fig. 3E). A higher shaking frequency was used: 350 rpm, as high as the orbital shaker used could operate without unbalanced movement, which corresponded to a $k_{L,a}$ value of 92 h^{-1} , previously measured (Fig. 3B). The comparison between the RAM and the orbital shakers was made by adjusting the shaking frequencies in each system in order to set two similar initial $k_{L,a}$ (Table 4).

We discarded any effect over the $k_{L,a}$ due to the broth composition by working with equivalent initial $k_{L,a}$ values measured in water–air system, due to the water-like characteristics of the culture media. However, when working with complex media, non-Newtonian fluids or high-density cultures, corrections due to changes in the physicochemical properties of the culture (mainly due to changes in the oxygen diffusivity and the apparent viscosity) need to be further considered.

The *E. coli* culture performance at equivalent initial $k_{L,a}$ values of 46 h^{-1} is presented in Fig. 6A–D, and main kinetic parameters are summarized in Table 4. Similar final biomass, measured as optical densities were found in the cultures after 23 h, complete glucose consumptions, and the same final acetate concentrations. In general, no significant differences in the global performance of the cultures were found (Table 4). Therefore, establishing the same aeration capabilities for each agitation system in terms of the initial

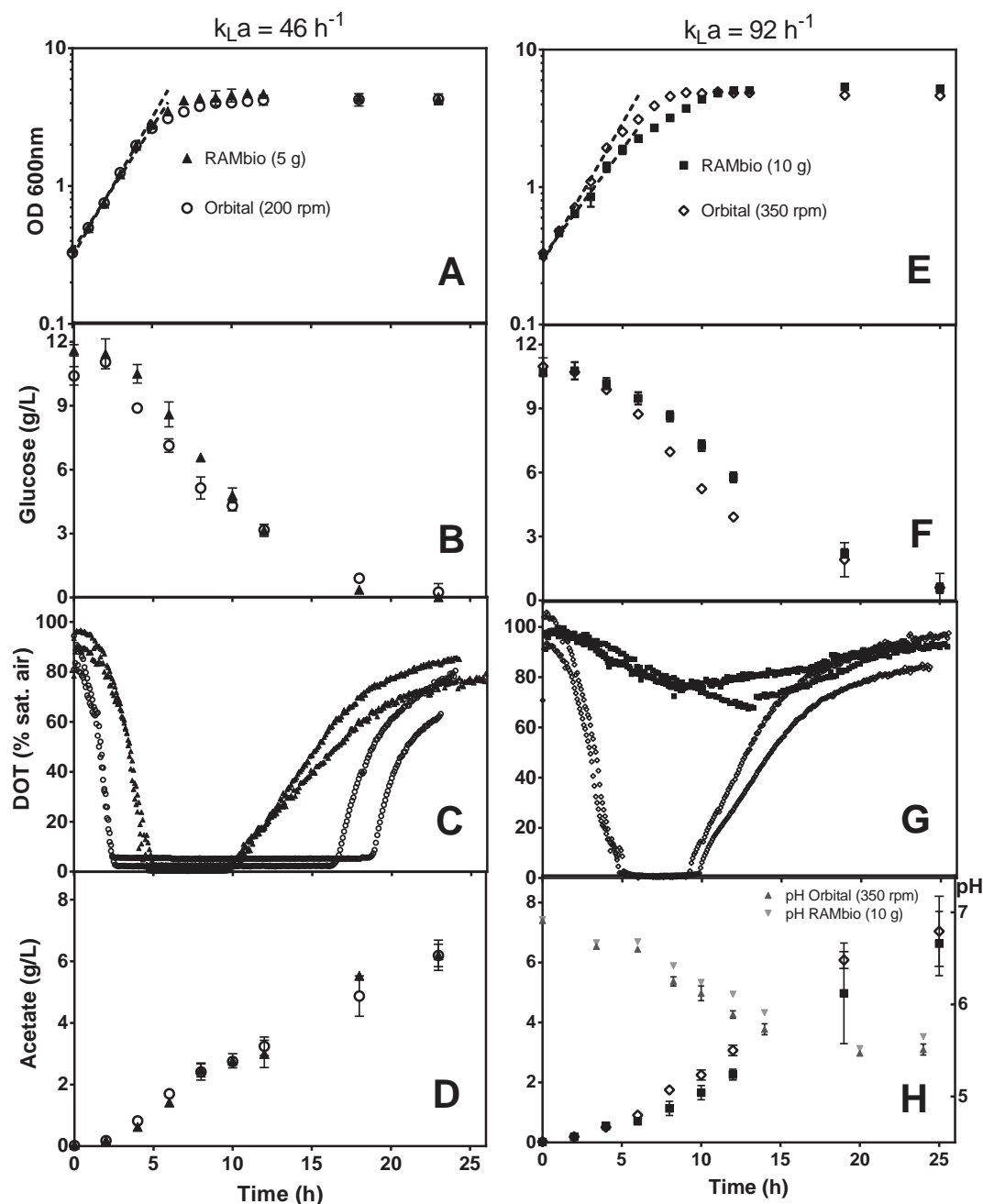


Fig. 6. Culture development of *E. coli* BL21 (DE3 gold) rSMD grown in flasks shaken by RAMbio and orbital systems at two equivalents values of initial $k_L a$. (A), (E) Biomass growth, where the specific growth rate is represented as dotted lines; (B), (F) glucose uptake; (C), (G) DOT profiles, (D) acetate accumulation, and (H) acetate accumulation and pH drop; throughout cultures grown in