

Determinación de biomasa generada en un bioproceso productivo por el método masa seca

Cancela Ezequiel, Cedrés Juan Pablo, Catone Mariela, Matos María Laura, Caro Carmen, Amedei Hugo Alejandro.
Laboratorio Analítico, Cultivo Celular Masivo INTI-Biotecnología Industrial.
cancela@inti.gov.ar

Objetivos

Evaluar el método de determinación de masa seca en microorganismos de interés de la Industria Biotecnológica, cuantificando su incertidumbre.

Objetivos específicos

Estimar la incertidumbre relativa asociada a la medición de masa seca para una cepa de *Escherichia coli*.

Estimar la incertidumbre relativa asociada a las mediciones de masa seca para una cepa de *Pichia pastoris*.

Introducción

La mayoría de los procesos industriales biotecnológicos implican el crecimiento controlado de microorganismos o células animales. A escala productiva, los microorganismos se emplean para generar productos de interés, entre ellos, biomasa, productos generados por el microorganismo (antibióticos, proteínas recombinantes) o saneamientos ambientales sobre una matriz contaminada. Para poder controlar dicho proceso es necesario estimar la variación de la cantidad de biomasa del microorganismo en función del tiempo. Existen varios métodos para determinar el crecimiento como ser medición de la densidad óptica determinando absorbancia a 600 nm (OD_{600}), recuento microbiológico en placas y determinación de la masa seca del cultivo.

Este método consiste en secar hasta peso constante un volumen conocido de muestra y determinar su masa gravimétricamente. La variación de la masa seca en función del tiempo, es la forma más utilizada para calcular el rendimiento productivo a lo largo del proceso. La forma tradicional de evaluar el rendimiento de un bioproceso en función del sustrato consumido ($Y_{X/S}$) se describe mediante la siguiente ecuación:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (\text{Ec.1})$$

donde ΔX es la biomasa obtenida en el proceso, ΔS representa el sustrato principal empleado para crecer el microorganismo.

Dado que estos procesos requieren el control de crecimiento de la biomasa, es fundamental la estandarización y optimización del método teniendo en cuenta el adecuado dimensionamiento del volumen empleado para realizar las cuantificaciones y los procesos preparativos adicionales.

Un resultado analítico, apto para su uso, implica que el mismo sea lo suficientemente fiable para que cualquier decisión basada en él, pueda ser tomada con confianza. Debe validarse el desempeño del método y estimar la incertidumbre del resultado, para un determinado nivel de confianza (1).

La incertidumbre asociada a la precisión intermedia (S_{RW}) debe evaluarse bajo el mismo método, la misma muestra homogénea, en un solo laboratorio, con diferentes analistas, con distinto equipamiento con intervalos de tiempo representativos de las actividades cotidianas del laboratorio. La misma puede calcularse a partir del promedio de cuadrados entre grupos obtenidos en el ANOVA, utilizando los cuadrados medios entre y dentro de los grupos según las ecuaciones 2 (2).

$$S_{RW} = \sqrt{s_{mues}^2 + s_r^2} \quad (\text{Ec.2})$$

$$s_{mues}^2 = \frac{(CM_{entre} - CM_{dentro})}{n}$$

$$s_r^2 = CM_{dentro}$$

donde s_{mues}^2 se obtiene restando el cuadrado medio entre grupos (CM_{entre}) y el cuadrado medio dentro de grupos (CM_{dentro}), sobre el número de réplicas (n). s_r^2 es el cuadrado de la desviación estándar asociada a la repetibilidad del método. Si dicha incertidumbre se divide por el promedio de las determinaciones totales realizadas, se obtiene una incertidumbre relativa denominada en este trabajo como *urs*.

La expresión de la incertidumbre combinada relativa porcentual del método ($uc(y)\%$) se expresa como según la ecuación 3 (Ec.3).

$$uc(y)\% = 100 \times k \times \sqrt{urs^2 + urg^2 + urv^2} \quad (\text{Ec.3})$$

donde k es el factor de cobertura considerado como 2. urs es la incertidumbre relativa a la precisión intermedia, urg es la incertidumbre relativa asociada por gravimetría y urv es la incertidumbre relativa asociada por volumetría. El presente estudio propone el cálculo de la incertidumbre porcentual relativa de medición de Masa seca asociada a una cepa de *E. coli*, y a una levadura unicelular muy utilizada en Biotecnología como lo es *P. pastoris*.

Descripción

Se realizó un estudio de precisión intermedia del método sobre dos microorganismos: la bacteria *E. coli* y la levadura *P. pastoris*. El ensayo fue realizado considerando todas las variables implicadas en el método (distintos analistas e instrumentos de medición), con la salvedad de que por las características de la muestra se realizó el ensayo en un día de trabajo.

El cálculo de incertidumbre relativa combinada final (Ec.3) expresada con un 95% de confianza ($k = 2$) involucró la incertidumbre de los instrumentos de medición (Ec.1) y la incertidumbre asociada al estudio de precisión intermedia (Ec.2).

Resultados

Para el cálculo de la desviación estándar relativa asociada a la incertidumbre por gravimetría se utilizó la incertidumbre de 0,1 mg (3) en el rango utilizado. Además, el promedio de pesos obtenido para *P. pastoris* fue de 10,8 mg y 7,8 mg para *E. coli*. Las incertidumbres relativas calculadas fueron: para las muestras de *P. pastoris* fue 0,009 g y para *E. coli* fue de 0,013 g.

