

DESARROLLO DE METODOLOGÍA DE CULTIVO EN PLACAS DE POZOS PROFUNDOS (*Scaling down*). CARACTERIZACIÓN DE PARÁMETROS

L. Navarro, M. Blasco
INTI Biotecnología
lnavarro@inti.gov.ar

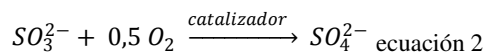
Introducción

El desarrollo de cepas de microorganismos con alta productividad es un hito fundamental en el desarrollo de bioprocesos competitivos. El *scaling down* consiste en simular las condiciones productivas a baja escala, con la finalidad de realizar procesos de selección luego extrapolables a la escala de producción. La capacidad de transferencia de oxígeno es uno de los factores más importantes en el escalado de bioprocesos aeróbicos ya que define la cantidad de biomasa que puede soportar una metodología de cultivo. El parámetro que permite caracterizar la capacidad de transferir oxígeno en un sistema gas-líquido es el $K_L a$, según ec. 1:

$$K_L a = \frac{OTR}{C_{O_2}^* - C_L} \quad \text{ecuación 1}$$

donde: OTR = tasa de transferencia de oxígeno ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).
 $C_{O_2}^*$ = concentración de saturación de O_2 en la interfase ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).
 C_L = concentración de O_2 en el seno del líquido ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).
 *Constantes para una temperatura y composición de la solución específica¹.

El método del sulfito permite medir el OTR¹ al basarse en la oxidación del sulfito a sulfato, produciendo la acidificación de la solución:



$$OTR (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{C_{Na_2SO_3} \times v_{O_2}}{t \times v_{Na_2SO_3}} \quad \text{ecuación 3}$$

donde: $C_{Na_2SO_3}$ = concentración de sulfito oxidado hasta pH de detección ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).
 V_{O_2} = coeficiente estequiométrico del oxígeno.
 $V_{Na_2SO_3}$ = coeficiente estequiométrico del sulfito.
 t = tiempo de reacción hasta pH de detección, dependiente de la velocidad de transferencia de oxígeno del medio gaseoso al medio líquido¹.

En este trabajo presentamos la caracterización del proceso de transferencia en placas de pozos profundos mediante la reacción del sulfito con oxígeno acoplada a un indicador ácido-base y seguida mediante un sistema óptico.

Objetivo

Caracterizar sistemas de cultivo a microescala por su capacidad de transferencia de oxígeno.

Descripción

Medición de intensidad de color rojo-verde-azul (RGB) para la determinación del pH

Se acidificó una solución de composición similar a la utilizada para caracterizar la transferencia de oxígeno (NaCl 0,75 M, CoSO_4 1×10^{-4} M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,012 M, azul de bromotimol $2,4 \times 10^{-5}$ M, $\text{pH}=8$, ver más adelante). El NaCl reemplazó al sulfito para evitar modificación en el pH por oxidación del mismo. Se obtuvieron 12 valores de pH (pH_{REF}) entre 8 y 3,3 midiendo con un pHmetro. Se transfirió por triplicado cada punto de pH a una microplaca.

La placa fue fijada en el centro de una caja plástica con una cámara VGA e iluminación LED controlada. Las imágenes fueron analizadas mediante el programa ImageJ (NIH, EEUU). Brevemente las imágenes se descompusieron en los canales R, G y B y se analizaron las regiones de interés (ROIs) de idéntico tamaño y coordenadas en cada uno de los canales. El rango dinámico se determinó a partir de los valores de intensidad en los tres canales (R, G, B) cuya regresión con el pH_{REF} presentó un valor de R^2 mayor a 0,99.

Selección de la mejor combinación de colores

Se obtuvo el valor de pH_{RGB} introduciendo el valor de intensidad en la ecuación de la línea de tendencia obtenida a partir del gráfico de intensidad RGB vs pH_{REF} . Con estos valores se determinó la correlación del pH_{RGB} (obtenido para cada color o combinación de colores cuando se promedió el pH_{RGB} de cada color de la combinación) con el pH_{REF} . El mejor color o combinación de colores para medir el pH_{RGB} se determinó considerando el mayor valor de R^2 (triplicados experimentales) y se realizó una prueba estadística t para evaluar diferencias entre ambos métodos en la medición del pH.

Determinación de la transferencia de oxígeno en microplacas

Las determinaciones de OTR se calcularon según ec. 3, utilizando una solución conteniendo sulfito (Na_2SO_3 0,5 M, CoSO_4 1×10^{-4} M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,012 M, azul de bromotimol $2,4 \times 10^{-5}$ M, $\text{pH}=8$) en función de la velocidad de agitación en vueltas por minuto

(RPM), tipo de placa (Placa) y volumen de llenado (Vol.)¹. Se utilizó la curva patrón caracterizada anteriormente.