shaken flasks (nominal size of 500-mL with 20% of filling volume) with RAM and orbital mixing at two equivalents values of initial $k_L a$ (46 and 92 h^{-1}), with SM medium at 37 °C. Mean and standard deviation of at least two independent experiments are shown for biomass, glucose, acetate concentrations and pH measurements. For DOT profiles, two typical trends are shown.

Table 4

Operational conditions and main kinetic parameters of the *E. coli* cultures. Mean and standard deviation for at least two independent cultures are shown.

n_g, n	RAM 5 g	Orbital 200 rpm	RAM 10 g	Orbital 350 rpm
$k_L a^*$ (h^{-1})	45.7 ± 0.8	46.2 ± 1.9	93.8 ± 4.6	91.1 ± 4.7
μ (h^{-1})	0.46 ± 0.01	0.46 ± 0.00	0.36 ± 0.02	0.46 ± 0.01
OD600nm final	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.4	5.2 ± 0.2	4.6 ± 0.3
$Y_{x/gluc}$ (g DWC/g gluc)**	0.31 ± 0.01	0.32 ± 0.00	0.59 ± 0.05	0.38 ± 0.00
q_s (g gluc/g DWC.h)**	1.53 ± 0.09	1.47 ± 0.02	0.60 ± 0.03	1.23 ± 0.02
$Y_{ac/x}$ (g ac/g DWC)**	1.31 ± 0.01	1.48 ± 0.06	0.82 ± 0.15	0.99 ± 0.05
q_p (g ac/g DWC.h)**	0.61 ± 0.01	0.69 ± 0.03	0.29 ± 0.04	0.46 ± 0.01
T (h), DOT → 0%	5.0 ± 0.2	15.0 ± 1.7	0	4.4 ± 0.5
pH final	5.30 ± 0.01	5.34 ± 0.01	5.46 ± 0.03	5.39 ± 0.03

* Mean and standard deviation for at least three independent experiments with deionized water, for 500-mL nominal volume flasks with 20% of filling volume, at 37 °C.

** Calculated at 10 h time point.

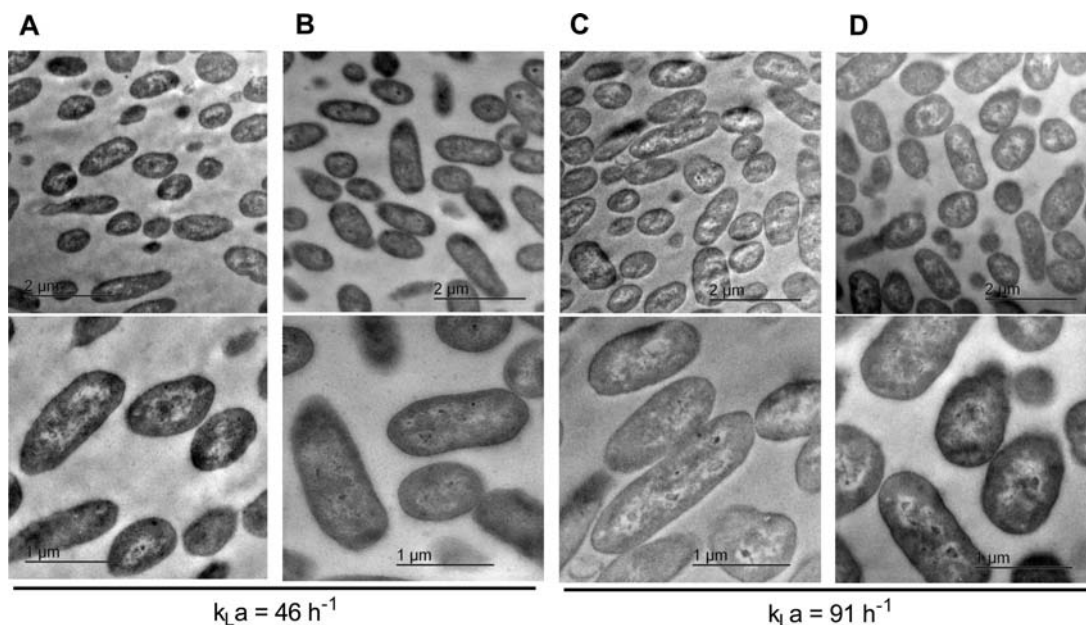


Fig. 7. Cross-sections of *E. coli* BL21 (DE3 gold) viewed under the transmission electron microscope (TEM). Examination of *E. coli* BL21-Gold (DE3) cells cultured in shaken flasks with (A), (C) RAMbio and (B), (D) orbital mixing at two equivalent values of initial $k_{L,a}$ (46 and 92 h^{-1}), with SM medium at 37 °C. Cells harvested at 8 h of growth culture (Fig. 5). (Scale bars of 2.0 and 1.0 μm).