En relación al cálculo de la incertidumbre relativa asociada a los volúmenes de trabajo, la incertidumbre para la pipeta utilizada fue de 10 μ l (4). El volumen empleado para *P. pastoris* fue de 0,7 y para *E.coli* de 3,2 ml.

Las incertidumbres relativas calculadas para la gravimetría (urg) y volumetría (urv) fueron calculadas según las ecuaciones 4 (Ec.4) y 5 (Ec.5) respectivamente:

$$urg = u(g)/g \quad (\text{Ec.4})$$

$$urv = u(v)/v \quad (\text{Ec.5})$$

donde $u(g)$ y $u(v)$ son las incertidumbres del instrumento gravimétricos y volumétricos, g y v se corresponden con el peso y el volumen medido respectivamente.

La precisión intermedia (S_{rv}) calculada según la ecuación Ec.2 fue dividida por el promedio de las mediciones realizadas obteniéndose el término urs (Ec.3). Finalmente los resultados ($uc\%$) que se expresan en la tabla 1 fueron calculados utilizando la ecuación 3 (Ec.3).

Tipo celular	Clasificación	Organismo	Valor determinado (g/l)	uc%
Procariota	Bacteria	<i>E. coli</i>	2,4	11,7
Eucariota	Levadura	<i>P. pastoris</i>	15,4	12,5

Tabla 1: Resultados de las incertidumbres calculadas para distintos microorganismos sobre muestras de distintos contenido de masa seca.

Con el fin de estudiar de forma generalizada las incertidumbres de medición, comparar el comportamiento de cada organismo respecto del peso seco detectado, trabajar con una cantidad constante de muestra a secar y que a su vez sea la menor cantidad de muestra destructiva utilizada, se evaluó el volumen de cultivo necesario para obtener 8 mg (superior al límite de cuantificación de la técnica) de peso seco normalizada respecto de la OD₆₀₀ de cultivo para cada cepa, como "factor" (Figura 1).

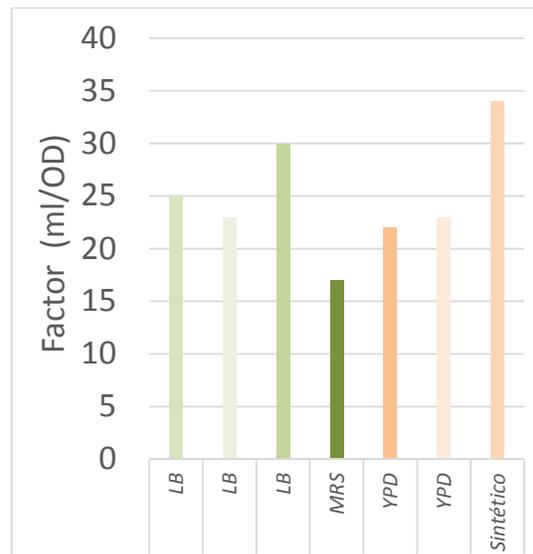


Figura 1: Comparación de los distintos factores obtenidos para bacterias (gama de verdes) y para levaduras (gama de naranjas).

Conclusiones

Este estudio le permitirán al Centro de Biotecnología Industrial satisfacer requerimientos metrológicos tanto de empresas biotecnológicas nacionales como propios. Se observa una variación de la incertidumbre creciente con la cantidad de analito medida para los valores de células testeados.

Al calcular las incertidumbres relativas en distintos valores de analito (2,4 g/l para *E. coli* y 15,4 g/l para *P. pastoris*) se observan

incertidumbres de medición crecientes, sugiriendo que la forma más adecuada para la expresión de la incertidumbre en el rango evaluado es la incertidumbre relativa.

El cálculo de incertidumbre fue realizado considerando la incertidumbre generada por la precisión del método más el estudio de la incertidumbre asociada a la exactitud, la cual se basó en la propagación de incertidumbres del instrumental, lo cual explica en gran medida la incertidumbre asociada al sesgo dado que la pesada final es la que define el valor a expresar y no se requiere para dicho método interpolar en una curva de estándar como en la mayoría de otros métodos. Una alternativa para estimar la incertidumbre asociada al sesgo, sería realizar el clásico estudio con un material de referencia, del cual no se dispone.

Se requieren estudios posteriores a fin de obtener un estimación generalizada de la

incertidumbre del método aplicable a todas las cepas que se muestren en la figura 1.

Bibliografía

- (1) Eurolab Española. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos- Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1° ed. 2016).
- (2) Curso de validación de Métodos Analíticos y Control de Calidad en Laboratorios. Instituto Nacional de Tecnología Industrial. 3, 4 y 5 de mayo 2017. Lic. Pablo Alvarez.
- (3) Certificado de calibración / medición para balanza analítica Sartorius (RUT- N°102-3438/U) Centro de Investigación y Desarrollo Física y Metrología – INTI.
- (4) UNE-EN-ISO 8655-2: 2002. Madrid: AENOR; 2002ISO 8655 Calibración de Pipetas. Apartado 2.