El pH se determinó mediante el análisis de las fotografías tomadas cada 10 seg hasta la observación del pH_{RGB} correspondiente al punto final (pH = 6)

Con cada valor de OTR se calculó según ec. 1 el K_La de las distintas condiciones, y se lo comparó con los reportados en la bibliografía.

Resultados

Rango dinámico

Los rangos dinámicos para la determinación del pH_{RGB} se definieron a partir de la región lineal observada en el ensayo (Fig. 1; solo se muestran los valores correspondientes a la zona de ajuste con R²>0,99).

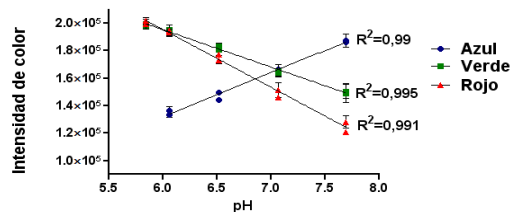


Figura 1: Selección rango dinámico. Intensidad de cada color vs pH_{REF}.

Los resultados de dicho ajuste fueron:

- pH_{ref} 6,06-7,73 para el color azul
- pH_{ref} 5,85-7,73 para el color verde
- pH_{ref} 5,85-7,73 para el color rojo

Mejor color o combinación de colores

Las combinaciones de colores presentaron un R² mayor a 0,99 en tres de las cuatro combinaciones, mientras que cada color por separado no superó el valor de 0,98. La combinación de colores azul y rojo fue la que mayor ajuste lineal presentó (R²=0,996, Fig. 2).

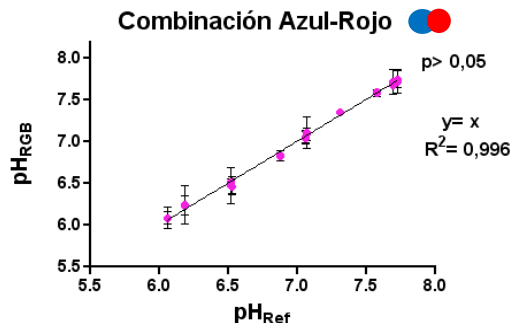


Figura 2: Selección del mejor color. pH_{RGB} vs pH_{REF} de la combinación rojo-azul.

No hubo diferencias estadísticas entre pH_{REF} y pH_{RGB}, por lo que se eligió la combinación azul-rojo para la medición del mismo.

Determinación de la transferencia de oxígeno en microplacas

El K_La aumentó al incrementar la velocidad de agitación. En contraste, el volumen de llenado impactó negativamente sobre el valor de este parámetro (Fig. 3).

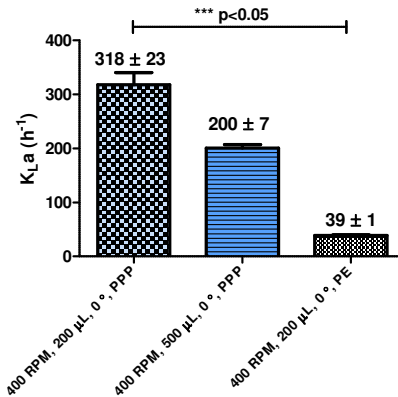


Figura 3: Determinación de la transferencia de oxígeno.

El valor máximo obtenido de K_La fue 318 ± 23 h⁻¹ (n=2) para la condición 400 RPM, 200 uL en placa PPP (Fig.3).

Los resultados obtenidos en la caracterización, son comparables con los presentados en la literatura (400 h⁻¹, 0,1-1 L²; 60-360 h⁻¹, 1-30 L³; 170-740 h⁻¹, 30-2000 L³).

Conclusiones

- El método desarrollado para medir pH en función de la intensidad generó la herramienta necesaria para poder realizar la caracterización de los sistemas de cultivo en microplaca.
- Con los valores de K_La y OTR_{max} obtenidos se logró definir los parámetros de transferencia de O₂ de un sistema de selección de cepas de alto rendimiento y compararlos con biorreactor de tipo tanque agitado típico. La definición de las condiciones de operación en uno de los sistemas permitiría definir las condiciones en el otro para obtener resultados comparables.

Bibliografía

- Hermann, R., Lehmann, M., Buchs, J. (2003). Characterization of gas-liquid mass transfer phenomena in microtiter plates. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(2), 178–186.
- Gill, N.K., Appleton, M., Baganz, F., Lye, G.J. (2008). Design and characterisation of a miniature stirred bioreactor system for parallel microbial fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 164–176.
- Junker, B.H. (2004). Scale-up methodologies for Escherichia coli and yeast fermentation processes. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 97(6), 347–364.