$k_{L,a}$ (46 h^{-1}), allowed us to perform reproducible *E. coli* BL21-Gold (DE3) cultures.

The DOT profiles showed oxygen-limiting development during the culture. Interestingly, we observed a shorter time period of oxygen depletion (DOT = 0% air sat.) in the cultures with RAM than with orbital mixing (Fig. 6C). This faster drop on DOT could be an indication of different lag phases of growth, but this was not the case as shown in Fig. 6A. Instead, the DOT differences seem to be related with an enhanced capacity of the RAMbio system and the Oxy pump stoppers to replenish the gas phase with fresh air, therefore maintaining during the culture a maximum value of the oxygen partial pressure within the headspace of the flask, hence ensuring a higher OTR value.

Previously, cultures of *E. coli* K12 expressing the green fluorescent protein (GFP) in the RAMbio exhibited a greater specific growth rate (20% faster), as well as a greater amount of overall biomass (reaching 300% more biomass concentration with 40% of filling volume), and recombinant protein production (specific GFP expression) than cultures from the orbital platform, although there was no approach that enabled the establishment of the same aeration performance in each agitation system [17]. At present, we are able to predict the $k_{L,a}$ values at which the comparison was made; thus, for the RAM, using the model proposed in the present work, the $k_{L,a}$ value was 333.4 h^{-1} (20% filling volume, 50 mL water/250 mL flask; and a shaking frequency of 20 g at 37 °C, assuming a nominal flask volume of 250-mL with a maximum inner flask diameter of 82 mm), whereas the $k_{L,a}$ value for the orbital mixing is 70.7 h^{-1} (considering Klöckner and Büchs [8] model; at a shaking frequency of 400 rpm, same flasks and a shaking diameter of 19.05 mm). Based on this, it is evident the observed improved performance of the OTR with the RAM, where the DOT only briefly dropped below 20%, while the DOT dropped precipitously at the beginning of the orbital shaker cultures and did not recover until growth ceased nearly 24 h after inoculation.

Likewise, in Fig. 6E–H, biomass growth, glucose uptake, DOT profiles, acetate production and pH are presented during the cultures. Shaking frequencies were proposed to set equivalent initial $k_{L,a}$ values of 92 h^{-1} in shaken flasks by each mixer (Table 4). Similar final biomass, glucose consumption, and final acetate concentra-

tions were found after 25 h of growth. The pH profiles are the consequence of organic acids production (mainly acetate), as in Fig. 6H both parameters render symmetrical responses.

In comparison to Fig. 6C, significant differences in the DOT profiles were observed; for RAMbio DOT remains above 65% throughout the whole culture, whereas the cultures grown in the orbital mixer exhibited an oxygen depletion period of 4–5 h (from 5 to 10 h of culture, Fig. 6G). As we proposed above for Fig. 6C, the differences could be due to the Oxy pump stoppers active performance in gas transfer; in contrast to the passive diffusion through the cotton plug. Previously, Mrotzek et al. [32] found a decreased gas exchange relative to the surrounding atmosphere between 25 and 38% when using cotton plugs with a bulk density between 0.06 and 0.25 g/cm^3 . The diffusion limiting condition of the plugs becomes greater when working at higher OTR, like increasing the shaking frequencies (Figs. 7 and 8).

Even when the oxygen transfer rate was enhanced, the performance of the bacteria culture did not improve. Substantial differences in the culture parameters were found (Table 4, Fig. 9A–E) for cultures grown in the RAMbio than the orbital shaker, including lower specific growth rate, lower specific glucose uptake, lower specific acetate productivity, and higher biomass-glucose yield. No significant differences were observed in acetate-biomass yield (Fig. 9E).

The increase in acetate concentration, and the consequent pH reduction, are not related to oxygen limitation. Great acetate production starts and remains even when enough dissolved oxygen is available. This is evidenced by comparing the DOT and concentration of acetate profiles at all conditions evaluated (Fig. 6C and D and Fig. 6G and H). Acetate production in aerobic *E. coli* cultures can occur at high growth rates and/or high glucose uptake rates [33,34]. Such response is induced by an imbalance of the glucose uptake, energy production and biosynthesis fluxes, mostly if high glucose concentration media are used [15,35]. Finally, no concentration of lactate, oxalate, malate, or formate was found; furthermore, despite the amount of succinate detected, the method used had not a proper resolution for its quantification. Citrate concentration remained close to 1 g/L through the whole cultures.

There are no previous reports of the impact over microbial development when mixed at mechanical resonance. Samples of the cells were taken during exponential growth phase and observed under transmission electron microscopy (TEM). No visible differences were found for microscopy morphology of *E. coli* cells grown on each mixing condition evaluated, as shown in Fig. 7.

The diminished performance of *E. coli* cultures at the high shaking frequency could be related to the hydrodynamic patterns, since working with shaking flasks mass and momentum transfer phenomena are hard to isolate. An *E. coli* BL21 (DE3 gold) rSMD culture was grown in the RAMbio system at a higher shaking frequency (12.5 g), but similar $k_L a$ value ($94.3 \pm 3.4 \text{ h}^{-1}$), in order to assess the hydrodynamic impact over the cultures, when separated from the mass transfer phenomena. This was achieved by changing the A/V ratio (1000 mL flask with 45% filling volume). Table 5 shows that the kinetic parameters of growth, and glucose consumption were no different from the culture grown in the orbital system. The kinetic performance of this culture was increased in comparison to the culture at 10 g (Fig. S3A–D) in terms of biomass production and glucose consumption. No significant differences were found in the pH measurements. Otherwise, the DOT profiles show lower values of dissolved oxygen, surely due to the diminished headspace achieved in relation to the selected filling volume.

Previous reports concluded that any changes in biological performance with yeast and bacteria due to variations in agitation or aeration intensity cannot be attributed to hydrodynamic stresses associated with the turbulence generated by impellers or with bursting bubbles, since estimation of the Kolmogoroff microscale suggest that those organisms are smaller enough [36]. For the RAM technology, those microscale eddies are assumed to be near $50 \mu\text{m}$ [37]. Moreover, *E. coli* cells are highly resistant to mechanical stress, as evaluated in continuous cultures of *E. coli* W3110, with controlled DOT (40% and 10% air sat.) in lab stirred tank reactors [38]. While the gas flow rate was maintained at 1 vvm, the impeller speed was increased from 400 rpm to 1200 rpm (1 kWm^{-3} to 30 kWm^{-3}) for 7 h. The only effect observed was over the outer polysaccharide layer of the cell, as shown by SEM, and supported with flow cytometry and TEM analysis [38]. Hence, we conclude that the hydrodynamics of the RAMbio has not any impact on the *E. coli* cultures performance or the morphology.

3.4. The role of the Oxympump stoppers over *E. coli* BL21-Gold (DE3) rSMD cultures grown in flasks shaken by the RAMbio

The role of the active gas transfer generated by the Oxympump stoppers was further analyzed. For this, we used a modified Oxympump stopper, where the pumping movement of the bellows element was cancelled (Fig. 2B). By using this special closure, the $k_L a$ values were not affected (Fig. S4A and B).

Except for the closures used, *E. coli* was grown under the same conditions as the previous cultures (Section 2.7–2.8). It was incubated in the RAMbio system at 10 g, having a $k_L a$ value of $96.1 \pm 3.4 \text{ h}^{-1}$ (Table 5). The results are in Fig. 6E–H showing biomass growth, glucose uptake, DOT profiles and pH measurements in comparison to the cultures evaluated at the same operational conditions and the normal Oxympump stoppers. Main parameters are summarized in Table 5.

Astonishingly, cultures grown with the modified Oxympump stopper recovered their performance. Higher values of specific growth rate and specific glucose uptake were achieved in comparison with the cultures using normal Oxympump stoppers (Fig. 9A,B and D). The DOT profiles were significantly different, with the modified Oxympump, dissolve oxygen reached lower values, it drop near 35% air sat. (With normal Oxympump the DOT was always above 65%). This result evidences the active gas transfer through the closure, which allows a faster replenishment of the flask headspace.

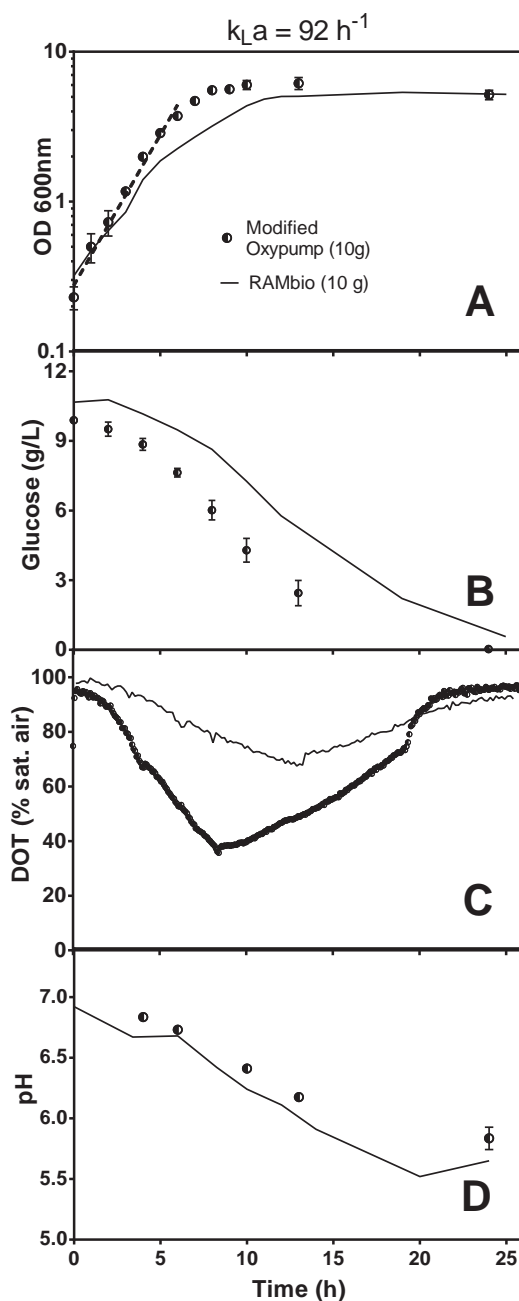


Fig. 8. Culture development of *E. coli* BL21 (DE3 gold)-rSMD grown in flasks shaken by RAMbio coupled with the modified Oxympump stoppers. (A) Biomass growth, where the specific growth rate is represented as dotted lines; (B) glucose uptake; (C) DOT profiles and (D) pH drop, throughout cultures grown in shaken flasks (nominal size of 500-mL with 20% of filling volume) with RAMbio coupled to the modified Oxympump stoppers, at an initial $k_L a$ value equal to 92 h^{-1} , with SM medium at 37°C . Mean and standard deviation of at least two independent experiments are shown for biomass, glucose and pH measurements. Solid lines represent data of the same culture conditions when the normal Oxympump stoppers were used (Fig. 6E–H).

It also reinforces the discussion about the limitation of the passive transfer closures. Since diminishing the DOT renders better *E. coli* culture performance, it seems that the oxygen available plays a main role over cells metabolism. Previous reports had shown that maintaining high DOT values during *E. coli* cultures, could have unpredictable effects over growth rate, plasmid stability, plasmid content and in the recombinant protein production [39].

Even when the *E. coli* cultures were uninduced, the stress associated with producing the recombinant rSMD and maintaining the

Table 5Operational conditions and main kinetic parameters of additional *E. coli* cultures. Mean and standard deviation for at least two independent cultures are shown.

n_g, n	RAM		Orbital	
	10 g Modified Oxympump	12.5 g	<i>E. coli</i> BL21 DE3 gold (10 g)	<i>E. coli</i> BL21 DE3 gold (350 rpm)
$k_L a^+$ (h^{-1})	96.1 ± 3.4	94.3 ± 3.4	93.8 ± 4.6	91.1 ± 4.7
μ (h^{-1})	0.49 ± 0.01	0.51 ± 0.05	0.73 ± 0.06	0.69 ± 0.02
OD600 nm final	5.2 ± 0.4	4.9 ± 0.5	13.77 ± 0.7	9.8 ± 0.3
$Y_{x/gluc}$ (g DWC/g gluc)**	0.52 ± 0.00	0.40 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.48 ± 0.01
q_s (g gluc/g DWCh)**	0.95 ± 0.02	1.29 ± 0.19	1.19 ± 0.13	1.43 ± 0.00
T (h), DOT \rightarrow 0%	0	0	6.7 ± 0.6	7.2
pH final	5.84 ± 0.09	5.71 ± 0.16	6.79 ± 0.01	6.84 ± 0.04

* Mean and standard deviation for at least three independent experiments with deionized water, for 500-mL nominal volume flasks with 20% of filling volume, at 37 °C.

** Calculated at 10 h time point.

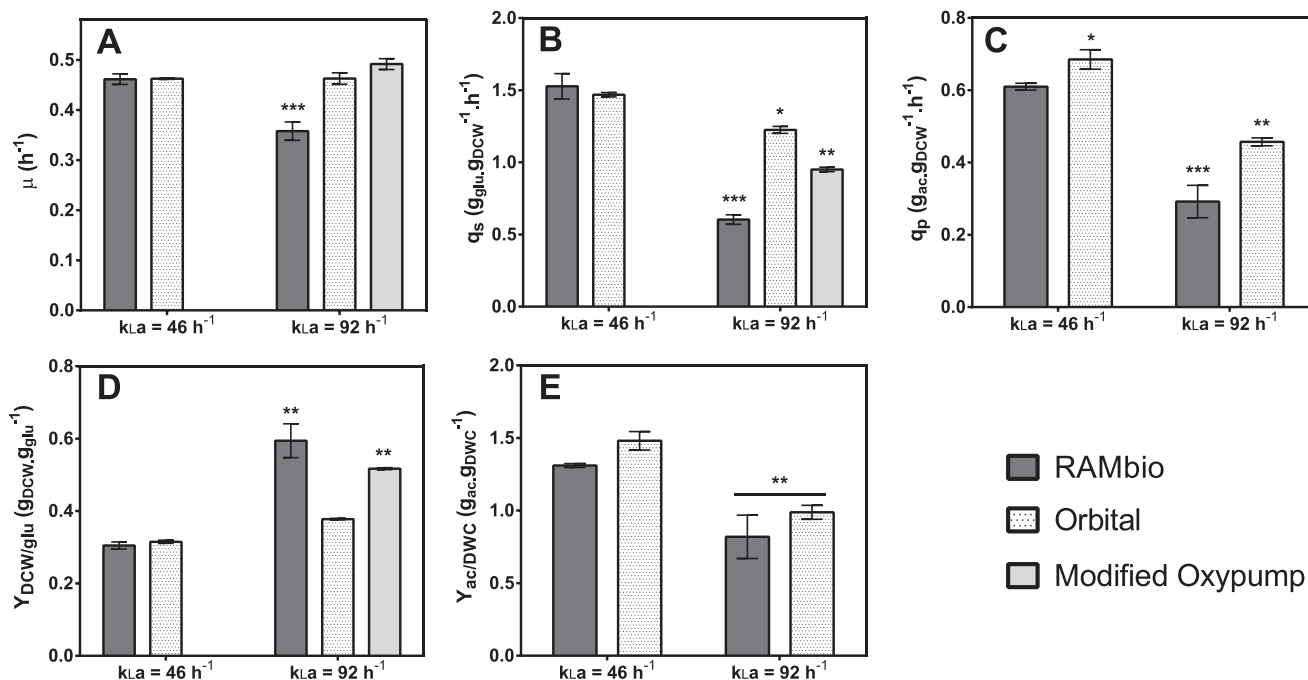


Fig. 9. Culture parameters comparison of *E. coli* BL21 (DE3 gold) rSMD grown in flasks shaken by the RAMbio, the orbital system and by RAMbio coupled with modified Oxympump stoppers; at two equivalents values of initial $k_L a$. (A) Specific growth rate (obtained during exponential growth); and (B) specific glucose uptake, (C) specific acetate production, (D) biomass-glucose yield and (E) acetate-biomass yield calculated at 10 h of cultures (Fig. 5) grown in shaken flasks (nominal size of 500-mL with 20% of filling volume) with RAM and orbital mixing at two equivalents values of initial $k_L a$ (46 and 92 h^{-1}), with SM medium at 37 °C. Mean and standard deviation of at least two independent experiments are shown. Statistical differences with a threshold significance level of 0.05 are considered: * significant (0.01 < P < 0.05), ** very significant (0.001 < P < 0.01) and *** extremely significant (P < 0.001).

plasmid led to less biomass being produced than with the wild type [36]. *E. coli* BL21 DE3 gold (wild type) was grown with the same conditions as previous experiments (Fig. 6E–H), in absence of ampicillin. Table 5 summarizes the main parameters of those cultures, while the biomass growth, glucose uptake and DOT profiles can be analyzed from Fig. S5A–C. The performance of those cultures is clearly superior, as they reached higher specific growth rate and specific glucose uptake. In addition, they were enhanced when growing in the RAMbio system, due to the increase oxygen supply. The higher final pH values indicate that the acetate production may be diminished or even avoided, therefore using more glucose to biomass production.

Setting $k_L a$ equivalent initial values allowed performing similar cultures of *E. coli* while growing in flasks shaken by the RAMbio and the orbital systems. However, irreconcilable differences were reached, since the mechanisms of mass transfer in each system operate under different principles. A better approach would include the comparison of the OTR profiles during bacterial cultures. The use of this criterion gives worth to the information among several cultures development.

We are interested in the evaluation of the RAM performance over recombinant protein production for induced cultures under higher $k_L a$ operating conditions, as well as different biological host performance grown under the complete range of action of RAM technology (0–20 g), including non-Newtonian cultures.

4. Conclusions

Orbital mixers are widely used as the main agitation systems for aerobic cultures in shaken flasks. Recently, resonant acoustic mixing (RAM) has been introduced as an alternative for aeration and mixing supply in shaken flasks. In the present work, a characterization of the RAM system is presented in terms of the $k_L a$ coefficient, and an empirical model for $k_L a$ estimation in shaken flasks by RAM and orbital mixing is presented. The resulting equations can be applied to calculate the initial oxygen transfer coefficient for low viscosity cultures, using relevant cultivation parameters, such as the shaking frequency, the flask diameter, and the filling volume, within an accuracy range of $\pm 30\%$. To our knowledge, this is the first $k_L a$ correlation that has been defined and validated for

RAM shakers. Understanding RAM performance for oxygen transfer would imply designing other geometries able to enhance the contact between gas–liquid phases, where hydrodynamics of the RAM system need to be taken into account.

Furthermore, *E. coli* cultures were grown in shaken flasks by RAM and orbital mixers, and had a similar performance at the same initial k_{La} of 46 h^{-1} . Conversely, at 92 h^{-1} the cultures of *E. coli* exhibited great differences in the DOT profiles and the culture parameters, which could be due to differences in the oxygen transfer rate caused by the increased gas pressures generated in the RAM system at a higher shaking frequency.

Authors' contributions

GIRC conducted experiments, performed the data analysis, and wrote the manuscript. RIGC and NAVC helped to conduct *E. coli* experiments and reviewed the manuscript. MATR coordinated the experiments, wrote and reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was partially financed by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 178528, 214404 and 220795), and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM IN-210013 and IN-209113). GIRC and RIGC thanks the scholarship from CONACYT-México. We thank Diego Rosiles Eng., Jesus Santana Eng., Manuel Hernando Ortega Chem. and Saul Saavedra Eng. for their technical assistance in the experimental work. We also thank Guadalupe Zavala Ph.D. for carried out the transmission electron microscopy studies. We specially thank Professor Alejandro Alagón and Alejandro Olvera M.Sc. for kindly provided *E. coli* BL21-Gold (DE3) producing sphingomyelinase-D (rSMD) from tick (*Boophilus microplus*). Technical assistance on bioreactor controllability by Dusstthon Llorente, Eng. is also appreciated. We also thank Ana Carmen Delgado for reviewing the English version of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.10.015>.

References

- [1] J. Büchs, Introduction to advantages and problems of shaken cultures, *Biochem. Eng. J.* 7 (2001) 91–98.
- [2] S.A. Freyer, M. König, A. Kunkel, Validating shaking flasks as representative screening systems, *Biochem. Eng. J.* 17 (3) (2004) 169–173.
- [3] S. Suresh, V.C. Srivastava, I.M. Mishra, Techniques for oxygen transfer measurement in bioreactors: a review, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (8) (2009) 1091–1103.
- [4] U. Maier, J. Büchs, Characterisation of the gas–liquid mass transfer in shaking bioreactors, *Biochem. Eng. J.* 7 (2) (2001) 99–106.
- [5] T. Anderlei, J. Büchs, Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks, *Biochem. Eng. J.* 7 (2001) 157–162.
- [6] L. Tolosa, Y. Kostov, P. Harms, G. Rao, Noninvasive measurement of dissolved oxygen in shake flasks, *Biotechnol. Bioeng.* 80 (2002) 594–597.
- [7] H.F. Zimmermann, T. Anderlei, J. Büchs, M. Binder, Oxygen limitation is a pitfall during screening for industrial strains, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (6) (2006) 1157–1160.
- [8] W. Klöckner, J. Büchs, Advances in shaking technologies, *Trends Biotechnol.* 30 (6) (2012) 307–314.
- [9] A. Gupta, G. Rao, A study of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor, *Biotechnol. Bioeng.* 84 (3) (2003) 351–358.
- [10] J.M. Seletzky, U. Noak, J. Fricke, E. Welk, W. Eberhard, C. Knocke, J. Büchs, Scale-up from shake flasks to fermenters in batch and continuous mode with *Corynebacterium glutamicum* on lactic acid based on oxygen transfer and pH, *Biotechnol. Bioeng.* 98 (2007) 800–811.
- [11] M.A. Trujillo-Roldán, N.A. Valdez-Cruz, C.F. Gonzalez-Monterrubio, E.V. Ácevedo-Sanchez, C. Martinez-Salinas, R.I. Garcia-Cabrera, R.A. Gamboa-Suasnavart, L.D. Marin-Palacio, J. Villegas, A. Blancas-Cabrera, Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 9665–9674.
- [12] J.C. van Suijdam, N.W.F. Kossen, A.C. Joha, Model for oxygen transfer in a shake flask, *Biotechnol. Bioeng.* 20 (1978) 1695–1709.
- [13] H.J. Henzler, M. Schedel, Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures, *Bioprocess Eng.* 7 (1991) 123–131.
- [14] T. Anderlei, W. Zang, M. Papaspyrou, J. Büchs, Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks, *Biochem. Eng. J.* 17 (2004) 187–194.
- [15] M. Losen, B. Frölich, M. Pohl, J. Büchs: Effect of oxygen limitation and medium composition on *E. coli* fermentation in shake-flask cultures, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 1062–1068.
- [16] C. Wittmann, H. Kim, G. John, E. Heinzle, Characterization and application of an optical sensor for quantification of dissolved O_2 in shake-flasks, *Biotechnol. Lett.* 25 (2003) 377–380.
- [17] Applikon Biotechnology technical note: Improvement of culture growth and protein expression via use of resonant acoustic mixing. (2013). Available from: https://www.applikon-biotechnology.us/images/download/ram/RAMbio_vs_Orbital-2013_March.pdf [cited on September 15, 2015].
- [18] J.G. Osorio, F.J. Muzzio, Evaluation of resonant acoustic mixing performance, *Powder Technol.* 278 (2015) 46–56.
- [19] T.A. McAdams, H.W., Howe, J.E., Draper, L.C. Farrar, United States Patent: Self-contained breathing closure and container. US 8696778B2 (2014).
- [20] K. Van't Riet, Review of measuring methods and results in mass transfer in stirred vessels nonviscous gas–liquid, *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* 18 (1979) 357–364.
- [21] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 153–176.
- [22] J. Büchs, U. Maier, C. Milbradt, B. Zoels, Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity, *Biotechnol. Bioeng.* 68 (6) (2000) 594–601.
- [23] A. Castellanos-Mendoza, R.M. Castro-Acosta, A. Olvera, G. Zavala, M. Mendoza-Vera, E. García-Hernández, A. Alagón, M.A. Trujillo-Roldán, N.A. Valdez-Cruz, Influence of pH control in the formation of inclusion bodies during production of recombinant sphingomyelinase-D in *Escherichia coli*, *Microb. Cell Fact.* 13 (2014) 137.
- [24] C.J. Hewitt, G. Nebe-Von Caron, B. Axelsson, C.M. McFarlane, A.W. Nienow, Studies related to the scale-up of high-cell-density *E. coli* fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration, *Biotechnol. Bioeng.* 70 (4) (2000) 381–390.
- [25] A.R. Lara, C. Vazquez-Limón, G. Gosset, F. Bolívar, A. López-Munguía, O.T. Ramírez, Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and reduce formation of by-products during recombinant protein production under transient intermittent, *Biotechnol. Bioeng.* 94 (2006) 1164–1175.
- [26] H.H. Mollenhauer, Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy, *Stain Technol.* 39 (1964) 111–114.
- [27] W.H. Howe, J.J., Warriner, A.M., Cook, S.L., Cogui, L.C. Farrar, United States Patent: Method for resonant-vibratory mixing. US 7866878B2 (2011).
- [28] U. Maier, M. Losen, J. Büchs, Advances in understanding and modeling the gas–liquid mass transfer in shake flasks, *Biochem. Eng. J.* 17 (2004) 155–167.
- [29] S. Hansen, F. Kensey, A. Käser, J. Büchs, Potential errors in conventional DOT measurement techniques in shake flasks and verification using a rotating flexitube optical sensor, *BMC Biotechnol.* 11 (2011) 49.
- [30] V. Veljkovic, S. Nikolic, M. Lazic, C. Engeler, Oxygen transfer in flasks shaken on orbital shakers, *Hem. Ind.* 49 (6) (1995) 265–272.
- [31] F. Veglio, F. Beolchini, S. Ubaldini, Empirical models for oxygen mass transfer, a comparison between shake flask and lab-scale fermentor and application to manganese ore bioleaching, *Process Biochem.* 33 (4) (1998) 367–376.
- [32] C. Mrotzek, T. Anderlei, H. Henzler, J. Büchs, Mass transfer resistance of sterile plugs in shaking bioreactors, *Biochem. Eng. J.* 7 (2) (2001) 107–112.
- [33] M. Akesson, E.N. Karlsson, P. Hagander, J.P. Axelsson, A. Tocaj, On-line detection of acetate formation in *E. coli* cultures using dissolved oxygen responses to feed transients, *Biotechnol. Bioeng.* 64 (5) (1999) 590–598.
- [34] M.A. Eiteman, E. Altman, Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations, *Trends Biotechnol.* 24 (11) (2006) 530–536.
- [35] K. Valgepea, K. Adamberg, R. Nahku, P.J. Lahtvee, L. Arike, R. Vilu, Systems biology approach reveals that overflow metabolism of acetate in *E. coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase, *BMC Syst. Biol.* 4 (2010) 166.
- [36] A.W. Nienow, Scale-up considerations based on studies at the bench scale in stirred bioreactors, *J. Chem. Eng. Jpn.* 42 (11) (2009) 789–796.
- [37] H.W. Howe, J.J., Warriner, A.M., Cook, S.L., Cogui, L.C. Farrar, Method for resonant-vibratory mixing. (2011) Patents. Retrieved from <https://www.google.com/patents/US7866878>.
- [38] C.J. Hewitt, L.A. Boon, C.M. McFarlane, A.W. Nienow, The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* 59 (5) (1998) 612–620.
- [39] X. Li, J.W. Robbins Jr., K.B. Taylor, Effect of the levels of dissolved oxygen on the expression of recombinant proteins in four recombinant *Escherichia coli* strains, *J. Ind. Microbiol.* 9 (1992) 10–1.